

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**RÔLES DIFFÉRENTIELS DES PETITES PROTÉINES DE FUSION
MEMBRANAIRE SNARES LORS DE LA BIOGENÈSE DES
VACUOLES PARASITOPHORES INDUITES PAR *LEISHMANIA***

Par

Olivier Séguin

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examinateur interne

Maritza Jaramillo
INRS - Centre Armand-Frappier
Santé Biotechnologie

Examinateur externe

Michel Desjardins
Département de microbiologie,
infectiologie et immunologie
Université de Montréal

Examinateur externe

France Daigle
Département de microbiologie,
infectiologie et immunologie
Université de Montréal

Directeur de recherche

Albert Descoteaux
INRS - Centre Armand-Frappier
Santé Biotechnologie

À mon père Gaetan Séguin, ma mère Linda Goulet et son mari Réjean Viola, à ma conjointe Katerine Tremblay et à ma fille Brianna Séguin.

Puissent-ils vivre éternellement à travers mon œuvre.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Albert Descoteaux, sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour. Merci pour l'accueil au sein de votre merveilleux laboratoire.

Je tiens également à remercier la Fondation universitaire Armand-Frappier pour les multiples bourses qu'elle m'a octroyées tout au long de mon cheminement, ainsi que le Fonds de recherche Santé Québec pour le financement qui m'a permis de compléter mon doctorat.

Un gros merci à mes collègues, présents et passés, pour ces années de plaisir, de rire et de travail acharné. Une mention spéciale pour Pierre-André Casgrain avec qui j'ai traversé le baccalauréat ainsi que la maîtrise et sans qui je n'aurais même pas découvert le laboratoire qui me sert de deuxième maison depuis longtemps déjà. Merci également à Renaud Dion pour les nombreuses heures passées à l'animalerie. Sans lui, j'aurais succombé à la folie plus d'une fois. Merci à Christine Matte pour son aide tout au long de mon projet, mais également pour tous les efforts et toute l'énergie qu'elle met au bon fonctionnement du laboratoire. Merci à notre roux national Kevin Otis avec qui j'ai partagé un nombre d'heures absurde en ligne. Merci à Roman Telittchenko, notre "Friendly Neighborhood Russian", pour son support au front de bataille. Finalement, merci à Jessy Tremblay de m'avoir aidé et formé en microscopie confocale. Ceci est au coeur de mon projet, ayant passé 594h et 15 minutes de temps à observer mes expériences, soit 25 jours complets. Encore une fois, désolé pour la tête de laser.

Un merci particulier à ma conjointe Katerine Tremblay pour son support et sa patience, pour ses encouragements et son dévouement. Merci à la plus merveilleuse maman du monde qui s'occupe de notre bébé pendant que je complète mon PhD.

RÉSUMÉ

Leishmania est le parasite causant la leishmaniose, une maladie endémique dans près de 100 pays à travers le monde. Elle est présente sous forme viscérale, cutanée et mucocutanée selon l'espèce de *Leishmania* impliquée. Le parasite est phagocyté par les cellules immunitaires de son hôte mammifère suite à son injection par son vecteur, la mouche des sables. Pour survivre, le parasite modifie le phagosome en vacuole parasitophore (PV) qui peut être individuelle, petite et serrée autour du parasite (*L. major*), ou communale, large et volumineuse (*L. amazonensis*). Nous avons émis l'hypothèse que des petites protéines de fusion membranaire appelées SNAREs jouent un rôle différentiel lors de la biogénèse des deux types de PV. Nous avons d'abord établi que la vacuole communale de *L. amazonensis* recrute la membrane plasmique (SNAP23), les endosomes de recyclage (VAMP3), le réticulum endoplasmique (STX18) et le trans-Golgi (Vti1a) tout en fusionnant avec les lysosomes (LAMP1). D'autre part, seuls les endosomes tardifs (VAMP8) sont recrutés aux PV individuelles de *L. major* sans fusion avec les lysosomes, indiquant deux mécanismes de survie distincts. En infectant des macrophages dérivés de la moëlle osseuse (BMM) de souris *Vamp3^{-/-}*, nous avons démontré une augmentation significative de la survie et du volume de la PV de *L. amazonensis*. Nous avons également observé une augmentation significative du recrutement de la sous-unité TCIRG1 du domaine V₀ de la V-ATP-ase aux PV de *L. amazonensis* en absence de VAMP3. Le domaine V₀ pourrait favoriser la fusion membranaire à la PV de *L. amazonensis* et jouer un rôle anti-inflammatoire. De plus, il est impliqué dans l'élargissement des PV de *L. amazonensis* en modulant l'homéostasie du cholestérol. Pour évaluer la capacité inflammatoire des BMMs *Vamp3^{-/-}*, nous avons quantifié leur production d'oxyde nitrique (NO) suite à un traitement à l'interféron et au LPS. Cette production, et leur capacité à éliminer *L. amazonensis* se révéla réduite de moitié en absence de VAMP3. De plus, l'homéostasie du cholestérol est importante à la présentation antigénique au CMH-I. Nous avons trouvé, en absence de VAMP3, une présentation antigénique croisée augmentée. En conclusion, nos travaux mettent en évidence la participation de VAMP3 comme régulateur négatif de l'infection par *L. amazonensis*, ainsi que de la présentation antigénique croisée.

Mots clés: *Leishmania*, macrophage, fusion membranaire, SNAREs, VAMP3, V-ATPase, présentation antigénique croisée.

ABSTRACT

Leishmania is the parasite responsible for *Leishmaniasis*, a disease endemic in roughly 100 countries around the world. This disease can be visceral, cutaneous or mucocutaneous depending on the *Leishmania* species involved. Following the bloodmeal of its vector, the female sandfly, the parasite is quickly phagocytosed by its mammalian host immune cells. To survive, the parasite then transforms the phagosome into a parasitophorous vacuole (PV) that can be individual, small and tight around the parasite (*L. major*) or communal, large and spaceous (*L. amazonensis*). We proposed that SNAREs, little fusion proteins, are differentially involved during both PV types biogenesis. Using mice bone marrow derived macrophages (BMM) and fluorescent microscopy, we first established that *L. amazonensis* communal PV recruits SNAREs and membrane from the plasma membrane (SNAP23), the recycling endosome (VAMP3), the endoplasmic reticulum (STX18) and the trans-Golgi (Vti1a) with fusion with the lysosomes (LAMP1). On the other hand, only the late endosomes (VAMP8) accumulate on *L. major* individual PV without fusion with the lysosomes, indicating two different survival mechanisms. Using *Vamp3^{-/-}* BMMs, we found that, in the absence of VAMP3, the viability of *L. amazonensis* and the volume of its PV doubled. We also observed a highly significative recruitment of the TCIRG1 subunit of the V₀ of the V-ATPase. The V₀ was previously proposed to act as a membrane fusion promoter and as an inhibitor of the inflammatory response. It was also shown to control *L. amazonensis* PV biogenesis via cholesterol homeostasis. We verified the inflammatory capacity of IFN-γ and LPS stimulated *Vamp3^{-/-}* BMMs through nitric oxide (NO) quantification. We found that their NO production and their ability to eliminate *L. amazonensis* was reduced by roughly 50%. Cholesterol homeostasis also plays a role during antigen presentation to MHC-1. We found that antigen cross-presentation was augmented in the absence of VAMP3 during *Leishmania* infection. In conclusion, our work demonstrates the participation of VAMP3 as a negative regulator in *L. amazonensis* infection as well as a negative regulator of antigen cross-presentation.

Keyword: *Leishmania*, macrophage, membrane fusion, SNAREs, VAMP3, V-ATPase, antigen cross-presentation

X

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ	VII
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIX
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	27
1 Phagocytose.....	29
1. 1 Phagocytes	29
1. 2 Récepteurs phagocytiques	30
1. 2. 1 FcγR	32
1. 2. 2 Récepteur du complément de type 3	32
1. 2. 3 Éviter l'activation cellulaire	33
1. 3 La maturation du phagosome	38
1. 3. 1 Facteurs microbicides du phagosome	40
1. 3. 2 La V-ATPase	40
1. 3. 3 NADPH oxydase	42
1. 3. 4 iNOS	43
1. 3. 5 Survivre au phagosome.....	44
1. 4 Biogenèse du phagosome et fusion membranaire	47
1. 4. 1 Le fonctionnement des SNAREs	49
1. 4. 2 Contrôle de la fusion membranaire	51
1. 4. 3 Membrane plasmique - SNAP23.....	53
1. 4. 4 Les endosomes précoces - Syntaxine 13.....	54
1. 4. 5 Les endosomes de recyclage - VAMP3	54
1. 4. 6 Les endosomes tardifs - VAMP8	55
1. 4. 7 Le trans-Golgi - Vti1a.....	56

1. 4. 8	Le réticulum endoplasmique - Syntaxine18	56
1. 4. 9	SNARE et pathogenèse.....	57
1. 5	La présentation antigénique	58
1. 5. 1	CMH-I.....	59
1. 5. 2	CMH-II.....	60
1. 5. 3	La présentation antigénique croisée	60
2	<i>Leishmania</i>	63
2. 1	La leishmaniose.....	63
2. 2	Le cycle de vie	65
2. 3	Les facteurs de pathogenèse	66
2. 3. 1	GP63	67
2. 3. 2	LPG	71
2. 4	Se rendre aux phagocytes.....	73
2. 4. 1	Métacyclogénèse	73
2. 4. 2	Le sacrifice essentiel	73
2. 4. 3	Complément et galectine.....	75
2. 4. 4	Th1 et Th2	77
2. 4. 5	Pièges extracellulaires des neutrophiles	78
2. 4. 6	Cheval de Troie	78
2. 5	Internalisation du parasite	79
2. 6	Survie intracellulaire	80
2. 6. 1	Formation de la vacuole parasitophore	80
2. 6. 2	Modulation de la réponse inflammatoire	84
2. 6. 3	Altération de la présentation antigénique	89
2. 6. 4	Activation des cellules T.....	89
3	Mise en contexte et Hypothèses	91
CHAPITRE 2: ARTICLE	93	
1	VAMP3 and VAMP8 regulate the development and functionality of parasitophorous vacuoles housing <i>Leishmania amazonensis</i>	95

1. 1 ABSTRACT	96
1. 2 INTRODUCTION	97
1. 3 RESULTS	99
1. 3. 1 Differential recruitment of SNAREs to PVs harboring <i>L. major</i> and <i>L. amazonensis</i>	99
1. 3. 2 VAMP3 and VAMP8 contribute to the control of <i>Leishmania</i> infection.....	102
1. 3. 3 VAMP3 negatively regulates antigen cross-presentation.....	108
1. 4 DISCUSSION	112
1. 5 MATERIALS AND METHODS.....	115
1. 5. 1 Ethics statement.....	115
1. 5. 2 Antibodies.....	116
1. 5. 3 Bone marrow-derived macrophages and dendritic cells.....	116
1. 5. 4 Parasite strains and culture.....	117
1. 5. 5 Infection of macrophages	117
1. 5. 6 Confocal immunofluorescence microscopy	118
1. 5. 7 Lysis, SDS-PAGE and Western blotting.....	118
1. 5. 8 Antigen cross-presentation	119
1. 6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	119
1. 7 FUNDING	120
1. 8 SUPPORTING INFORMATION	120
CHAPTER 3: DISCUSSION.....	123

1 Biogenèse des PV de <i>Leishmania</i>	125
1. 1 Fusion membranaire	125
1. 1. 1 Maturation du phagosome	125
1. 1. 2 Autres sources de membrane.....	127
1. 2 Facteurs de pathogénèse	129
1. 2. 1 LPG	129
1. 2. 2 GP63	129

1. 3	Facteurs microbicides	130
1. 4	Espèce et souche spécifiques.....	131
2	VAMP3 et VAMP8.....	132
2. 1	VAMP3 régulateur d'infection	132
2. 1. 1	Régulateur de la fusion membranaire	133
2. 1. 2	Régulateur du domaine V ₀	135
2. 1. 3	Régulateur de la production de NO	136
2. 1. 4	Régulateur de la présentation antigénique croisée	138
2. 1. 5	VAMP3 et l'homéostasie du cholestérol	142
2. 1. 6	<i>In vivo</i>	147
2. 2	VAMP8 régulateur d'infection	148
3	Cibles thérapeutiques potentielles	149
CONCLUSION	151
BIBLIOGRAPHIE	155
ANNEXE I - Résultats non publiés	191
1	Matériels et méthodes non publiées	193
1. 1	Marquage des membranes du parasite et bodipy	193
1. 2	Zymosan recouvert de LPG	193
1. 3	Production d'oxyde nitrique	193
1. 4	Infection <i>In vivo</i>	194
1. 5	Parasitémie et recrutement cellulaire.....	194
1. 6	Anticorps.....	194
ANNEXE II - Revue de littérature	205
1	<i>Leishmania</i> , the phagosome, and host responses: The journey of a parasite	207
1. 1	Abstract	208
1. 2	Introduction	209
1. 2. 0	Within the fly	209

1 .3. 0	A necessary sacrifice.....	209
1. 3	Before phagocytosis.....	210
1. 3. 1	Complement and galectin	210
1. 3. 2	Natural Killer cells	211
1. 3. 3	Phagocytes.....	211
1. 3. 4	Neutrophil Extracellular Traps.....	212
1. 4	After phagocytosis	212
1. 4. 1	Parasitophorous vacuole formation	212
1. 4. 2	Cytokines modulation	213
1. 5	Modulation of immune responses	215
1. 5. 1	Antigen presentation.....	215
1. 5. 2	T cells activation	215
1. 5. 3	Dissemination.....	216
1. 6	Conclusions and perspectives.....	217
1. 7	Acknowledgments.....	218
2	References	219
ANNEXE III - Co-auteur.....	227	
1	<i>Leishmania major</i> Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63	229
1. 1	Abstract	230
1. 1. 1	Author Summary	230
1. 2.	Introduction	231
1. 3.	Results	232
1. 3. 1	<i>L. major</i> promastigotes impair the recruitment of LC3 to phagosomes in a GP63-dependent manner	232
1. 3. 2	<i>Leishmania major</i> promastigotes block the recruitment of NOX2 to phagosomes in a GP63-dependent manner	234
1. 3. 3	VAMP8 contributes to the recruitment of LC3 to phagosomes containing <i>L. major</i>	240

1. 3. 4	Absence of VAMP8 does not affect intracellular survival of <i>L. major</i> in macrophages	242
1. 4.	Discussion	243
1. 5.	Materials and Methods.....	248
1. 5. 1	Ethic statements.....	248
1. 5. 2	Macrophage culture	248
1. 5. 3	Parasites and infections	249
1. 5. 4	Western blotting	249
1. 5. 5	Confocal immunofluorescence microscopy	250
1. 5. 6	ROS measurement.....	251
1. 5. 7	Statistical analysis.....	251
1. 6.	Supporting Information.....	252
1. 7.	Acknowledgments	253
1. 8.	Author Contributions	253
2	References	255

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. 1	Les récepteurs phagocytiques	31
Figure 1. 2	Phagocytose médiée par le FcγR et le CR3.....	33
Figure 1. 3	Évasion des signaux pro-inflammatoires.....	37
Figure 1. 4	Maturation du phagosome	40
Figure 1. 5	La V-ATPase	42
Figure 1. 6	La NADPH oxydase	43
Figure 1. 7	Les agents microbicides et comment s'en échapper.....	45
Figure 1. 8	Stratégies de modulation du phagosome.....	46
Figure 1. 9	Distribution des SNAREs	48
Figure 1. 10	Arbre phylogénique des SNAREs.....	50
Figure 1. 11	Mode d'action des SNAREs	51
Figure 1. 12	Utilisation des SNAREs pour bloquer la maturation du phagosome ..	58
Figure 1. 13	La présentation antigénique.....	62
Figure 1. 14	Espèces associées aux différents types de leishmaniose.....	64
Figure 1. 15	Le cycle de vie de <i>Leishmania</i>	66
Figure 1. 16	Facteurs de pathogenèse de <i>Leishmania</i>	67
Figure 1. 17	Distribution de GP63	70
Figure 1. 18	La conformation du LPG	72
Figure 1. 19	Exposition de PS à la surface des parasites	74
Figure 1. 20	La cascade du complément	76
Figure 1. 21	Réponse Th1 vs Th2.....	77
Figure 1. 22	Récepteurs impliqués lors de la phagocytose de <i>Leishmania</i>	80
Figure 1. 23	Maturation de la vacuole individuelle de <i>Leishmania</i>	82
Figure 1. 24	Biogenèse de la vacuole communale	84
Figure 1. 25	Impact de GP63 sur les voies de signalisation.....	88

ARTICLE

Figure 2. 1	Differential recruitment of SNAREs to <i>Leishmania</i> -harboring PVs ...	101
Figure 2. 2	VAMP3 negatively regulates <i>L. amazonensis</i> infection	103
Figure 2. 3	SNARE engagement is strain-specific	106
Figure 2. 4	Impact of VAMP3 on <i>L. amazonensis</i> LV79 and PH8	107
Figure 2. 5	Impact of VAMP8 on <i>L. amazonensis</i> LV79 and PH8	108
Figure 2. 6	VAMP3 negatively regulates antigen cross-presentation	111
Figure 2S. 1	Lysosomes and early endosomes recruitment	120
Figure 2S. 2	OVA-expressing <i>Leishmania</i> replicate in BMDC	121

DISCUSSION

Figure 3. 1 Biogenèse des PVs 127

CONCLUSION

Figure 3. 2 Mécanismes de régulation possibles 152

ANNEXE I

Figure A1. 1	Recrutement de Stx5 et de la membrane du parasite	195
Figure A1. 2	LPG limite l'expansion de la PV de <i>L. amazonensis</i>	196
Figure A1. 3	Recrutement des agents microbicides aux PVs.....	197
Figure A1. 4	La fusion membranaire en absence de VAMP3.....	198
Figure A1. 5	VAMP3 régule la V-ATPase et la sécrétion du NO	200
Figure A1. 6	VAMP3 régule négativement la présentation antigénique croisée....	201
Figure A1. 7	VAMP3 est un potentiel régulateur d'infection <i>in vivo</i>	202
Figure A1. 8	VAMP3 n'influence pas la survie dans les cellules dendritique	203

ANNEXE III

Figure A3. 1	Infection promotes LC3 conversion and p62 expression	235
Figure A3. 2	<i>L. major</i> GP63 prevents LC3 recruitment to phagosomes	237
Figure A3. 3	ROS production is required for LC3 recruitment.....	238
Figure A3. 4	<i>L. major</i> GP63 inhibits gp91phox recruitment to the phagosome....	239
Figure A3. 5	<i>L. major</i> GP63 cleaves VAMP8 and prevents its recruitment.....	241
Figure A3. 6	VAMP8 is essential for LC3 recruitment to <i>L. major</i> PV	244
Figure A3. 7	VAMP8 absence does not affect <i>L. major</i> survival in macrophages...	245
Figure A3S. 1	<i>L. major</i> GP63 down modulates VAMP8.....	252
Figure A3S. 2	<i>L. tarentolae</i> does not prevent LC3 recruitment to the phagosome ..	253

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4E-BP1: Protéine de liaison 1 au eIF4E

α-SNAP : Protéines d'attachements alpha de NSF

ABC: Transporteurs à cassette de liaison de l'ATP

ABCA1: La cassette de liaison d'ATP A1

ADN: Acide désoxyribonucléique

AP: Phosphatase acide

AP-1: Protéine activatrice 1

APOA1: Apolipoprotéine A1

Arf: Facteur de ribosylation de l'ADP

ARN: Acide ribonucléique

Arp2/3: Protéines reliées à l'actine 2/3

ATP: Adenosine triphosphate

BMDC: Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse

BMM: Macrophages dérivés de la moelle osseuse

CCL: Ligand des chimiokines

CCP : Puits recouverts de clathrine

CCV : vésicules recouvertes de clathrine

CD: Marqueur de différenciation

CD40L: ligand du CD40

CDC: Centres pour le Contrôle et la Prévention des maladies

CDC42: Homologue de la protéine 42 de contrôle de la division cellulaire

CLIP: Peptide à chaîne invariante associé à la classe II

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

COG: Golgi oligomérique conservé

COP1: Protéine d'enrobage 1

CP: Cystéine protéase

CR: Récepteur du complément

CXCL: Ligand des motifs c-x-c des chimiokines

C3bi: Fragment de la protéine du complément C3bi

DC-SIGN: Molécule d'adhésion intercellulaire spécifique aux cellules dendritiques-3-non-intégrine

DCVs: Vésicules à noyau dense

DEC205: Antigène lymphocytaire 75

DNGR-1: Récepteur 1 du groupe lectine des cellules dendritiques NK

EEA1: Antigène des endosomes précoce 1

EGFR: Récepteur du facteur de croissance épidermique

eIF4E: Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E

eIF4F: Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4F

ERAP-1: Récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1 excrétant le régulateur d'aminopeptidase

ERp57: Protéine disulfure-isomérase A3

ESCRT: Complexes de tri endosomal requis pour le transport

FcγR: Récepteur Fc gamma

Fe²⁺: Ion de fer

FMN: Mononucléotide flavine

GARP: Protéine rétrograde associée au Golgi

GDP: Guanosine diphosphate

GEF: Facteur d'échange de nucléotides guanine

GFP: Protéine fluorescente verte

GILT: Thiolreductase lysosomale inducible par l'interféron gamma

GIPL: Glycophospholipide

GP63: Glycoprotéine 63

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

GTP: Guanosine triphosphate

GTPase: Guanosine triphosphatase ou guanosine triphosphate phosphohydrolase

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

hBD: Bêta-défensine humaine

HCV : Virus de l'hépatite C

HLA: Antigène leucocytaire humain

HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme

HNO: Nitroxyle

HSV-1: Virus de l'herpès simplex 1

hVPS34: Phosphatidylinositol 3-kinase

IC : compartiment intermédiaire (IC)

ICAM: Molécule d'adhésion intercellulaire 1

IFN: Interféron

IgG: Immunoglobuline G

IL: Interleukine

IL-1R : Récepteur de l'interleukine 1

iNOS: Oxyde nitrique synthase inducible

IRF: Facteurs de régulation de l'interféron

IRGM3: Le membre m3 de la famille des GTPase lié à l'immunité

iSNARE: SNARE inhibitrice

ITAM: Motif d'activation de la tyrosine des immunorécepteurs

ITIM: Motif inhibiteur à base de tyrosine des immunorécepteurs

IκB: Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B

JAK2: Janus kinase 2

KMP-11: Protéine membranaire 11 kinétoplasmide

KTIM: Motif inhibiteur à base de tyrosine du domaine kinase

LAMP: Protéine membranaire associée au lysosome

LAP: Phagocytose associée à LC3

LBPA: Acide lysobiphosphatidique

LC3: Protéine 1A/1B-chaîne légère associée aux microtubules 3

LD: Gouttelettes lipidiques

LPG: Lipophosphoglycane

LPS: lipopolysaccharide

LYST/Beige: Régulateur du trafic lysosomal

MAC: Complexe d'attaque membranaire

MAPK: Protéines kinases activées par un mitogène

MARCO: Récepteur des macrophages à structure collagénique

MARKS: Substrat myriostoylée riche en alanine des Kinases C

MCP: Protéine chimioattractante du monocyte

MFR: récepteur des mannoses-fucoses

MIIC: Compartiments de chargement du CMH de classe II

MIP: Protéine inflammatoire du macrophage

Mn²⁺: Ion de manganèse

MRP: Protéines apparentées aux MARKS

mTOR: Cible mécaniste de la rapamycine

mTORC1: Complexe 1 de la cible mécaniste de la rapamycine

Munc: homologue mammifère des UNC ou mammifère non coordonné

MyD88: Réponse primaire de différenciation myéloïde 88

N₂O₃: Trioxyde de diazote

NADPH oxidase: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase

NEM: N-éthylmaléimide

NET: Pièges extracellulaires des neutrophiles

NF-κB: Facteur nucléaire kappa B

NK: Cellule tueuse naturelle

NLR: Récepteur ressemblant aux Nod

NO: Oxyde nitrique

NO₂: Dioxyde d'azote

NOX2: NADPH oxydase 2

NPC: Protéine Niemann-Pick

NRAMP1: Protéine 1 de macrophage associée à la résistance naturelle

NSF: Facteur sensible au N-éthylmaléimide, ATPase de fusion vésiculaire

O₂: Dioxygène

ONOO: Peroxynitrite

PAF: Facteur d'activation des plaquettes

PAMPs: Modèles moléculaires associés aux agents pathogènes

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne

PG: Phosphoglycane

PGE2: Prostaglandine E2

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PI3P: Phosphatidylinositol 3-phosphate

PIKFYVE: Phosphoinositide kinase contenant un domaine FYVE

PIP5K3: Phosphoinositide kinase contenant un domaine FYVE

PKC: Protéine kinase C

PLC: Complexe de chargement peptidique

PPG: Protéophosphoglycane

PRR: Récepteurs de reconnaissance de formes

PS: Phosphatidylsérine

PSG: Gel sécrété par les promastigotes

PTP: Protéine tyrosine phosphatase

PV: Vacuole parasitophore

Rab: Associé aux Ras dans le cerveau

RelA: Facteur de transcription p65

RER: réticulum endoplasmique rugueux

Rho : Famille des homologues Ras

RhoA: Membre A de la famille des homologues Ras

RILP: Protéine lysosomale interagissant avec Rab

RIM: Molécule interagissant avec Rab-3

RNS: Espèces azotées réactives

ROS: Espèces réactives de l'oxygène

RSV : Virus respiratoire syncytial

SAP : phosphatase acide sécrétée

Sec22b: Homologue b de Sec22

SER: réticulum endoplasmique lisse

SHP: Phosphatase contenant le domaine de la région d'homologie Src2

SLP-76: Protéine cytosolique lymphocytaire 2

SNAP: Protéine associée aux synaptosomes

SNAP-a: Protéine d'attachement alpha de NSF

SNAREs: Récepteur soluble de la protéine d'attachement du facteur sensible au N-éthylmaléimide

SR-A: Récepteur scavenger A

STAT: Transducteur de signal et activateur de transcription

Stx: Syntaxine

Syt: Synaptotagmin

TAP: Transporteur associé au traitement de l'antigène

TCIRG1: Régulateur immunitaire 1 des lymphocytes, sous-unité a3 transportante du domaine V₀ de l'ATPase H⁺

TCPTPT: Phosphatase des lymphocytes T

TcR: Récepteur des lymphocytes T

TGF: Facteur de croissance transformateur

TGN : réseau trans-Golgi

Th: Cellules T auxiliaires

TIR: Récepteur d'intimine transloqué

TLR: Récepteurs ressemblant aux Toll

TNF: Facteur de nécrose tumoral

TRAF: Facteur associé au récepteur du TNF

TRIF: Interféron-beta induisant un adaptateur contenant un domaine TIR

t-SNARE: SNARE cible

V₀: Complexe V₀ de la V-ATPase

V₁: Complexe V₁ de la V-ATPase

VAMP: Protéine membranaire associée aux vésicules

V-ATPase: H⁺-ATPase de type vacuolaire

v-SNARE: SNARE de vésicule

Vti1a and Vti1b: Homologue 1A ou 1B des vésicules de transport par interaction avec les t-SNAREs

WASP: Protéine du syndrome Wiskott-Aldrich

WHO: Organisation mondiale de la Santé

YKT6: Homologue de la synaptobrevine YKT6

Zn²⁺: Ion zinc

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1 Phagocytose

La phagocytose est le processus par lequel une cellule internalise une particule ou un microorganisme pathogène. Elle commence par la reconnaissance de la particule à ingérer par des récepteurs spécifiques qui entraînera une polymérisation d'actine au site d'ingestion. Une fois la particule internalisée, le phagosome entame par la suite sa maturation par une série d'évènements de fusion avec différents compartiments de la voie endocytique (Desjardins, Huber et al. 1994, Desjardins 1995, Vieira, Botelho et al. 2002, Deschamps, Echard et al. 2013) (Figure 1. 1). Le parasite *Leishmania* est principalement internalisé par endocytose par les macrophages (Farah, Samra et al. 1975, Chang and Dwyer 1976). Les mécanismes décrits dans la section suivante expliquent les étapes de la phagocytose et les mécanismes impliqués lors de la destruction des microorganismes pathogènes comme *Leishmania*.

1. 1 Phagocytes

Le processus de phagocytose est enclenché par divers types cellulaires pouvant être divisés en trois catégories: les phagocytes professionnels, les paraprofessionnels et les non professionnels. Ils sont divisés en fonction de leur capacité à dégrader et présenter les antigènes, leur efficacité phagocytaire ainsi que par leurs ligands et récepteurs (Rabinovitch 1995).

Les phagocytes professionnels sont les macrophages et les cellules polymorphonucléaires qui excellent non seulement à la phagocytose de microorganismes pathogènes et de particules étrangères. Ces phagocytes jouent également un rôle important pour l'homéostasie en phagocytant les cellules apoptotiques et les cellules anormales (Arandjelovic and Ravichandran 2015). La grande quantité et diversité de récepteurs à la surface de ces cellules leur confèrent leur capacité à reconnaître et phagocytter une grande diversité de particules. Ils possèdent notamment des "pattern-recognition receptors" (PRRs) reconnaissant des motifs conservés sur les microorganismes pathogènes nommés "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) (Janeway 1992). Ces phagocytes sécrètent également une grande quantité de cytokines et de molécules immunomodulatoires.

Les phagocytes paraprofessionnels sont composés de cellules spécialisées comme les cellules dendritiques. Ils possèdent une grande capacité à présenter des antigènes, mais peuvent également, dans une moindre mesure, phagocytter des agents pathogènes (Rabinovitch 1995).

Les phagocytes non professionnels, tels que les cellules épithéliales et les fibroblastes peuvent phagocytter une moins grande diversité de particule dû à l'absence des récepteurs de phagocytose tels que le récepteur de l'immunoglobuline (FcR) et celui du complément de leur surface. Le simple ajout du FcγR permet notamment d'augmenter sensiblement la capacité de phagocytose de ces cellules (Indik, Park et al. 1995, Caron and Hall 1998). Les phagocytes non professionnels produisent également moins d'agents microbicides une fois une particule phagocytée et ne sécrète pas une gamme de cytokines aussi complète que les phagocytes professionnels (Rabinovitch 1995). Les fibroblastes peuvent notamment servir de réservoir lors d'infection à la *Leishmania* (Bogdan, Donhauser et al. 2000).

1. 2 Récepteurs phagocytiques

La phagocytose est également dirigée par les ligands reconnus à la surface de la particule à internaliser. Ces ligands, classés comme des opsonines ou des ligands non opsoniques, sont reconnus par différents récepteurs qui leur sont spécifiques. Les opsonines comme le C3b et les immunoglobulines G (IgG) sont, par exemple, respectivement reconnues par le récepteur du complément de type 3 (CR3) et les FcγRs et entraînent différents processus d'internalisation. Les ligands non opsoniques comme les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries, les phosphatidylserines (PS) à la surface des cellules apoptotiques, le β-glucan composant la paroi cellulaire de certaines bactéries et champignons et même le lipophosphoglycan (LPG) de *Leishmania* peuvent quant à eux être reconnus par une multitude de récepteurs comme les récepteurs « scavenger » A (SR-A), les récepteurs des macrophages à structure collagénique (MARCO), le groupe de différenciation 36 (CD36) et Dectin-1 (Gordon 2016). Certains récepteurs de type toll (TLR) peuvent également faciliter les évènements de phagocytose comme notamment le TLR4 en complexe avec CD14 et le facteur de différenciation myéloïde 2 (MD-2) qui peuvent reconnaître plus spécifiquement les LPS et les PS à la surface des cellules apoptotiques (Calvano, Agnese et al. 2003) (Figure 1. 1).

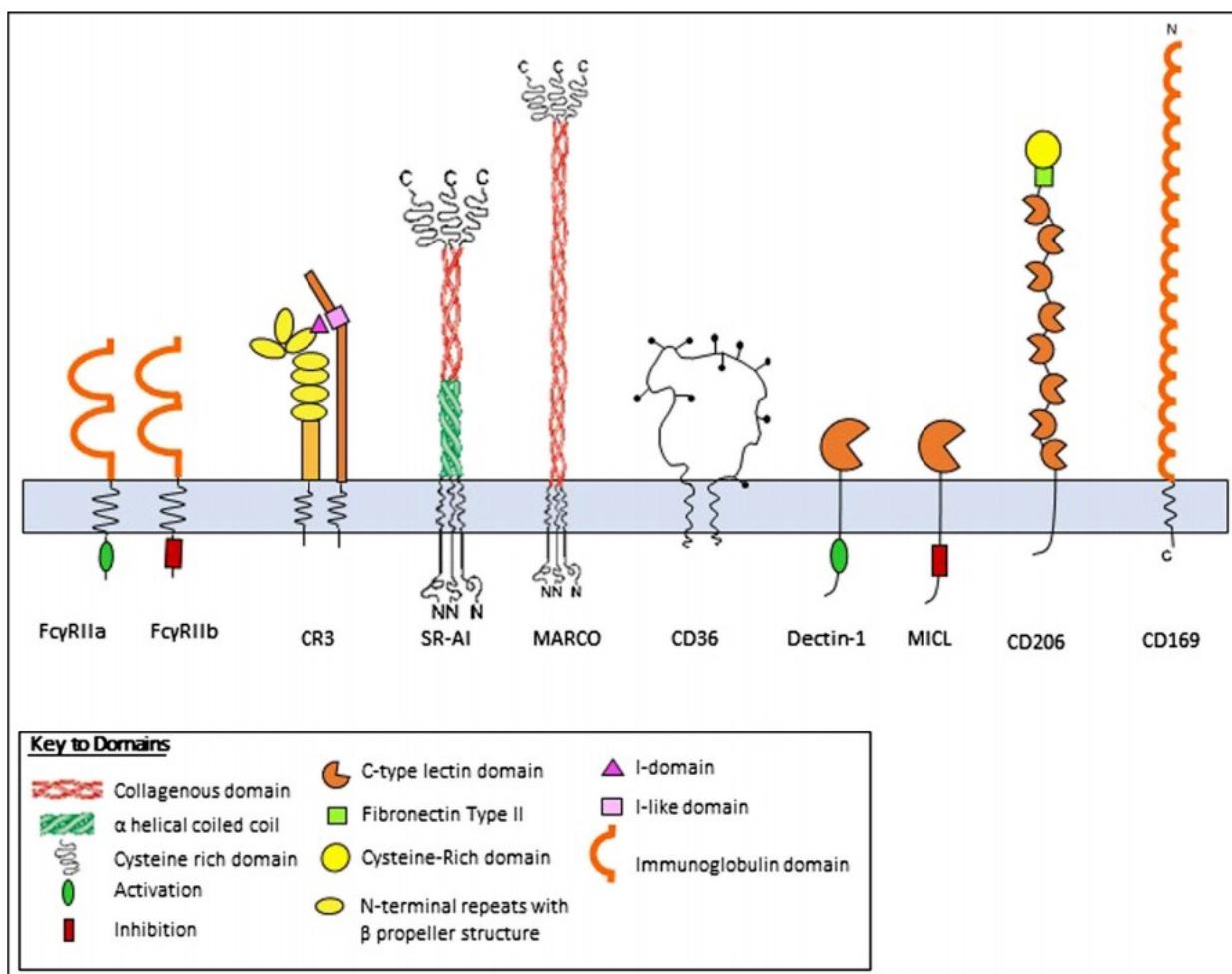


Figure 1. 1 Les récepteurs phagocytiques

Représentation des divers récepteurs associés à la phagocytose des microbes et des cellules apoptotiques.
Reproduit avec la permission d'Elsevier (Gordon 2016).

1. 2. 1 Fc γ R

La reconnaissance d'une particule recouverte d'IgG par un des trois types de Fc γ Rs, soit les types I, II ou III, entraîne une cascade d'activation commençant par une phosphorylation de la chaîne γ du motif d'activation de la tyrosine des immunorécepteurs (ITAM) par une tyrosine kinase de la famille Src. Cela entraîne une activation de plusieurs facteurs d'échanges de nucléotides guanine (GEFs) qui active par la suite les guanosines triphosphatase (GTPases) Rac et l'homologue de la protéine 42 de contrôle de la division cellulaire (CDC42) de la famille des homologues Ras (Rho) en remplaçant la guanosine diphosphate (GDP) par la guanosine triphosphate (GTP). Les GTPase activeront par la suite la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich (WASP) qui liera le complexe de protéines de liaison à l'actine 2/3 (Arp2/3). Ce complexe enclenchera la polymérisation d'actine à la coupe phagocytique. Une fois l'internalisation complétée, la dépolymérisation aura lieu par l'hydrolysation du GTP en GDP sur les GTPases (Deschamps, Echard et al. 2013). Le processus de phagocytose incluant l'extension de podosomes est également connu comme étant la phagocytose de type I (Le Cabec, Carreno et al. 2002) (Figure 1. 2).

1. 2. 2 Récepteur du complément de type 3

Le récepteur du complément de type 3 (CR3) est un complexe hétérodimérique de glycoprotéines transmembranaires appartenant à la famille des β_2 -intégrines qui reconnaissent les particules opsonisées par le fragment de la protéine du complément C3bi. L'engagement du CR3 n'entraîne pas d'activation des GTPases Rac et CDC42, mais cause l'activation du membre A de la famille des homologues Ras (RhoA) pour la modulation d'actine. Contrairement à la phagocytose de type I effectué lors de l'engagement des Fc γ Rs, le CR3 entraîne une phagocytose de type II, sans formation de podosomes où la particule opsonisée coule à travers la membrane plasmique (Le Cabec, Carreno et al. 2002) (Figure 1. 2).

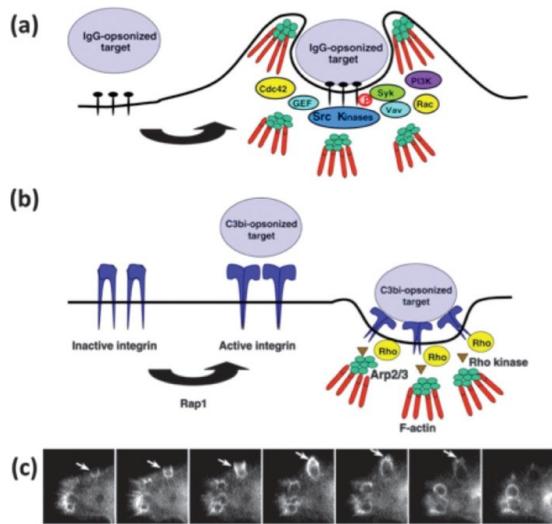


Figure 1.2 Phagocytose médiée par le Fc γ R et le CR3

A. Phagocytose d'une particule opsonisée par des IgG via le Fc γ R avec extension de pseudopodes B. Phagocytose d'une particule opsonisée par le complément où la particule coule à travers la membrane. C. Visualisation du réseau d'actine formé à la coupe phagocytique lors de l'internalisation d'une particule opsonisée par des IgG. Reproduit avec la permission de "The Royal Society of Chemistry" (Canton and Battaglia 2012).

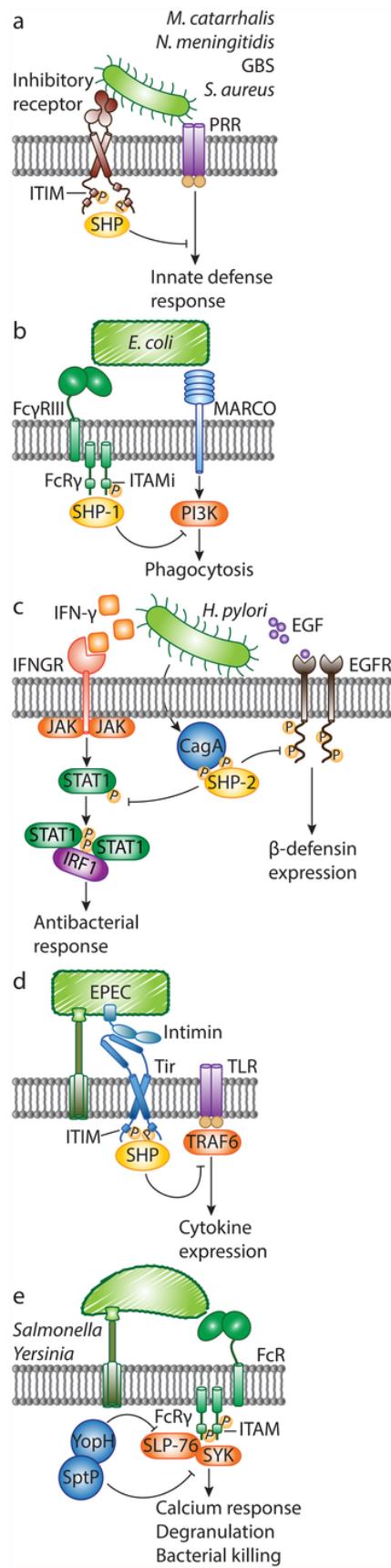
1. 2. 3 Éviter l'activation cellulaire

Pour survivre, les microorganismes pathogènes ont du évoluer afin de limiter l'activation cellulaire de leur hôte. Plusieurs des stratégies de survie sont conservées d'un agent pathogène à un autre. Les étudier peut ainsi donner des indices importants concernant les mécanismes d'évasion potentiellement employés par *Leishmania*. La section suivante se consacre à la démonstration des stratégies de survie employées par une diversité de microorganismes pathogènes. Les mécanismes connus employés par *Leishmania* seront traités à la section 2 de la revue de littérature.

Une des nombreuses stratégies de survie pour les microorganismes pathogènes intracellulaires consiste à modifier leur PAMPs afin d'éviter l'activation des différents récepteurs PRR entraînant la réponse immunitaire qui mènerait à leur destruction. Plusieurs bactéries possèdent des lipides A du LPS ou encore des flagelles modifiés afin d'éviter l'activation par le TLR4 et le TLR5 respectivement (Neumeister, Faigle et al. 1998, Kawahara, Tsukano et al. 2002, Andersen-Nissen, Smith et al. 2005, Hajjar, Harvey et al. 2006, Coats, Berezow et al. 2011, Cullen, Giles et al. 2011, Slocum, Coats et al. 2014).

Une autre stratégie efficace pour empêcher l'activation cellulaire consiste à interférer dans la cascade d'activation des TLR et au niveau des voies de signalisation pro-inflammatoires. Les virus excellent dans ce domaine en modulant la voie du facteur nucléaire kappa B (NF-κB). Le premier exemple démontré, les protéines virales A46R et A52R du virus de la vaccine visent la réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MyD88) et l'interféron-β induisant un adaptateur contenant un domaine TIR (TRIF). Cela entraîne une diminution de l'activation de NF-κB par les TLR et le récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R) (Bowie, Kiss-Toth et al. 2000, Stack, Haga et al. 2005). D'autres virus comme le virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1), le virus respiratoire syncitial (RSV) et le virus de l'hépatite C (HCV) inhibent de la même façon la réponse inflammatoire. Similairement, l'effecteur Yop du système de sécrétion de type III (SST3) de *Yersinia pestis* vise les facteurs associés au récepteur de TNF 6 et 3 (TRAF6 et TRAF3) pour inhiber les voies de signalisation NF-κB/ Protéines kinases activées par un mitogène (MAPK) et les facteurs de régulation de l'interféron (IRF). Les effecteurs OspG de *Shigella* et GogB de *Salmonella* sécrétés par des SST3 préviennent quant à eux la dégradation de l'inhibiteur du facteur nucléaire kappa B (IκB) afin de prévenir la translocation de NF-κB au noyau (Kim, Lenzen et al. 2005, Sweet, Conlon et al. 2007, Pilar, Reid-Yu et al. 2013). Les facteurs de virulences "TIR domain-containing proteins" d'*Escherichia coli* et *Brucella melitensis* peuvent même lier directement MyD88 et limiter la réponse inflammatoire (Cirl, Wieser et al. 2008). Le récepteur d'intimine transloqué (TIR) des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) peut également recruter les phosphatases contenant le domaine de la région d'homologie Src 1 et 2 (SHP-1 et SHP-2) pour inhiber l'activation de TRAF6 et la production de cytokines proinflammatoires (Yan, Wang et al. 2012, Yan, Quan et al. 2013). Similairement, la protéine de virulence CagA de *H. pylori* permet l'activation de SHP-2. Cela entraîne la déphosphorylation du transducteur de signal et activateur de transcription 1 (STAT1) et du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) menant ainsi à l'inhibition de la production de la bêta-défensine humaine 3 (hBD3). Certains virus agissent également au niveau post-transcriptionnel en limitant le transport des ARN messagers de l'interféron alpha/bêta (IFN-α/β) ou en déstabilisant les ARN messagers pro-inflammatoires (Mogensen, Melchjorsen et al. 2004).

Les microorganismes pathogènes peuvent également entraîner une réponse anti-inflammatoire limitant l'activation des phagocytes. Par exemple, *Yersinia* utilise son facteur de virulence V pour stimuler la production d'IL-10 en activant le TLR2 (Sing, Rost et al. 2002). Un facteur de virulence similaire, Vi, retrouvé chez *Salmonella enterica* Typhi exercerait un effet immunsupresseur qui serait essentiel à sa dissémination (Raffatellu, Chessa et al. 2006). Le parasite *Toxoplasma gondii* induit également une réponse IL-10 anti-inflammatoire en activant STAT3 et en limitant l'activation de MAPK et la production d'IL-12 (Kim, Del Rio et al. 2005). Une diminution similaire de la production d'IL-12 a également été remarquée lors d'infections par *L. mexicana* qui dégrade I κ B et NF- κ B (Cameron, McGachy et al. 2004). Les virus enveloppés et certains *Trypanosomas* imitent également les cellules apoptotiques des PS à leur surface pour éviter l'activation des phagocytes et entraîner une réponse anti-inflammatoire (Barcinski, Moreira et al. 2003, Amara and Mercer 2015). Plusieurs autres microorganismes pathogènes comme *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, les *Streptococcus* du groupe B et *Staphylococcus aureus* engagent également des récepteurs inhibant la réponse inflammatoire (Nakayama, Underhill et al. 2007, Slevogt, Zabel et al. 2008, Carlin, Chang et al. 2009, Carlin, Uchiyama et al. 2009, Nakayama, Kurokawa et al. 2012). L'effecteur YopH de *Yersinia* permet également de diminuer la réponse au calcium et de favoriser la production d'IL-10 en s'attaquant à la protéine cytosolique lymphocytaire 2 (LCP2 ou SLP-76) des neutrophiles (Rolan, Durand et al. 2013). Certains microorganismes pathogènes favorisent même la reconnaissance par des récepteurs phagocytiques permettant leur survie. Par exemple, *E. coli* lie directement le Fc- γ RIII et entraîne l'activation de SHP-1 qui déphosphoryle la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) afin d'éviter la phagocytose par MARCO qui lui est létal (Pinheiro da Silva, Aloulou et al. 2007). (Figure 1. 3).



Hijacking ITIM-bearing inhibitory receptors:
Various human bacterial pathogens evolved virulence factors that co-ligate inhibitory receptors with recognized activating receptors. This leads to the suppression of several antimicrobial functions and evasion of the host immune response.

Exploiting inhibitory ITAM signaling:
E. coli escapes phagocytosis through low-avidity engagement of Fc_YRs and the induction of inhibitory ITAM signaling. This serves to resist clearing of the bacterial pathogen by the host.

Altering first-line immune functions:
After translocation into the host cell cytoplasm, the ITIM-containing effector protein CagA modulates epithelial defense responses, including IFN- γ signaling. This strategy helps to overcome the first-line inflammatory response.

Dampening TLR signaling:
E. coli inserts the ITIM-bearing virulence factor Tir into the epithelial cell membrane to attenuate first-line TLR responses and pro-inflammatory cytokine release.

Mimicking host protein tyrosine phosphatases:
Salmonella and *Yersinia* developed effector proteins that resemble host phosphatases and target essential signaling intermediates to dampen inflammatory responses and increase survival within the host.

Figure 1. 3 Évasion des signaux pro-inflammatoires

A. Plusieurs microorganismes pathogènes comme *M. catarrhalis*, *N. meningitidis*, les *Streptococcus* du groupe B et *Staphylococcus aureus* engagent des récepteurs inhibant la réponse inflammatoire pour atténuer l'effet la reconnaissance des PRR. B. *E. coli* évite la réponse par MARCO par sa capacité à lier faiblement le Fc γ RIII ce qui entraîne le recrutement de SHP-I qui déphosphoryle PI3K et empêche la phagocytose via MARCO. C. *H. pilory* utilise sa protéine de virulence CagA contenant un motif inhibiteur à base de tyrosine des immunorécepteurs (ITIM) pour activer SHP-2 qui déphosphoryle STAT1 et le EGFR ce qui empêche la signalisation par l'IFN- γ et la production d'hBD3. D. Les EPEC utilisent leur TIR pour recruter SHP-1 et SHP-2 qui inhibent l'activation de TRAF6 et inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires. E. *Salmonella* et *Yersinia* sécrètent respectivement les tyrosine phosphatases SptP et YopH. SptP permet l'inhibition de la dégranulation des mastocytes, tandis que YopH s'attaque à l'adaptateur SLP-76 des neutrophiles. Cela entraîne une diminution de la réponse au calcium et une augmentation de la production d'IL-10. Libre d'accès (Van Avondt, van Sorge et al. 2015).

Les bactéries et les virus ne sont pas contre pas les seuls microorganismes aptes à éviter la réponse inflammatoire de leurs hôtes. Les parasites eucaryotes évolutivement plus rapprochés de la *Leishmania* comme *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium* modifient tous la réponse inflammatoire afin de promouvoir leur survie intracellulaire. *T. cruzi* peut se débarasser des anticorps le recouvrant afin d'éviter la reconnaissance par le Fc γ R (Schmunis, Szarfman et al. 1978). Il peut imiter les cellules apoptotiques en exposant les phosphatidyl sérine afin de limiter la réponse pro-inflammatoire (Damatta, Seabra et al. 2007). *T. cruzi* peut induire une réponse anti-inflammatoire par sa cystéine protéinase cruzipain en favorisant le relâchement de TGF-B et d'IL-10 (Stempin, Giordanengo et al. 2002). Sa mucine à ancre GPI AgC10 inhibe également la sécrétion du TNF en bloquant l'activité de p38 MAPK (Alcaide and Fresno 2004). TgIST, une protéine des granules denses de *T. gondii* limite la transcription par STAT1 en liant son dimère activé et en empêchant son recyclage au cytoplasme, ce qui limite les cycles de transcription additionnels (Gay, Braun et al. 2016). TgIST lie également le complexe modifiant la chromatine Mi2/NuRD ce qui bloque la transcription dépendante de l'IFN- γ (Olias, Etheridge et al. 2016). *T. gondii* limite l'activation et la translocation au noyau de NF- κ B en diminuant la phosphorylation de p65/RelA et en limitant la dégradation d'I κ B α (Shapira, Harb et al. 2005). *T. gondii* combat également la réponse pro-inflammatoire de type I grâce à GRA18 qui induit l'expression des gènes dépendants de la B-caténine associés à la réponse anti-inflammatoire (He, Brenier-Pinchart et al. 2018).

1. 3 La maturation du phagosome

Une fois la particule ou l'agent pathogène internalisé, le nouveau phagosome subira un processus de maturation à travers une série d'interactions subséquentes avec les endosomes précoce, les endosomes tardifs et finalement les lysosomes.

Le phagosome précoce débute sa maturation par des évènements de fusions multiples avec les endosomes précoce régulés par l'activité de la GTPase Rab5 et ses effecteurs, les antigène des endosomes précoce 1 (EEA1), le complexe p150-hVPS34 et les récepteur solubles de la protéine d'attachement du facteur sensible au N-éthylmaléimide (SNAREs) (Desjardins, Huber et al. 1994, McBride, Rybin et al. 1999, Duclos, Diez et al. 2000, Vieira, Botelho et al. 2001). hVPS34, une phosphatidylinositol-3-kinase de classe III, génère les phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) nécessaires pour l'ancrage des protéines participant à la maturation du phagosome (Vieira, Botelho et al. 2001). Les PI3P permettent notamment l'ancrage de EEA1 et de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH) à la face cytosolique de phagosome (Gaullier, Simonsen et al. 1998, Kanai, Liu et al. 2001). EEA1 interagit avec Rab5 et avec les SNAREs comme syntaxine 13 (Stx13) et l'ATPase NSF responsable du désassemblage et de la réutilisation des complexes de SNAREs ce qui permet l'ancrage des endosomes précoce aux phagosomes (Callaghan, Nixon et al. 1999, McBride, Rybin et al. 1999, Lawe, Patki et al. 2000, Mills, Urbe et al. 2001). Le recrutement de la V-ATPase permet l'acidification du phagosome jusqu'à un pH de 6.1 à 6.5 (Mukherjee, Ghosh et al. 1997). Lors de la maturation de la protéine d'enrobage 1 (COPI), le facteur de ribosylation de l'ADP (Arf) et Rab11A permettent le recyclage des protéines à la membrane plasmique (Botelho, Hackam et al. 2000, Leiva, Pavarotti et al. 2006).

Pour maturer, le phagosome peut également entraîner la dégradation de cargos membranaires en formant des vésicules intraphagosomales. Les protéines membranaires à dégrader sont ubiquitinées et associées aux complexes de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT) (Lee, Kim et al. 2005). Les phosphatidylinositol-(3,5)-biphosphate générés par la phosphoinositide kinase contenant un domaine FYVE PIP5K3 sont possiblement essentiels à cette dégradation par leur interaction avec ESCRTIII du complexe ESCRT (Whitley, Reaves et al. 2003).

Rab5 est par la suite remplacé par Rab7, présumément suite à la fusion dirigée des phagosomes naissants avec les endosomes tardifs pour former le phagosome tardif. L'accumulation de Rab7 à la surface du phagosome entraîne le recrutement de protéines lysosomales interagissant avec Rab (RILP) liant le complexe dynéine-dynactine qui offre de meilleurs contacts avec les microtubules et augmente les évènements de fusion avec les endosomes tardifs (Bucci, Thomsen et al. 2000, Jordens, Fernandez-Borja et al. 2001, Harrison, Bucci et al. 2003). De plus en plus de V-ATPase sont également accumulées au phagosome entraînant une acidification jusqu'à un pH de 5.5 à 6.0 (Desjardins, Huber et al. 1994).

Finalement, le phagosome fusionne avec les lysosomes pour former le phagolysosome. Le tout est accompagné d'une augmentation du recrutement de la V-ATPase, causant une acidification jusqu'à un pH microbicide pouvant atteindre 4.5 et d'une accumulation d'agents microbicides comme les cathepsines. Le phagolysosome peut également être différencié des phagosomes tardifs par leur manque d'acide lysobisphosphatidic (LBPA) et de PI(3)P ainsi que par l'absence du récepteur du mannose-6-phosphate (Griffiths, Hoflack et al. 1988, Kobayashi, Stang et al. 1998, Gillooly, Morrow et al. 2000).

Plusieurs théories existent concernant la maturation du phagosome, accordant un rôle ou non au réticulum endoplasmique. Un modèle en particulier, le "kiss-and-run" implique une série de fusions partielles et transitoires entre le phagosome et les différentes composantes de la voie endocytique (Desjardins 1995). Une des protéines clés à cette fusion partielle est Rab5 dont le mutant constitutivement actif (Rab5(Q59L)) entraîne une fusion incontrôlée, causant la formation de phagosomes géants possédant le marqueur des lysosomes (LAMP1), mais ne possédant pas les conditions microbicides nécessaires à la destruction des parasites intracellulaires (Duclos, Diez et al. 2000) (Figure 1. 4).

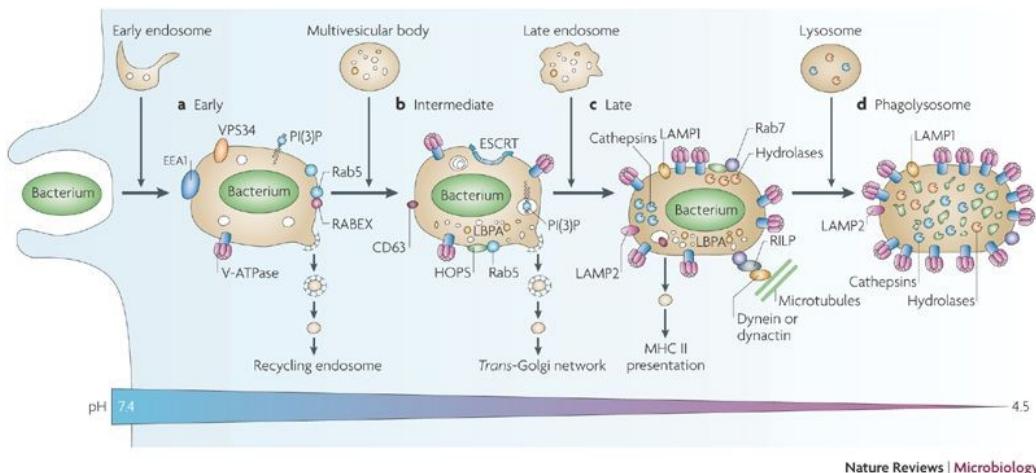


Figure 1. 4 Maturation du phagosome

Représentation des stades de maturation du phagosome précoce (a), intermédiaire (b) et tardif (c) culminant en la formation du phagolysosome (d). Reproduit avec la permission de "Springer Nature" (Flannagan, Cosio et al. 2009).

1. 3. 1 Facteurs microbicides du phagosome

Tout au long de sa maturation, le phagosome acquiert divers agents microbicides qui entraînent, une fois le processus complété, la destruction de la particule ou du microorganisme pathogène phagocyté. Parmi ces facteurs microbicides, on retrouve l'acidification graduelle par la V-ATPase, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la NADPH oxydase et de la génération d'oxyde nitrique (NO) par iNOS. Le phagosome possède également des propriétés bactériostatiques en limitant l'accessibilité du Fe²⁺, Zn²⁺ et Mn²⁺ par la lactoférine et la protéine 1 de macrophage associée à la résistance naturelle (NRAMP1). Ses propriétés bactéricides proviennent de la perméabilisation de la membrane par les défensines et cathelicidines. Finalement, le phagosome peut causer l'hydrolyse des sucres par les lysozymes, β-hexosaminidase et β-glucuronidase, des lipides par la phospholipase A2 et des protéines par les cathepsines (Flannagan, Cosio et al. 2009)(Figure 1. 7).

1. 3. 2 La V-ATPase

La H⁺-ATPase de type vacuolaire (V-ATPase) est un complexe composé de deux domaines, le domaine V₁ situé à l'extérieur du phagosome hydrolysant l'ATP pour produire des protons et le domaine V₀ transmembranaire responsable de la translocation au phagosome.

Le domaine V₁ soluble est composé d'un hexamère alternant de sous-unités A et B hydrolysant l'ATP, des sous-unités centrales D et F et des sous-unités périphériques C, E, G et H se connectant directement avec le domaine V₀. L'ancrage du domaine V₁ au domaine V₀ est facilité notamment par la capacité des sous-unités B et C de se lier à l'actine, la sous-unité C étant à elle seule capable de stabiliser les filaments d'actines.

Le domaine V₀ est quant à lui composé des sous-unités a, c, c', c'', d et e dont les sous-unités c, c' et c'' sont arrangées en anneaux d'un minimum de 6 sous-unités. Au niveau mécanistique, la V-ATPase est divisée en deux: la partie rotor et la partie stator. Le rotor est composé des sous-unités D et F, ainsi que de l'anneau de sous-unités c, c' et c'', tandis que le stator est formé par le restant des sous-unités.

L'hydrolyse de l'ATP entraîne la rotation de la partie rotor et le transfert des H⁺ dans deux canaux à travers la membrane par interaction avec les sous-unités c (Beyenbach and Wieczorek 2006, Cipriano, Wang et al. 2008) (Figure 1. 5). L'acidification, en plus d'empêcher directement la croissance microbienne, permet l'activation de plusieurs enzymes hydrolytiques comme les cathepsines. Elle permet le recrutement d'ARF6 et cytohesin 2. L'acidification est également essentielle pour l'assemblage du complexe COPI (Aniento, Gu et al. 1996, Hurtado-Lorenzo, Skinner et al. 2006, Pungercar, Caglic et al. 2009). Le domaine V₁ peut être dissocié du complexe par interaction de la sous-unité C avec les microtubules lors d'un stimulus comme l'acidification des phagosomes (Sumner, Dow et al. 1995, Xu and Forgac 2001, Tabke, Albertmelcher et al. 2014). Les cellules dendritiques contrôlent notamment la dissociation de la V-ATPase pour obtenir un niveau d'acidification idéal pour la présentation antigénique (Trombetta, Ebersold et al. 2003). Le domaine V₀ de la V-ATPase joue quant à lui un rôle lors des évènements de fusions membranaires. Suite à la formation du complexe trans-SNARE, le domaine V₀ stabilise les membranes opposées en formant un complexe de V₀ situé sur les deux membranes liant la calmoduline qui contrôle l'étape terminale de la fusion membranaire (Peters, Bayer et al. 2001, Bayer, Reese et al. 2003, Zhang, Wang et al. 2008). Une sous-unité du domaine V₀, l'ATP6V₀d2, possède également des propriétés anti-inflammatoires vis-à-vis l'activation par la voie du TLR4, soit la réponse au LPS (Murase, Kawasaki et al. 2018, Xia, Liu et al. 2019). Cette même sous-unité est également importante à l'homéostasie du cholestérol en favorisant sa rétention (Pessoa, Reis et al. 2019).

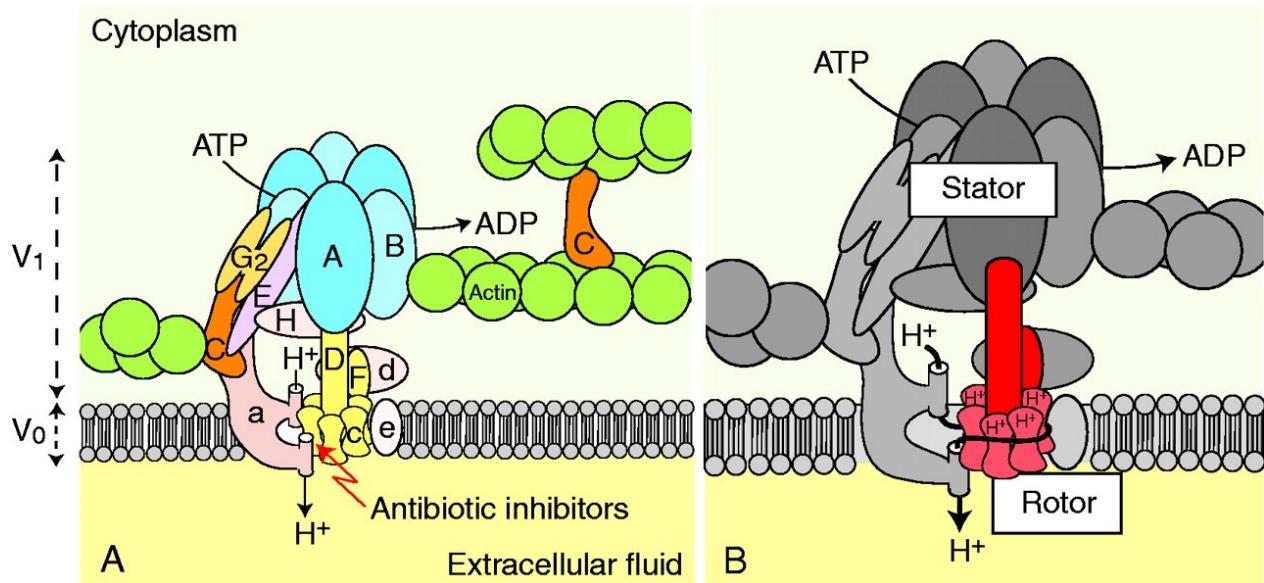


Figure 1.5 La V-ATPase

Représentation du modèle moléculaire (A) et mécanistique (B) de la V-ATPase consistant d'un domaine V₀ composé d'au moins 4 sous-unités différentes (a, c, d et e) où les sous-unités c, c' et c'' forment un anneau rotor capable d'entraîner le transfert de proton à la lumière par sa rotation et d'un domaine V₁ composé de huit sous-unités de A à H. Le tout étant lié à l'actine par la sous-unité B. Reproduit avec la permission de "The company of Biologists" (Beyenbach and Wieczorek 2006).

1. 3. 3 NADPH oxydase

La NADPH oxydase 2 (NOX2) est un complexe de sous-unités composé d'un hétérodimère transmembranaire de gp91^{phox} et p22^{phox} (cytochrome b558) qui, une fois activé par Rac 1 et Rac2, recrute la partie cytosolique composée de p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} (Ambruso, Knall et al. 2000, Zhao, Carnevale et al. 2003, Panday, Sahoo et al. 2015). Ce complexe permet le transfert d'électrons à la lumière du phagosome relâchant de l'oxygène (O_2^-) qui permettra la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pouvant générer des radicaux hydroxyles et de l'oxygène singulet en interagissant avec l' O_2 ou être convertie en acide hypochlorique et en chloramines par la myeloperoxidase (Shepherd 1986, Quinn and Gauss 2004, Minakami and Sumimoto 2006). Ces ROS entraînent la mort des microorganismes phagocytés en endommageant leurs protéines et leur ADN par oxydation (Figure 1.6).

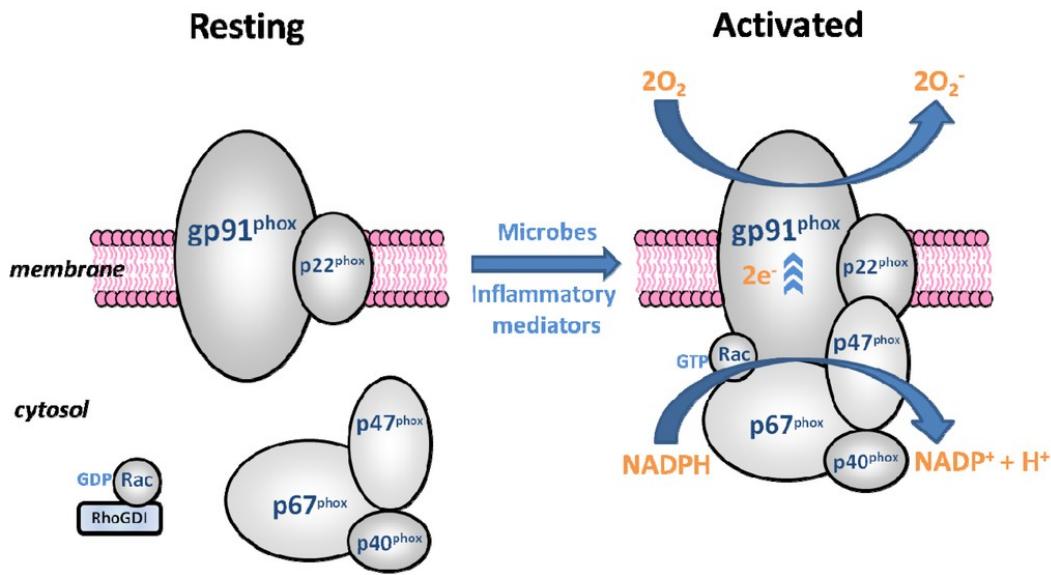


Figure 1. 6 La NADPH oxydase

Représentation de la NADPH oxydase au repos où les composantes cytosolique p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} ne sont pas recrutées et où la sous-unité catalytique gp91^{phox} forme le flavocytochrome b558 avec p22^{phox} à la membrane. Sous sa forme activée, la composante cytosolique est recrutée et peut permettre la production de superoxyde ROS (O₂⁻) en acceptant des électrons de la NADPH cytosolique et en fournissant de l'oxygène (O₂). Libre d'accès (McCann and Roulston 2013).

1. 3. 4 iNOS

iNOS est la version inducible de la synthase de l'oxyde nitrique (NOS) qui est induite suite à un stimulus comme le LPS (Cinelli, Do et al. 2020). Elle produit de l'oxyde nitrique et de la citrulline à partir d'oxygène et de L-arginine. Elle fonctionne sous forme d'homodimère où une sous-unité transfère des électrons de la NADPH au FAD. Les électrons sont ensuite transférés au mononucléotide flavine (FMN) et à un hème de fer de la sous-unité adjacente (Stuehr 1999). L'oxyde nitrique est formé du côté cytoplasmique du phagosome et peut passer à la lumière du phagosome par simple diffusion (Webb, Harvey et al. 2001). Une fois rendu au phagosome, le NO peut exercer directement ses effets antimicrobiens ou réagir avec les ROS pour former des espèces azotées réactives (RNS) hautement toxiques comme le dioxyde d'azote (NO₂), le peroxynitrite (ONOO⁻), le trioxyde de diazote (N₂O₃), le complexe de fer dinitrosyle, les nitrosothiols et le nitroxyle (HNO) (Fang 2004). Les RNS agissent similairement et en synergie avec les ROS pour endommager les protéines et l'ADN des microorganismes phagocytés (Wink, Kasprzak et al. 1991, De Groote and Fang 1995).

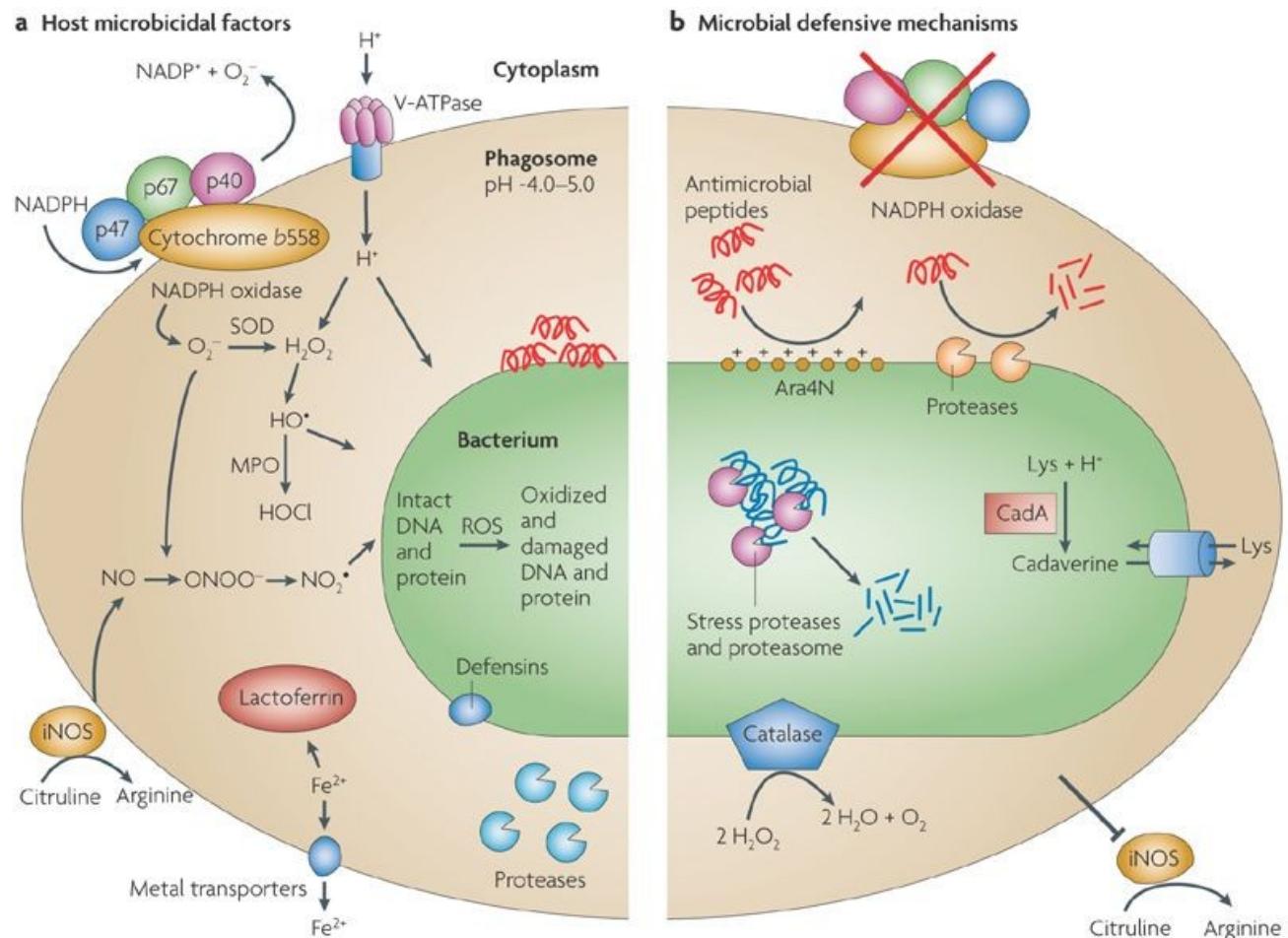
1. 3. 5 Survivre au phagosome

En plus d'éviter l'activation cellulaire, les microorganismes pathogènes intracellulaires ont dû évoluer afin de survivre au phagosome et aux agents microbicides de leurs cellules hôtes. Les cibles employées par ces agents pathogènes sont souvent évolutivement conservées. L'étude d'une multitude de microorganismes pathogènes intracellulaires peut ainsi donner des indices concernant les mécanismes possiblement employés par *Leishmania*. La section suivante décrit des stratégies employées par une diversité de microorganismes pathogènes afin de survivre à l'intérieur du phagosome. Les modifications du phagosome entraînées par *Leishmania* seront discutées à la section 2 de la revue de littérature.

Pour survivre au phagosome, les microorganismes pathogènes ont développé des mécanismes leur permettant d'éliminer les agents microbicides ou de leur survivre. Par exemple, le gène Rv3671c de *Mycobacterium tuberculosis* permet à la bactérie de préserver son pH intrabactérien, tandis que la lysine décarboxylase de *Salmonella typhimurium* permet de maintenir l'homéostasie du pH intracellulaire (Park, Bearson et al. 1996, Vandal, Pierini et al. 2008). Certains microorganismes pathogènes utilisent la catalase ou des réductases comme celle d'*E. coli* et de *M. tuberculosis* pour neutraliser les ROS et RNS, tandis que d'autres empêchent directement le recrutement de la NADPH oxydase ou iNOS à leurs phagosomes comme *Anaplasma phagocytophila* et *Mycobactérium* (St John, Brot et al. 2001, Mott, Rikihisa et al. 2002, Ng, Cox et al. 2004, Davis, Vergne et al. 2007) (Figure 1. 7). Pour obtenir le fer nécessaire à leur développement, les microorganismes pathogènes peuvent empêcher son efflux en le capturant et le séquestrant grâce à leurs sidérophores (Luo, Fadeev et al. 2005). Ils peuvent également transporter et entreposer le fer nécessaire à leur survie (Robey and Cianciotto 2002, Velayudhan, Castor et al. 2007).

Plusieurs microorganismes pathogènes bloquent la maturation du phagosome ou le modifient afin de créer un organelle favorable à leur développement. *M. tuberculosis* bloque la fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes(Pieters 2008). *Legionella pneumophila* ralentit le développement des phagosomes en recrutant des vésicules du réticulum endoplasmique pour gagner le temps nécessaire à son adaptation à l'environnement acidique (Isberg, O'Connor et al. 2009).

Similairement, *Coxiella burnetii* ralentit le développement des phagosomes en recrutant les autophagosomes ce qui lui permet d'acquérir les éléments nécessaires à sa survie, tandis que *Listeria monocytogenes* entraîne la rupture du phagosome et son relâchement dans le cytoplasme (Ghigo, Colombo et al. 2012, Bierne, Milohanic et al. 2018)(Figure 1. 8).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 1.7 Les agents microbicides et comment s'en échapper

A. Les mécanismes microbicides disponibles aux phagosomes sont la NADPH oxydase NOX2, iNOS, les récepteurs du fer comme la lactoferrine et NRAMP1 en plus de peptides antimicrobiens et de protéines perméabilisant la bactérie phagocytée. B. Les bactéries possèdent de nombreux moyens pour survivre en permettant la résistance ou la destruction des peptides antimicrobiens par la modification de leur surface ou par l'expression d'enzymes comme la catalase qui peut convertir les RNS et ROS ou empêcher le recrutement des protéines responsables de leur formation. Reproduit avec la permission de "Springer Nature" (Flannagan, Cosio et al. 2009).

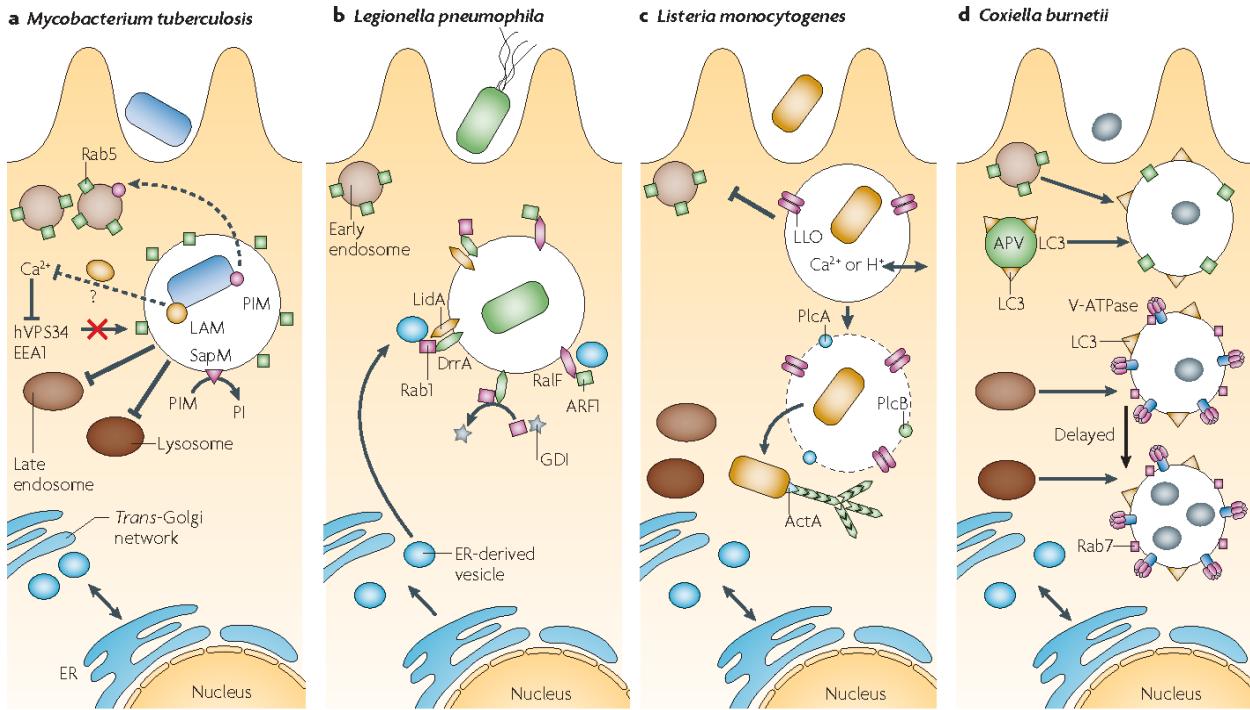


Figure 3 | Stratégies utilisées par les bactéries intracellulaires professionnelles pour moduler la maturation du phagosome.

Figure 1.8 Stratégies de modulation du phagosome

A. Suite à sa phagocytose, *M. tuberculosis* inhibe la maturation du phagosome grâce à ses effecteurs PIM, LAM et SapM. B. *L. pneumophila* empêche la fusion de sa vacuole avec les compartiments endolysosomaux et favorise la fusion avec le réticulum endoplasmique. C. *Listeria monocytogenes* sécrète la listeriolysine O (LLO) et deux phosphatase PlcA et B qui entraînent la lyse du phagosome et la libération de la bactérie dans le cytoplasme. D. *C. burnetii* entraîne une maturation retardée du phagosome essentielle à sa survie en fusionnant avec des vésicules autophagocytiques LC3 positives. Reproduit avec la permission de "Springer Nature" (Flannagan, Cosio et al. 2009).

Les parasites eucaryotes *T. cruzi* et *T. gondii* résident quant à eux temporairement à l'intérieur de vacuoles parasitophores (PV). Pour *T. cruzi*, la fusion de la vacuole parasitophore avec les lysosomes permettant l'acidification de celle-ci est une étape essentielle pour la maturation du parasite (Andrade and Andrews 2004). En effet, une PV acide est nécessaire pour la transformation du trypomastigote en amastigote (Tomlinson, Vandekerckhove et al. 1995, Pessoa, Ferreira et al. 2016). Par l'action de Tc-Tox qui induit des pores dans la membrane de la PV, l'amastigote est libéré dans le cytoplasme où il se multiplie (Andrews, Abrams et al. 1990). *T. cruzi* peut envahir les cellules de son hôte activement ou passivement par endocytose par une multitude de mécanismes qui influencent directement la maturation des vacuoles parasitophores (Batista, Najera et al. 2020).

La vacuole parasitophore de *T. cruzi* est formée à partir de membranes du réticulum endoplasmique et des lysosomes et réside à proximité des mitochondries et du Golgi sans toutefois fusionner avec eux (Reignault, Barrias et al. 2014, Reignault, Alcantara et al. 2019). Similairement à *T. cruzi*, *T. gondii* peut forcer son entrée dans les cellules de son hôte. Par contre, la vacuole parasitophore de *T. gondii* ne fusionne pas avec les éléments du système endocytique et évite ainsi l'acidification et la destruction par les lysosomes (Morisaki, Heuser et al. 1995, Mordue, Desai et al. 1999, Charron and Sibley 2004). La vacuole parasitophore de *T. gondii* est majoritairement dérivée de la membrane plasmique, mais elle fusionne également avec des vésicules sécrétées de son Rhoptrie par le parasite dans le cytoplasme avant son internalisation (Suss-Toby, Zimmerberg et al. 1996, Mordue, Desai et al. 1999, Hakansson, Charron et al. 2001). La PV de *T. gondii* réside à proximité du réticulum et des mitochondries où le parasite se multiplie avant d'entraîner la lyse de sa vacuole parasitophore et de s'échapper de la cellule (Melo and de Souza 1997, Pernas, Adomako-Ankomah et al. 2014, Clough and Frickel 2017).

1. 4 Biogenèse du phagosome et fusion membranaire

La maturation des phagosomes et la formation des phagolysosomes sont donc dépendantes d'une importante série de fusions membranaires. Les SNAREs sont des petites molécules dirigeant la fusion membranaire et agissant à l'étape finale de la fusion des membranes opposées (Sollner, Whiteheart et al. 1993, McNew, Parlati et al. 2000, Hu, Ahmed et al. 2003). Ces protéines sont exprimées de façon différentielle à travers les différents types cellulaires, mais également d'un organelle à l'autre (Chen and Scheller 2001, Hong 2005) (Figure 1. 9). Les protéines membranaires associées aux vésicules 3,7 et 8 (VAMP3, VAMP7 et VAMP8) sont des SNAREs qui jouent un rôle lors de la formation du phagosome, tandis que Stx7 et Stx13 jouent un rôle lors de la maturation du phagosome (Bajno, Peng et al. 2000, Collins, Schreiber et al. 2002, Braun, Fraisier et al. 2004, Ho, Cai et al. 2008). Plus précisément, les SNAREs VAMP7 et VAMP8 permettent la fusion membranaire entre les endosomes tardifs, tandis que VAMP7, VAMP8, Stx7 et Stx8 permettent la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes lors de la maturation du phagosome (Harrison, Bucci et al. 2003, Luzio, Pryor et al. 2007).

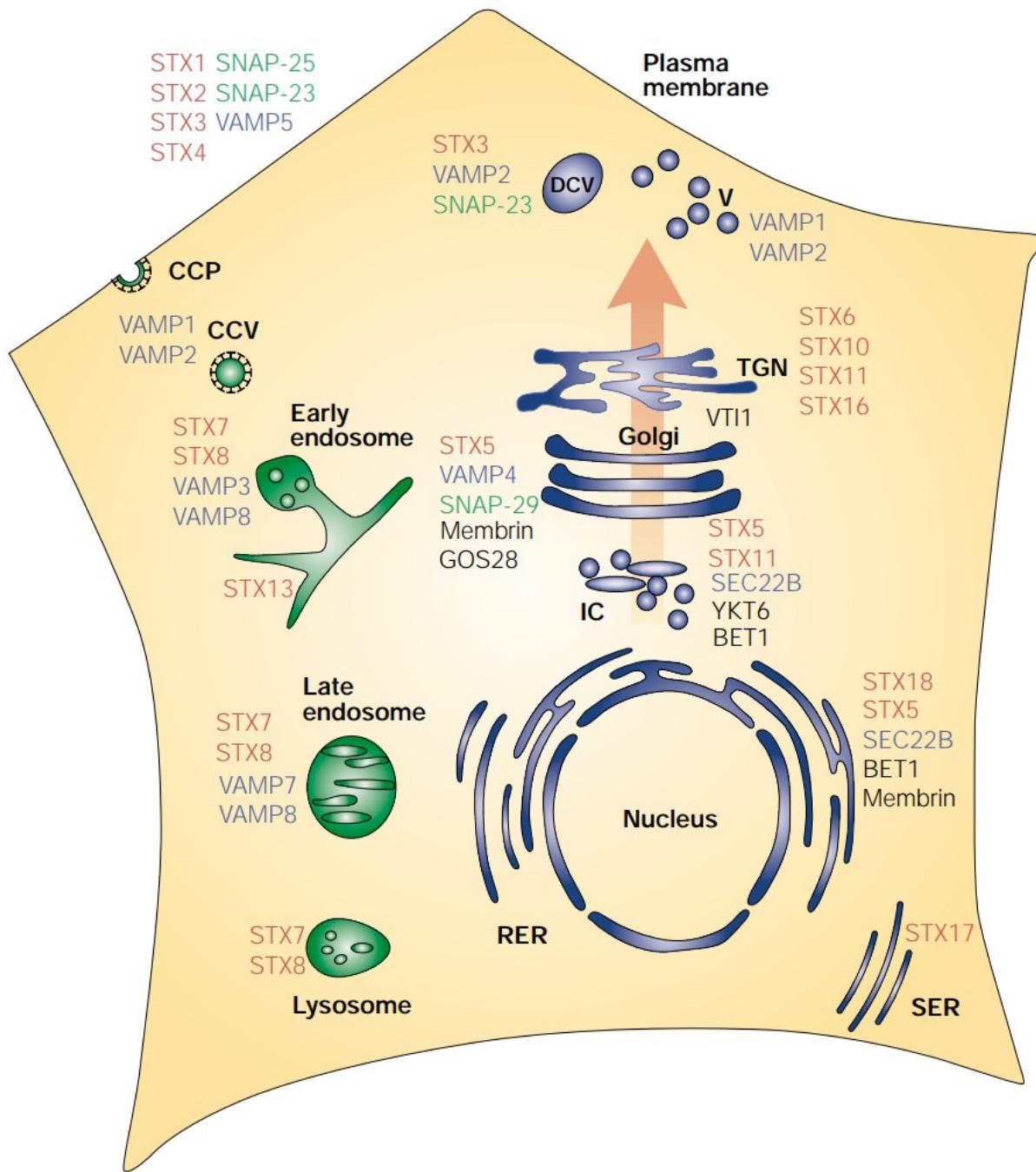


Figure 1.9 Distribution des SNAREs

Représentation de la distribution des SNAREs dans les différents compartiments membranaires. Puits recouverts de clathrine (CCP), vésicules recouvertes de clathrine (CCV), vésicules à noyau dense (DCV), compartiment intermédiaire (IC), réticulum endoplasmique rugueux (RER), réticulum endoplasmique lisse (SER), vésicule (V) et réseau trans-Golgi network (TGN). Reproduit avec la permission de "Springer Nature" (Chen and Scheller 2001).

1. 4. 1 Le fonctionnement des SNAREs

Les SNAREs sont fonctionnellement catégorisées en tant que v-SNARE et t-SNARE selon leur localisation sur les vésicules ou sur les membranes cibles, tandis qu'elles sont structurellement classifiées comme étant des R-SNARE ou Q-SNARE selon leur résidu arginine ou glutamine au niveau de leur domaine SNARE. Les Q-SNAREs sont également divisées en plusieurs groupes, soit le Qa, Qb et Qb,c (Hong 2005)(Figure 1. 10). Ces protéines fonctionnent en tétramères composés d'une R-SNARE et de trois Q-SNAREs, où chaque protéine fournit un motif SNARE excepté les SNAP (Qb,c) qui en fournissent deux, suite à l'attachement de la vésicule à la membrane cible. Ce tétramère forme un complexe transitoire trans-SNARE servant à rapprocher les deux membranes dont le mouvement en fermeture éclair possède à lui seul le potentiel de les fusionner. Ce complexe devient par la suite cis-trans où la lumière de la vésicule est ouverte et alignée avec la membrane cible. Ensuite, il devient cis-SNARE avant d'être désassemblé par un complexe hexamerique de l'ATPase de fusion vésiculaire (NSF) et trois protéines d'attachement alpha de NSF (α -SNAP) qui rendront les SNAREs immédiatement disponibles pour de subséquents événements de fusion (Yoon and Munson 2018)(Figure 1. 11). La très grande efficacité de ce système rend les "knock-down" de SNAREs peu efficaces puisqu'une quantité résiduelle de 10% est suffisante pour diriger les événements de fusion en plus d'être compensés par une augmentation de la machinerie d'attachement (Bethani, Werner et al. 2009). Les SNAREs possèdent également des rôles redondants ce qui leur permet de préserver les fonctions cellulaires lors de la perte ou du ciblage de l'une d'elles (Wang, Ng et al. 2004). Malgré leur rôle important lors des événements de fusion membranaire, c'est plutôt leur affiliation avec les facteurs d'attachements qui permet le ciblage des vésicules et la spécificité des événements de fusion (Brandhorst, Zwilling et al. 2006, Koike and Jahn 2019).

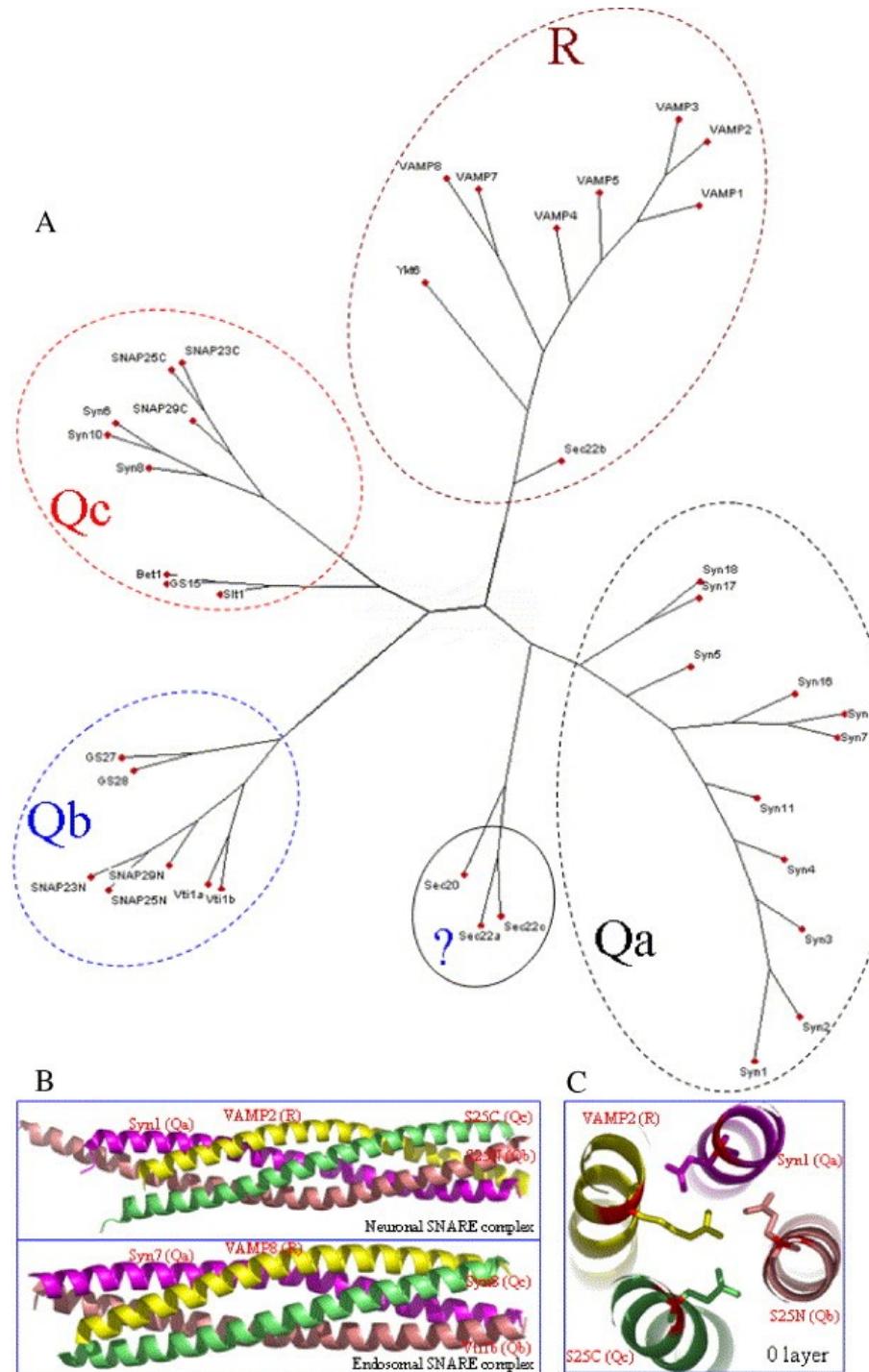


Figure 1.10 Arbre phylogénique des SNAREs

A. Distribution phylogénique des SNAREs en quatre groupes majeurs selon leur résidu arginine ou glutamine au niveau de leur motif SNARE: R/VAMP, Qa/Syn, Qb/S25N et Qc/S25C. B et C sont des représentations 3D et verticales de complexes de SNARE. Reproduit avec la permission de Elsevier (Hong 2005).

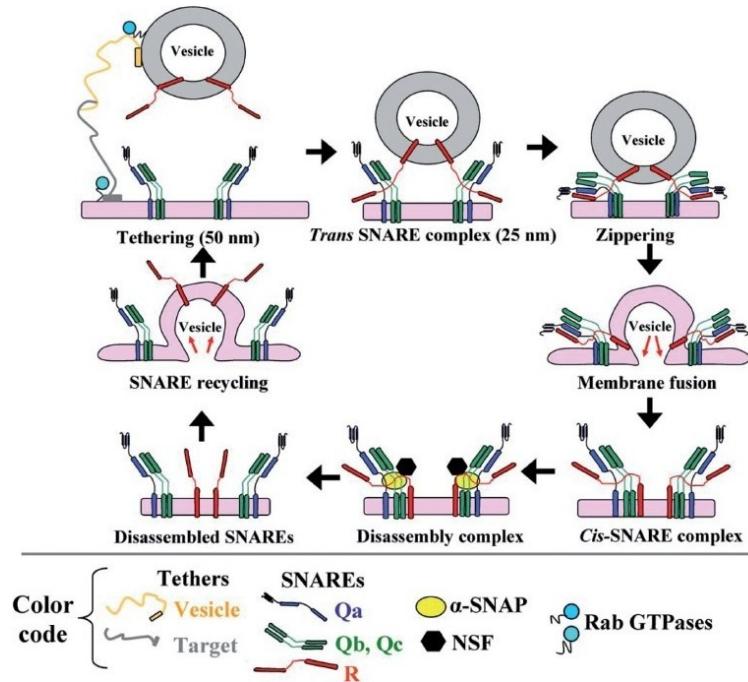


Figure 1. 11 Mode d'action des SNAREs

Lors d'un événement de fusion membranaire effectué par les SNAREs, la vésicule commence par s'attacher à la membrane cible par les facteurs d'attachement comme les Rab et leurs effecteurs. Une hélice alpha d'une SNARE vésiculaire (R-SNARE) et 3 de la membrane cible (Q-SNAREs) forment un complexe Trans-SNARE. Une fois le signal de fusion membranaire reçue (Ca^{2+}), les SNAREs rapprochent les membranes et la fusion membranaire a lieu, formant un complexe Cis-SNARE. Un complexe composé de trois α -SNAP et d'un hexamère de NSF vient par la suite libérer les SNAREs par l'hydrolyse d'ATP, les rendant ainsi disponibles pour de futurs évènements de fusion membranaire. Libre d'accès (Sehgal and Lee 2011).

1. 4. 2 Contrôle de la fusion membranaire

Pour survivre au phagosome, plusieurs microorganismes pathogènes empêchent la formation du phagolysosome. Le contrôle des évènements de fusion membranaire est l'un des nombreux moyens à la disposition des agents pathogènes afin de permettre leur survie intracellulaire. L'interaction des microorganismes pathogènes avec la machinerie de fusion membranaire n'est pas limitée aux SNAREs. Ils peuvent également interagir avec les molécules contrôlant les SNAREs elles-mêmes. La section suivante décrit les nombreux mécanismes à la disposition de la cellule hôte pour contrôler les évènements de fusions membranaire qui pourraient être modifiés par un microorganisme pathogène comme *Leishmania*.

Des multitudes de procédés sont en place afin de contrôler les évènements de fusion membranaire. Les SNAREs peuvent être contrôlées par activation ou inactivation, par la modulation de leur disponibilité ou de façon spatio-temporelle.

Les SNAREs sont activées ou inactivées post-transcriptionnellement par phosphorylation, palmitoylation ou prénylation (Hong 2005). La Q-SNAREs Stx4 (Qa) est phosphorylée et inactivée par la kinase Rab3D, tandis que SNAP23 (Qb,c) est phosphorylée lors de l'activation des cellules immunitaires pour la rendre disponible pour des évènements de dégranulation (Pombo, Martin-Verdeaux et al. 2001, Hepp, Puri et al. 2005). Les SNAREs Ykt6, SNAP25 et Stx11 sont toutes trois palmitoylées pour permettre leur association membranaire et leur activité (Veit, Sollner et al. 1996, Prekeris, Klumperman et al. 2000, Fukasawa, Varlamov et al. 2004). La SNARE Ykt6 est également prénylée ce qui lui confère sa localisation au Golgi (Fukasawa, Varlamov et al. 2004, Hasegawa, Yang et al. 2004).

Plusieurs méthodes ont été répertoriées pour contrôler la disponibilité des SNAREs. Quantitativement, la disponibilité des SNAREs peut être contrôlée par le complexe de recyclage des SNAREs NSF et α -SNAP, les évènements de fusion étant diminués en leur absence (Malsam, Kreye et al. 2008). Conformationnellement, les nombreuses protéines de la famille Sec1/Munc18 (SM) et Munc13/unc-13 contrôlent la fusion membranaire par leurs interactions avec les syntaxines et les complexes de SNAREs (Gerdes 2008). Les SM peuvent soit empêcher les évènements de fusion membranaire en bloquant les syntaxines dans leur conformation fermée, ou diriger la fusion membranaire en liant leur conformation ouverte ou les complexes de SNAREs pour entraîner une plus grande spécificité au transport des membranes (Dulubova, Sugita et al. 1999, Margittai, Fasshauer et al. 2003, Scott, Van Komen et al. 2004, Shen, Tareste et al. 2007). Les SM sont également impliquées lors de la stabilisation et du transport des syntaxines ainsi que lors de l'ancrage des vésicules (Toonen and Verhage 2007). Les Munc13/unc-13 stabilisées par les molécules interagissant avec Rab3 (RIM) interagissent quant à elles avec les syntaxines pour changer leur conformation de fermée à ouverte et entraîner leur disponibilité pour la fusion membranaire notamment en délogeant Munc18 des syntaxines en conformation fermées (Sassa, Harada et al. 1999, Schoch, Castillo et al. 2002, Gerdes 2008).

Compétitivement, la tomosyne forme des complexes non fusogéniques avec les T-SNAREs, tandis que la synaptophysine peut lier la R-SNARE VAMP2 pour empêcher son interaction avec les T-SNAREs (Pobatti, Razeto et al. 2004, Valtorta, Pennuto et al. 2004). Certaines SNAREs peuvent agir comme SNAREs inhibitrices (iSNAREs) (Varlamov, Volchuk et al. 2004) Finalement, les SNAREs peuvent être régulées de manière spatio-temporelle. Les évènements de fusion membranaire sont dirigés par l'activité des Rab et de leurs protéines d'ancre et synchronisés de manière calcium-dépendante par les synaptotagmomes. Les protéines accessoires complexines permettent également l'oligomérisation des SNAREs ce qui aide leur arrangement spatial. En inhibant la fusion membranaire par leur disposition entre la vésicule et la membrane cible, les complexines permettent aussi de synchroniser les évènements de fusion (Gerdes 2008). La simple présence de radeaux lipidiques riches en cholestérol permet également de contrôler la disponibilité des Q-SNAREs en les distançant de leurs régulateurs (Kay, Murray et al. 2006).

1. 4. 3 Membrane plasmique - SNAP23

La SNARE SNAP23 est une protéine essentielle à la survie cellulaire qui est activée suite à une phosphorylation par la kinase I κ B retrouvée chez les cellules immunitaires (Hepp, Puri et al. 2005, Hong 2005, Karim, Zhang et al. 2013, Kaul, Mittal et al. 2015). Elle joue un rôle important au niveau de la sécrétion des surfactants, des chimiokines et cytokines comme le TNF- α et l'IL-6, des transferrines et des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (Chen, Lemons et al. 2000, Abonyo, Gou et al. 2004, Kean, Williams et al. 2009, Frank, Thon et al. 2011, Boddul, Meng et al. 2014, Kubo, Kobayashi et al. 2015). Elle joue également un rôle lors des évènements d'exocytose chez les neutrophiles humains et les mastocytes où elle participe au relâchement des granules et lysosomes (Flaumenhaft, Croce et al. 1999, Martin-Martin, Nabokina et al. 2000, Castle, Guo et al. 2002, Agarwal, Naskar et al. 2019). SNAP23 est aussi importante au transport du TLR4 à la surface membranaire, du transport de la pompe à proton H $^{+}$ -ATPase, ainsi que dans l'adhésion et la migration cellulaire (Banerjee, Li et al. 2001, Veale, Offenhauser et al. 2011, Kinoshita, Sakurai et al. 2019). Elle est également cruciale à la phagocytose et à la maturation du phagosome. (Sakurai, Hashimoto et al. 2012).

1. 4. 4 Les endosomes précoce s - Syntaxine 13

La SNARE Stx13, orthologue de Stx12, se situe aux endosomes précoce s où elle dirige la fusion membranaire en complexe oligomérique avec EEA1 et dirige les évènements de fusion au niveau du phagosome précoce (McBride, Rybin et al. 1999, Collins, Schreiber et al. 2002). En association avec le transporteur A1 à cassette de liaison d'ATP (ABCA1) et Flotillin-1, Stx13 permet d'augmenter la capacité phagocytique des cellules de Tangier (Bared, Buechler et al. 2004). Elle est également essentielle à la maturation des autophagosomes (Lu, Zhang et al. 2013). Elle joue un rôle lors du trafic endosomal et lors du recyclage de la membrane plasmique par endocytose en permettant notamment le recyclage des transferrines (Prekeris, Klumperman et al. 1998). Avec VAMP7 elle régule la livraison des cargos endosomaux aux mélanosomes tandis qu'elle permet la sécrétion des métalloprotéases de la matrice extracellulaire et la formation des lamellipodia durant l'adhésion cellulaire avec VAMP3 et SNAP23 (Kean, Williams et al. 2009, Jani, Purushothaman et al. 2015).

1. 4. 5 Les endosomes de recyclage - VAMP3

VAMP3 est une v-SNARE se retrouvant de façon prépondérante au niveau des endosomes de recyclages à partir desquels elle peut former des complexes avec SNAP-25 et Stx1, SNAP-23 et Stx1 ainsi que SNAP25 et Stx4 (Hong 2005, Hu, Hardee et al. 2007). Plusieurs rôles de VAMP3 ont déjà été identifiés. Le complexe VAMP3-Syb-YKT6 est notamment requis pour la fusion constitutive des vésicules de sécrétions avec la membrane plasmique où, en collaboration avec SNAP-23, VAMP3 participe à la sécrétion d'IL-6 et du TNFa induite par l'IL-1 β (Boddul, Meng et al. 2014, Gordon, Chia et al. 2017). VAMP3 agit à plusieurs étapes au niveau de la migration et l'invasion cellulaire. Avec Stx13 et SNAP23, elle permet l'invasion cellulaire en permettant la sécrétion des métalloprotéinases matricielles essentielles à la dégradation de la matrice extracellulaire (Kean, Williams et al. 2009). Elle médie, avec STX4 et SNAP23, non seulement l'organisation des podosomes et la morphologie cellulaire, mais également le trafic d'intégrines cruciales à la migration cellulaire et à l'adhérence des cellules à la laminine, l'un des constituants majeurs de la lame basale (Luftman, Hasan et al. 2009, Veale, Offenhauser et al. 2011). En collaboration avec STX6, elle régule aussi le recyclage des intégrines et la migration chimiotactique (Riggs, Hasan et al. 2012).

VAMP3 est également un contributeur de membrane lors de la formation des pseudopodes nécessaires à la phagocytose. Elle demeure toutefois non essentielle au processus puisque son absence n'entraîne pas de défaut de phagocytoses et ce, peu importe le récepteur engagé. (Bajno, Peng et al. 2000, Allen, Yang et al. 2002). En condition d'infection, VAMP3 joue un rôle dans la détermination de la morphologie de la vacuole de *Yersinia pseudotuberculosis* en entraînant la formation d'une vacuole LC3 positive à simple membrane (Ligeon, Moreau et al. 2014). En complexe avec Stx6 et Vti1B, elle facilite la xénophagie des *Streptocoques* du groupe A (Nozawa, Minowa-Nozawa et al. 2017). Dans l'infection par *Brucella melitensis*, un autre microorganisme pathogène intracellulaire, VAMP3 n'a aucune influence (Castaneda-Ramirez, Puente et al. 2012).

1. 4. 6 Les endosomes tardifs - VAMP8

VAMP8 est une v-SNARE principalement localisée aux endosomes précoce et tardifs (Hong 2005). En terme de fusion membranaire, VAMP8 contrôle notamment la fusion homotypique des granules et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes en collaboration avec Vti1b. Elle contrôle également la fusion homotypique des endosomes tardifs nécessaire à la fusion subséquente avec les lysosomes en collaboration avec Stx7 (Mullock, Smith et al. 2000, Pryor, Mullock et al. 2004, Furuta, Fujita et al. 2010, Behrendorff, Dolai et al. 2011, Hammel, Wang et al. 2012). VAMP8 joue également un rôle lors de l'exocytose: basolatérale, des granules lytiques suite à une activation antigène spécifique, de l'hexosaminidase et de l'insuline. Elle est aussi importante pour l'exocytose constitutive des cellules HSY, HeLa, des cellules acineuses pancréatiques et pour la régulation du système exocrine (Wang, Ng et al. 2004, Oishi, Arakawa et al. 2006, Lippert, Ferrari et al. 2007, Wang, Shi et al. 2007, Weng, Thomas et al. 2007, Cosen-Binker, Binker et al. 2008, Tiwari, Wang et al. 2008, Loo, Hwang et al. 2009, Okayama, Arakawa et al. 2009, Dressel, Elsner et al. 2010, Zhu, Zhang et al. 2012). VAMP8 facilite la phagocytose (Dai, Zhang et al. 2007). Cette SNARE permet le recrutement de NOX2 aux endosomes ce qui amène le relâchement des antigènes et favorise la présentation antigénique croisée (Matheoud, Moradin et al. 2013, Dingjan, Paardekooper et al. 2017). De plus, à la membrane plasmique, elle facilite l'effet cytotoxique des lymphocytes T (Marshall, Pattu et al. 2015). La perte de VAMP8 peut également être compensée par VAMP3 (Wang, Ng et al. 2004, Tiwari, Wang et al. 2009).

1. 4. 7 Le trans-Golgi - Vt1a

La SNARE Vt1a est localisée au trans-golgi (Hong 2005). Elle contribue au transport rétrograde, des les endosomes précoce et de recyclage jusqu'au réticulum endoplasmique. Elle participe au transport notamment de la toxine shiga, des récepteurs mannose-6-phosphate (MPRs), ainsi que de la toxine du choléra en complexe avec VAMP3, Stx16 et Stx10 ou avec Stx6, Stx16 et VAMP4 (Mallard, Tang et al. 2002, Medigeshi and Schu 2003, Ganley, Espinosa et al. 2008, Emperador-Melero, Huson et al. 2018). Lors du transport rétrograde, Vt1a fonctionne de concert avec les complexes d'attachement du Golgi oligomérique conservé (COG) et la protéine rétrograde associée au Golgi (GARP) (Perez-Victoria and Bonifacino 2009, Bonifacino and Hierro 2011, Laufman, Hong et al. 2013, Climer, Dobretsov et al. 2015). De plus, Vt1a régule la sécrétion en triant et ciblant les cargos au Golgi (Emperador-Melero, Huson et al. 2018). Dans les neurones, Vt1a participe à la génération des vésicules à noyau dense (DCVs) essentielles à leur développement et fonction, en plus de participer au trafic des canaux calciques (Walter, Kurps et al. 2014). Vt1a favorise également le développement des vacuoles de *Coxiella* en collaboration avec VAMP7 et Vt1b (Campoy, Mansilla et al. 2013).

1. 4. 8 Le réticulum endoplasmique - Syntaxine18

Stx18 est une SNARE se retrouvant au niveau du réticulum endoplasmique qui effectue normalement le transport de vésicules entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, mais qui est aussi impliquée lors du transport rétrograde du Golgi au réticulum endoplasmique (Hatsuzawa, Hirose et al. 2000, Hong 2005, Aoki, Ichimura et al. 2009, Iinuma, Aoki et al. 2009). Cette SNARE est impliquée lors de la phagocytose de grandes particules en dirigeant la fusion entre la membrane du nouveau phagosome et le réticulum endoplasmique (Hatsuzawa, Tamura et al. 2006). Stx18 est également déjà connue pour sa médiation des infections au papillomavirus par son interaction avec la protéine mineure de la capsid lors du transport au réticulum endoplasmique (Bossis, Roden et al. 2005, Lariosz, Nguyen et al. 2007). Stx 18 est également un facteur d'élargissement de la vacuole communale de *L. amazonensis* (Canton, Ndjamen et al. 2012).

1. 4. 9 SNARE et pathogenèse

Plusieurs microorganismes pathogènes interagissent avec les SNAREs afin de favoriser leur survie et leur pathogenèse. Le premier est le clivage protéolytique: la neurotoxine de type A de *Clostridium botulinum* clive SNAP25, bloquant ainsi la neurotransmission et causant les symptômes graves du botulisme. La neurotoxine de *Clostridium* clive également VAMP1, VAMP2 et VAMP3 (Pellizzari, Rossetto et al. 1999, Binz 2013). Le deuxième type d'interaction est l'homologie ou le mimétisme: la protéine IncA de *Chlamydia* possède un domaine "SNAREs-like" lui permettant de se lier aux SNAREs et de détourner la membrane nécessaire à la fabrication de sa niche de réplication (Delevoye, Nilges et al. 2008). Le troisième type est par paireage atypique: l'effecteur DrrA de *Legionella pneumophila* est suffisant pour entraîner des événements de fusion dépendants de SNARE non canoniquement complémentaires entre le phagosome et le réticulum endoplasmique en activant la GTPase Rab1 (Arasaki, Toomre et al. 2012). La participation des SNAREs tout au long de la maturation du phagosome en font des cibles de choix pour inhiber la formation du phagolysosome (Figure 1. 12). Plusieurs microorganismes pathogènes intracellulaires survivent et se multiplient non seulement en bloquant les événements de fusion, mais aussi en détournant différentes sources de membrane comme *Coxiella*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Legionella* et *Chlamydia* afin de créer leur propre organelle (Kumar and Valdivia 2009, Campoy, Mansilla et al. 2013). Le développement optimal de la vacuole de *Coxiella burnetii* est dépendante de la SNARE VAMP7 et de ses partenaires de fusion Vt1a et Vt1b (Campoy, Mansilla et al. 2013). VAMP3 et VAMP7 déterminent l'engagement de *Yersinia pseudotuberculosis* à une vacuole contenant LC3 à simple ou à double membrane respectivement (Ligeon, Moreau et al. 2014). *Salmonella* facilite son internalisation par l'activité inositol phosphatase de son effecteur SopB qui permet l'accumulation de phosphatidylinositol-(3)-phosphate et de VAMP8 qui est essentielle à l'invasion des cellules non-phagocytiques par macropinocytose (Dai, Zhang et al. 2007). VAMP7 et sa partenaire Vt1b sont également essentielles à l'internalisation et à la génération de la PV de *T. cruzi* (Cueto, Vanrell et al. 2017).

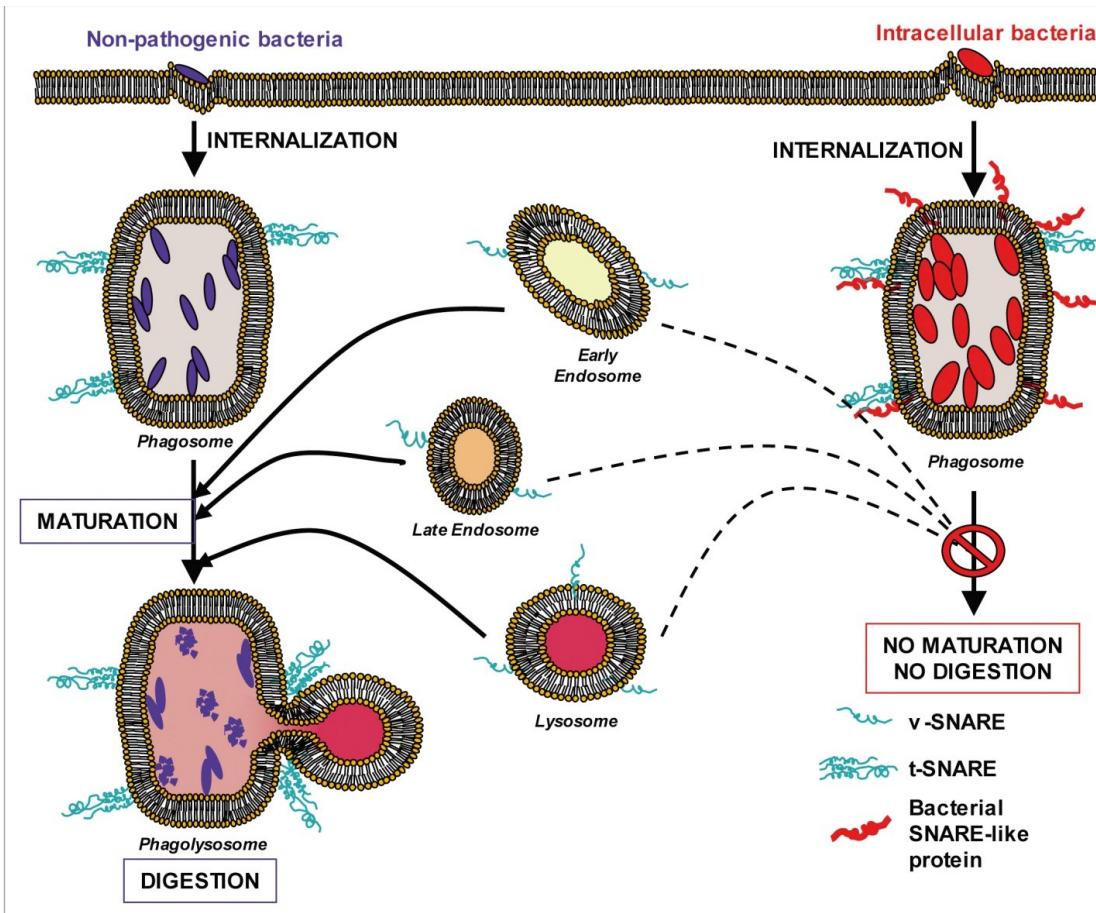


Figure 1. 12 Utilisation des SNAREs pour bloquer la maturation du phagosome

Représentation de microorganismes pathogènes qui bloquent la fusion membranaire et empêchent la maturation complète du phagosome pour survivre et se multiplier, tandis que les phagosomes contenant des microbes avirulents fusionnent avec les lysosomes et entraînent la destruction de ces microbes. Reproduit avec la permission de "Taylor & Francis online Academic Journal" (Wesolowski and Paumet 2010).

1. 5 La présentation antigénique

En plus de permettre la destruction des microorganismes envahissants, l'une des multiples fonctions de la phagocytose est de préparer les antigènes pour la présentation antigénique afin de polariser la réponse immunitaire acquise. La présentation antigénique consiste en la présentation d'antigène du soi au complexe majeur d'histocompatibilités I (CMH-I) ou du non-soi au CMH-II aux lymphocytes T CD8⁺ ou T CD4⁺ respectivement. Les CMH possèdent la capacité de présenter une très grande diversité d'antigènes grâce au très grand polymorphisme des gènes HLA impliqués lors de leur synthèse (Goldberg and Rizzo 2015).

Les cellules dendritiques sont des cellules spécialisées dans ce processus grâce à leur capacité protéolytique limitée par un pH moins acide aux endosomes et phagosomes. Cette diminution d'activité de V-ATPase est couplée à un recrutement aux phagosomes précoces de NOX2. Celui-ci maintient une production faible de ROS alcalinisant le phagosome et entraîne directement l'oxydation des protéases phagosomales (Savina, Jancic et al. 2006). NOX2 réside aux lysosomes sécrétoires qui fusionnent aux phagosomes nouvellement formés sous le contrôle de Rab27A. En absence de NOX2, le phagosome présente une acidification et dégradation des antigènes augmentées qui sont nuisibles à la présentation antigénique (Jancic, Savina et al. 2007). Il est donc essentiel au mécanisme. La présentation antigénique peut également être influencée par les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs) engagés. Les PRR sont composés des TLRs, des récepteurs analogues à NOD (NLR) et des récepteurs de lectine de type C qui reconnaissent des branches d'oligosaccharides à la surface des microorganismes pathogènes et cellules tumorales comme le récepteur du mannose, la molécule d'adhésion intercellulaire spécifique aux cellules dendritiques-3-non-intégrine (DC-SIGN) et de dectin-1 (Zhang, Czabotar et al. 2012, Mantegazza, Magalhaes et al. 2013).

1. 5. 1 CMH-I

Le CMH-I est composé d'une chaîne lourde à transmembranaire encodée par les HLA-A, HLA-B ou HLA-C et d'une chaîne β légère ou β -microbuline. Ces chaînes permettent la présentation d'antigènes de 8 à 9 acides aminés du soi ou du soi modifié par une mutation ou une infection virale aux cellules T CD8 $^{+}$ qui entraîneront la mort des cellules mutantes ou infectées. Ce complexe est exprimé à la surface de toutes les cellules nucléées (Blander 2016, Wieczorek, Abualrous et al. 2017). La préparation des antigènes pour la présentation commence par leur digestion par le protéasome dans le cytoplasme. Les peptides résultants sont par la suite transférés au réticulum endoplasmique par le transporteur associé au traitement des antigènes (TAP) de la famille des transporteurs à cassette de liaison de l'ATP (ABC) (Hinz and Tampe 2012). L'Aminopeptidase-1 (ERAP-1 chez l'humain et ERAAP chez la souris) réduira par la suite la longueur des peptides afin qu'ils puissent être présentés au CMH-I (Saric, Chang et al. 2002, Serwold, Gonzalez et al. 2002) (Figure 1. 13).

TAP participe par la suite à la formation du complexe de chargement de peptides (PLC) en collaboration avec des chaperonnes et deux conjugués tapasin-ERp57 pour charger les peptides aux CMH-I (Dong, Wearsch et al. 2009). Afin de compléter le chargement des peptides, ceux-ci doivent posséder une affinité suffisante au CMH-I pour entraîner la dissociation du PLC (Wearsch and Cresswell 2007). Une fois le peptide stabilisé au CMH-I, celui-ci est transporté jusqu'à la surface cellulaire en passant par le Golgi où il pourra être présenté au récepteur T (TcR) des T CD8⁺ (Blum, Wearsch et al. 2013).

1. 5. 2 CMH-II

Contrairement au CMH-I, l'expression du CMH-II est limitée aux cellules présentatrices d'antigènes et aux cellules B. Ce complexe formé d'un chaîne lourde α transmembranaire et d'une chaîne lourde β transmembranaire encodés par les HLA-DP, HLA-DQ ou HLA-DR permet la présentation d'antigènes exogènes ou de cellules apoptotiques ou nécrotiques d'une longueur de 14 à 15 résidus aux cellules T CD4⁺ (Blum, Wearsch et al. 2013, Goldberg and Rizzo 2015). L'assemblage du complexe s'effectue au réticulum endoplasmique où le CD74, une chaîne invariable chaperonne, bloque la liaison des peptides au réticulum endoplasmique et qui permet d'orienter la livraison du complexe aux compartiments du CMH-II (MIIC), des endosomes tardifs riches en antigènes (Roche and Cresswell 1990, Landsverk, Bakke et al. 2009). Une fois aux MIICs, le CD74 est clivé par la cathepsine B, laissant un fragment CLIP qui continue de bloquer le site de liaison de l'antigène (Roche and Cresswell 1991). Le fragment CLIP est par la suite retiré du complexe par l'activité de HLA-DM qui entraîne un changement de conformation du CMH-II, le libérant pour la liaison à l'antigène (Schulze and Wucherpfennig 2012). Une fois lié à un antigène d'affinité suffisante le CMH-II est transporté à la membrane plasmique où il peut être reconnu par les TcR des cellules T CD4⁺ (Figure 1. 13).

1. 5. 3 La présentation antigénique croisée

Les cellules présentatrices d'antigènes, principalement les cellules dendritiques, peuvent également présenter des antigènes exogènes de microorganismes pathogènes intracellulaires via leur CMH-I dans un processus de présentation antigénique croisée passant par l'une de deux voies.

La première est la voie cytosolique où les antigènes phagocytés sont transportés au cytosol pour dégradation par le protéasome. Les peptides générés sont par la suite transportés au réticulum endoplasmique ou aux compartiments endocytiques, comme le suggère le recrutement de TAP et du CMH-I aux phagosomes, par TAP pour être chargé au CMH-I comme précédemment mentionné.

La seconde voie est la voie vacuolaire indépendante de TAP où la génération de l'antigène et son chargement au CMH-I s'effectuent aux phagosomes (Joffre, Segura et al. 2012). Le phagosome est en fait autosuffisant pour la présentation antigénique croisée (Houde, Bertholet et al. 2003). L'orientation vers l'une ou l'autre voie dépend de la grandeur de la particule à présenter, les petites particules de 0.8 μ m passant par la voie cytoplasmique et les grandes particules de 3 μ m passant par la voie vacuolaire (Mant, Chinnery et al. 2012).

Plusieurs autres mécanismes peuvent également influencer la présentation antigénique croisée. Par exemple, les récepteurs ne se rendant pas aux lysosomes comme le récepteur du mannose, DNGR-1, DEC205 et CD40L peuvent augmenter la présentation antigénique (Blander 2018). La thiolreductase lysosomale induisible par l'interféron- γ (GILT) exprimée aux endosomes et lysosomes est également essentielle au processus (Singh and Cresswell 2010). Plus récemment, plusieurs sous-unités du protéasome ont été retrouvées à la lumière des phagosomes, renforçant le concept du phagosome comme organelle apte à générer les peptides essentiels à la présentation antigénique croisée (Sengupta, Graham et al. 2019). Finalement, les SNAREs Sec22b et VAMP8 régulent toutes deux la présentation antigénique croisée, respectivement en permettant la livraison de la machinerie de chargement peptidique dépendant de TAP et en médiant le recrutement de NOX2 nécessaire au relâchement des antigènes (Cebrian, Visentin et al. 2011, Matheoud, Moradin et al. 2013) (Figure 1. 13).

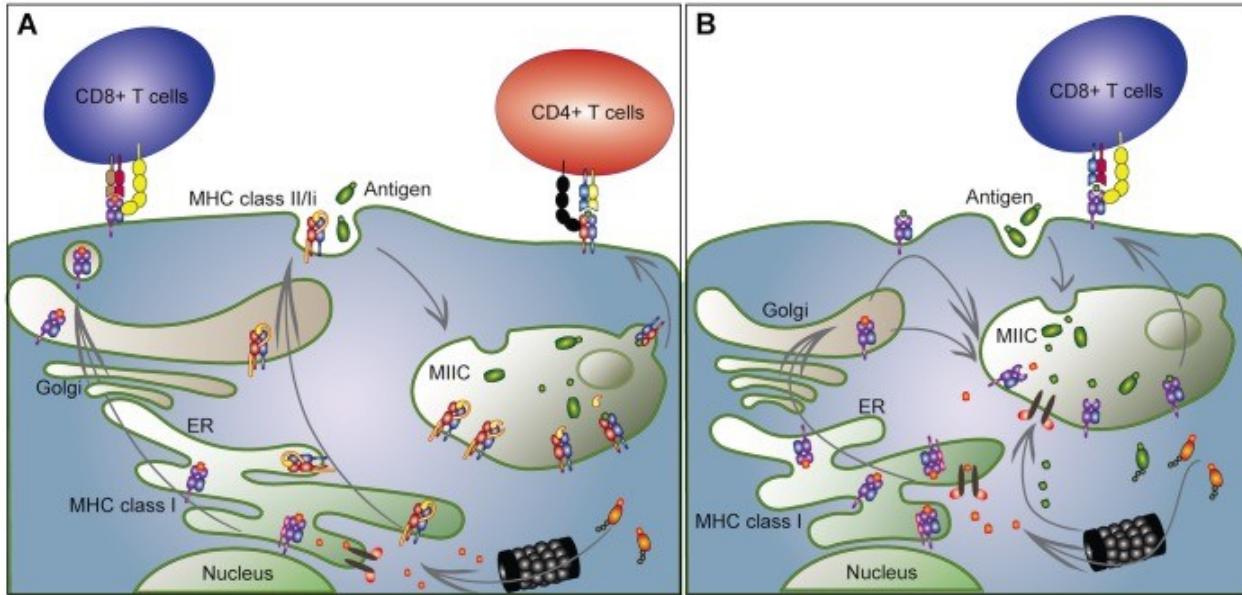


Figure 1. 13 La présentation antigénique

A. Représentation de la présentation antigénique classique où les antigènes du soi transformés par le protéasome sont présentés au CMH-I au réticulum endoplasmique avant d'être expédiés à la membrane plasmique pour être présentés aux cellules T CD8⁺. Les antigènes exogènes sont présentés au CMH-II au MIIC avant d'être expédiés à la membrane plasmique pour être présentés aux cellules T CD4⁺. B. Représentation de la présentation antigénique croisée où les antigènes exogènes transformés soit par le protéasome ou par le phagosome sont présentés aux CMH-I, soit au phagosome ou au réticulum endoplasmique avant qu'ils ne soient envoyés à la membrane plasmique pour être présentés aux cellules T CD8⁺. Libre d'accès (Malmstrom, Jentoft et al. 2013).

2 *Leishmania*

Une grande partie des informations fournies dans cette section provient notamment de la revue de littérature que nous avons écrite en 2016 et qui sera jointe en ANNEXE II.

2. 1 La leishmaniose

Leishmania, un protozoaire intracellulaire obligatoire de la famille des trypanosomes, est le parasite eucaryote transmis par la mouche des sables qui est responsable de la leishmaniose. Avec près de 1 000 000 de nouveaux cas répertoriés, causant près de 30 000 décès annuellement (WHO, 2018), cette maladie tropicale négligée est endémique dans 97 pays. Elle peut être présente sous trois différentes formes selon l'espèce de parasite impliquée, soit sous forme viscérale, cutanée ou muco-cutanée. La forme viscérale, ou kala-azar, est la forme la plus sévère de la maladie où l'on voit la viscéralisation de *L. donovani* ou *L. infantum* dans les ganglions, le foie, la rate et même la moelle osseuse. Les symptômes incluent une fièvre prolongée, une anémie progressive, une hépatosplénomégalie, une hypergammaglobulinémie et une perte de poids pouvant mener à la mort si non traitée. Une réémergence cutanée post kala-azar est parfois observée suite au traitement de cette maladie. La forme cutanée est la forme la plus commune de la leishmaniose, où l'infection par *L. major* et les espèces du complexe de *L. mexicana* causent des plaies nécrotiques sur la peau des personnes atteintes. Cette forme de la maladie peut être persistante ou se guérir d'elle-même après une période de temps pouvant parfois être mesurée en années. La dernière forme, la forme muco-cutanée, entraîne quant à elle une destruction graduelle des muqueuses affectées lors d'infections par certaines souches de *L. braziliensis* et *L. amazonensis* (CDC 2018 Resources for Health Professionals)(Figure 1. 14).

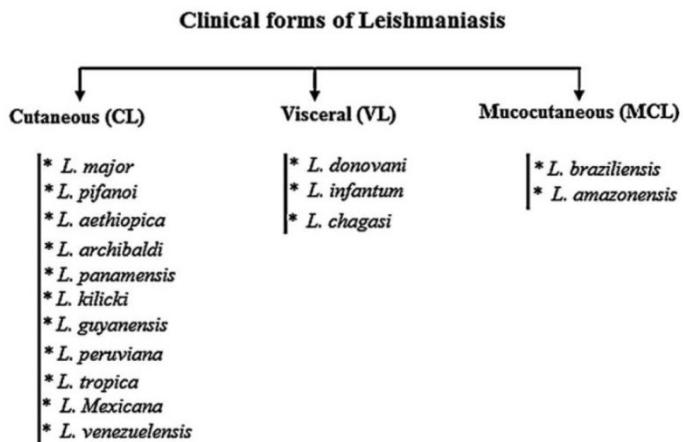


Figure 1. 14 Espèces associées aux différents types de leishmaniose

Distribution des espèces de *Leishmania* selon la forme de la maladie qu'elles entraînent. Reproduit avec la permission d'Elsevier (Singh, Srivastava et al. 2012).

À ce jour, le diagnostic de la leishmaniose demeure difficile, les premiers symptômes de la maladie pouvant prendre jusqu'à un an avant d'apparaître (CDC 2018 Resources for Health Professionals). Cette période d'incubation potentiellement longue entraîne une plus grande difficulté diagnostique pour les personnes infectées ne résidant pas dans une zone endémique où les médecins y sont exposés régulièrement. Le diagnostic efficace nécessite également des équipements de laboratoire souvent indisponibles dans les régions affectées. Les méthodes les plus courantes d'identification sont par microscopie, ainsi que par la méthode de polymérisation en chaîne (PCR) permettant l'identification jusqu'à la souche de parasite impliqué (Akhoundi, Downing et al. 2017). En terme de traitement, les antimoniaux, apparentés à la chimiothérapie, sont le plus souvent utilisés. En plus d'être éprouvants pour les patients, ces traitements sont de moins en moins fonctionnels à cause de l'émergence de résistances chez *Leishmania*. De plus, un vaccin efficace n'est malheureusement toujours pas disponible (Handler, Patel et al. 2015, Rezvan and Moafi 2015). Le développement de méthodes de diagnostic précoce, de traitements efficaces et la mise au point d'un vaccin restent donc toujours d'une importance capitale dans la lutte contre la *Leishmania*.

2. 2 Le cycle de vie

Le cycle de vie de *Leishmania* débute au niveau de son vecteur, la mouche des sables femelle, soit *Phlebotomus* pour le Nouveau Monde (Amérique) et *Lutzomyia* pour le Vieux Monde (Europe et Afrique)(Rogers 2012). Plus précisément, il débute au niveau de l'intestin de l'insecte où la forme promastigote allongée et motile du parasite entreprend sa métacyclogénèse et passera par les phases nectomade (36-60 heures) et leptomonade (7 jours) avant de devenir métacyclique (Gossage, Rogers et al. 2003). La forme métacyclique nouvellement formée migrera le long du tractus digestif de l'insecte jusqu'à l'oesophage, où son accumulation entraîne un blocage. Lors du prochain repas de sang du vecteur, celui-ci régurgite les parasites afin de pouvoir se nourrir adéquatement. Les parasites métacycliques seront par la suite phagocytés par les différents phagocytes de son hôte mammifère. En 24 heures, sous le contrôle d'une augmentation de la température et d'une diminution du pH (Chow, Cloutier et al. 2011), le parasite se transformera en sa forme amastigote, soit petite, ronde et très peu mobile. Ces amastigotes se multiplieront dans des phagosomes modifiés appelés vacuoles parasitophores (PV). Lors d'un repas de sang subséquent par un phlébotome femelle, celui-ci ingérera des phagocytes infectés et le cycle pourra recommencer suite à la transformation des amastigotes en promastigotes (Figure 1. 15).

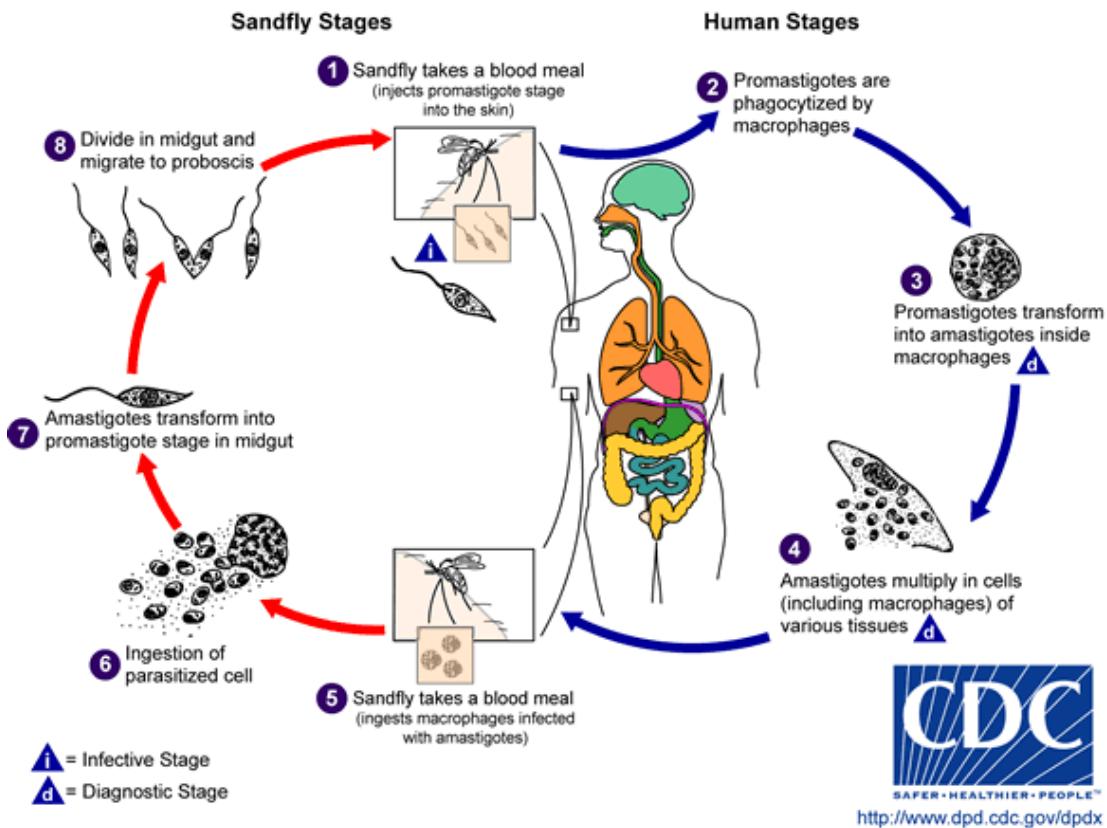


Figure 1. 15 Le cycle de vie de *Leishmania*

Le cycle de vie du parasite *Leishmania* est un cycle complexe impliquant le vecteur phlébotome femelle de la mouche des sables et son hôte mammifère. Libre d'accès (CDC 2019 courtesy of DPDx).

2. 3 Les facteurs de pathogenèse

Afin de permettre sa survie aux environnements hostiles de ses hôtes arthropodes et mammifères, le parasite possède et utilise une multitude de facteurs de pathogenèse. La glycoprotéine 63 (GP63) et le lipophosphoglycan (LPG) sont les deux principaux facteurs de pathogenèse qui seront discutés dans les sections suivantes. Toutes les espèces de *Leishmania* sécrètent aussi des phosphatases acides (sAP) capables de bloquer le stress oxydatif des neutrophiles et de participer à la préparation des nutriments nécessaires à leur survie (Remaley, Kuhns et al. 1984, Remaley, Glew et al. 1985, Das, Saha et al. 1986). *Leishmania* possède des glycophospholipides (GPL) dont certains se terminant par un mannose peuvent lier les récepteurs du mannose (MR) afin de promouvoir la phagocytose, tandis que d'autres peuvent inhiber l'activité de PKC ou même inhiber la réponse au NO et à l'IL-12 des macrophages (Blackwell, Ezekowitz et al. 1985, Chawla and Vishwakarma 2003, Assis, Ibraim et al. 2012).

En plus des LPG, *Leishmania* possède des phosphoglycans (PG) et des protéophosphoglycans (PPGs) permettant la survie du parasite au niveau de la mouche (Sacks, Modi et al. 2000). Finalement, *Leishmania* utilise sa peroxyredoxine pour réduire le H₂O₂ et ses cystéines protéases (CPs) pour moduler les protéines tyrosines phosphatases 1B (PTP-1B) et les facteurs de transcription NF-KB, STAT-1 et AP-1 des macrophages, contribuant ainsi à l'inhibition de la production de NO (Mottram, Souza et al. 1996, Cameron, McGachy et al. 2004, Abu-Dayyeh, Hassani et al. 2010). Notre groupe a récemment démontré que l'absence de CPB de *L. mexicana* entraîne une diminution drastique de l'expression de GP63 et que la réinsertion de GP63 est suffisante pour rétablir la viabilité. Ces résultats pourraient indiquer que les effets précédemment associés à CPB pourraient être dus en fait à l'activité de GP63 (Casgrain, Martel et al. 2016) (Figure 1. 16).

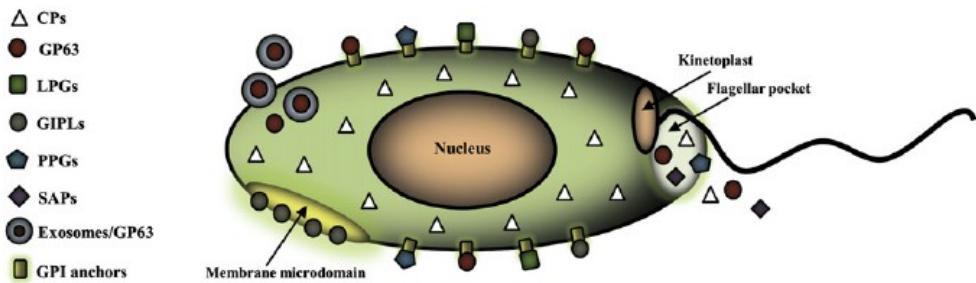


Figure 1. 16 Facteurs de pathogenèse de *Leishmania*

Leishmania possède plusieurs facteurs de pathogenèse dont les cystéines protéases (CPs), la leishmaniolysine (GP63), le lipophosphoglycan (LPG), les glycopropholipides (GIPLs), les protéophosphoglycans (PPGs) et les phosphatases acides sécrétées (SAPs). Certains de ces facteurs sont ancrés à la membrane par une ancre lipidique de lycosylphosphatidylinositol (GPI). Reproduit avec la permission d'Elsevier (Olivier, Atayde et al. 2012).

2. 3. 1 GP63

La glycoprotéine 63 ou la leishmaniolysine est une métalloprotéase à ancre GPI dépendante du zinc découverte en 1980. Elle est, comme LPG, l'un des antigènes de surface majeure de *Leishmania* ainsi que la glycoprotéine la plus abondante à la surface du promastigote. Tout comme pour LPG, son expression est grandement diminuée chez la forme amastigote. Cette quantité diminuée de GP63 demeure toutefois suffisante pour moduler la réponse immunitaire par sa disponibilité accrue une fois les grandes molécules de LPG disparues (Yao, Donelson et al. 2003, Olivier, Atayde et al. 2012).

GP63 est une glycoprotéine de la classe des metzincins caractérisée par une séquence HExxHxxGxxH (Schlagenhauf, Etges et al. 1998). GP63 possède trois différents domaines, soit le N-terminal, le central et le C-terminal. La portion C-terminale possède un site de liaison pour l'ancre GPI. La protéase est synthétisée avec un peptide signal KDEL ciblant le réticulum endoplasmique et avec un propeptide à l'extrémité N-terminale rendant la protéine inactive lors de la traduction. Ce propeptide doit être retiré protéolytiquement afin de permettre l'activation de GP63. Chez *L. major*, la cystéine conservée du propeptide se lie à l'ion de fer au site actif de l'enzyme pour bloquer son activité et éviter ainsi un suicide protéolytique (Macdonald, Morrison et al. 1995). La portion N-terminale contient la séquence de trois histidines HExxHxxGxxH coordonnées par le zinc essentielle à l'intégralité de la protéine (McGwire and Chang 1996). GP63 se différencie des autres métalloprotéases au zinc par l'insertion de 62 résidus entre la glycine (G) et la troisième histidine (H). La séparation des trois histidines permet de stabiliser la protéine et contribue à la conformation du site actif. Les GP63 de toutes les espèces de *Leishmania* exceptée *L. guyanensis* possèdent également 18 cystéines participant à 9 ponts disulfures dont 6 en C-terminal, 1 en central et 2 en N-terminal (Yao, Donelson et al. 2007).

Plusieurs espèces du parasite possèdent différents types de GP63 exprimés tout au long de leur développement. Par exemple, GP63 de *L. major* est actif à pH neutre ou alcalin tandis que le GP63 de *L. mexicana* est le plus actif à un pH d'environ 4.0 (Tzinia and Soteriadou 1991). La quantité de GP63 produite varie également au cours du développement du parasite, le simple passage de la phase logarithmique à la phase stationnaire *in vitro* entraîne une augmentation de la production de GP63 de 14 à 16 fois. Les trypanosomes n'étant pas capables de réguler la transcription de leur génome, la modulation de la production protéique s'effectue de façon post-transcriptionnelle comme démontré chez *L. major*, *L. amazonensis* et *L. chagasi*. De telle façon, la quantité d'ARN messager pour GP63 reste stable tout au long du développement et ce, peu importe la quantité de GP63 produite (Yao, Leidal et al. 2002, Hsiao, Yao et al. 2008).

GP63 existe sous deux différentes formes, soit la forme sécrétée et la forme ancrée à la membrane par l'ancre GPI (Yao, Leidal et al. 2002, Hsiao, Yao et al. 2008). Leur sécrétion est dépendante d'événements de sa propre activité protéolytique (McGwire, O'Connell et al. 2002).

La sécrétion de la forme non ancrée de GP63 est également dépendante d'un évènement de glycosylation (Ellis, Sharma et al. 2002). Différents mécanismes menant à l'internalisation de GP63 par les cellules hôtes ont été proposés. Il est possible que les GPI-GP63 interagissent avec les macrophages à travers les radeaux lipidiques où une protéine de renversement entraîne la translocation à travers la membrane et où le clivage par la phospholipase C entraîne sa libération de la membrane. L'interaction avec les radeaux lipidiques pourrait également entraîner leur endocytose et leur transport rétrograde. Il est également possible que les formes sécrétées et ancrées de GP63 soient transportées au cytoplasme par un transporteur. Finalement, il est possible que GP63 soit relâché au cytoplasme par la fusion de microvésicules ou d'exosomes contenant la forme GPI-GP63 avec la membrane plasmique (Gomez and Olivier 2010, Silverman, Clos et al. 2010). Les exosomes sont de petites vésicules de 40 à 100nm relâchés par différents types de cellules eucaryotes pouvant contenir jusqu'à 329 différentes protéines de *Leishmania* incluant GP63 (Silverman, Clos et al. 2010). Très récemment, notre groupe a démontré que les facteurs de pathogénèse LPG et GP63 sont tous deux exportés de la vacuole parasitophore par la voie de sécrétion de la cellule hôte de manière Sec22b-dépendante (Arango Duque, Jardim et al. 2019)(Figure 1. 17).

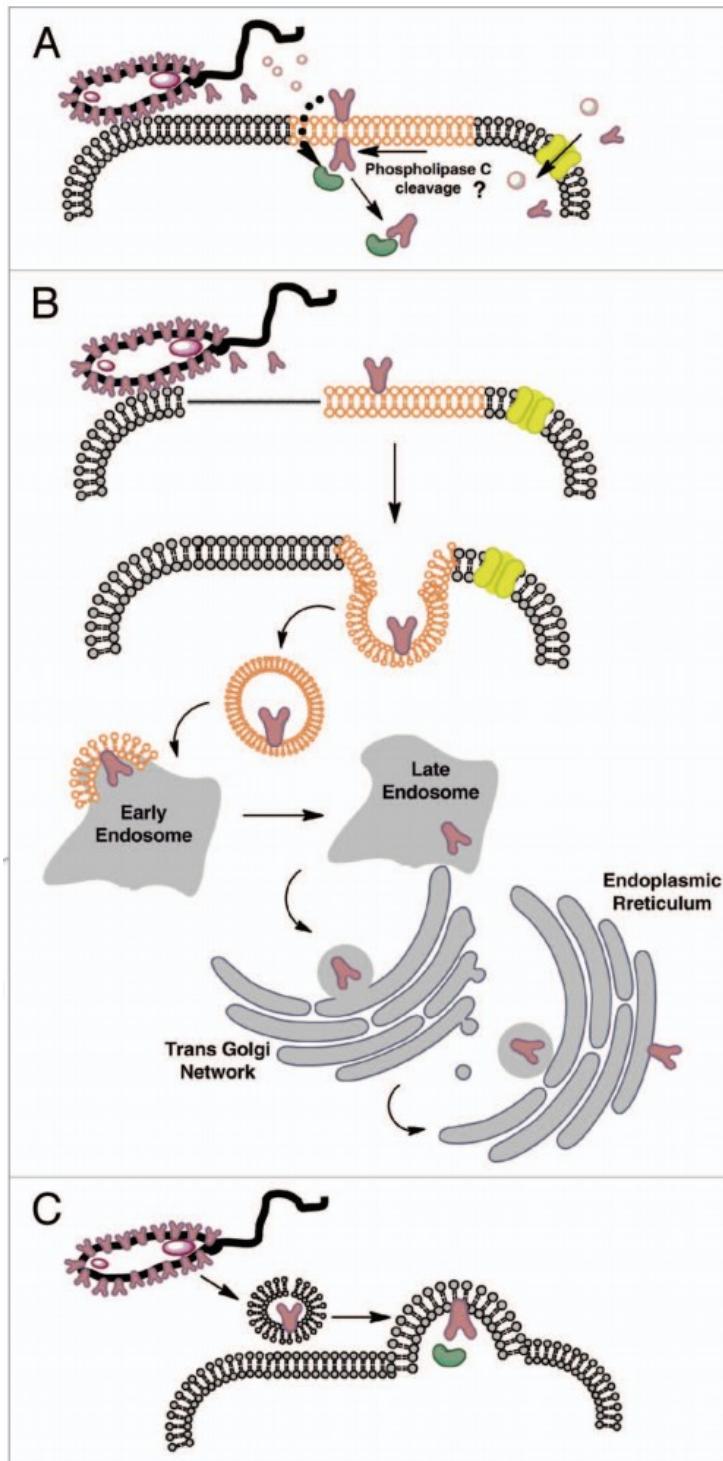


Figure 1.17 Distribution de GP63

Représentation des mécanismes potentiels d'accès au cytoplasme par GP63. A. Par translocation au niveau des radeaux lipidiques ou par l'emprunt de transporteurs protéiques. B. Par endocytose des radeaux lipidique et transport rétrograde jusqu'au réticulum endoplasmique. C. Relâchement au cytoplasme par la fusion des exosomes (Gomez and Olivier 2010).

GP63 possède une vaste sélection de substrats incluant même la caséine, la gélatine, l'albumine, l'hémoglobine et les fibrinogènes. Spécifiquement, GP63 est une endopeptidase qui clive ses substrats entre un acide aminé polaire et un acide aminé hydrophobe suivi de deux acides aminés basiques (Polaire – Hydrophobe – Basique – Basique)(Bouvier, Schneider et al. 1990). L'acide aminé polaire est habituellement une tyrosine, mais peut également être une sérine ou une thréonine pour la GP63 de *L. mexicana* (Bouvier, Schneider et al. 1990, Ip, Orn et al. 1990). En plus de moduler la réponse immunitaire, GP63 peut réguler la multiplication du parasite ainsi que sa morphologie comme c'est le cas pour *L. donovani*. Reproduit avec la permission de "Taylor & Francis online Academic Journal" (Pandey, Chakraborti et al. 2004).

2. 3. 2 LPG

Le LPG est le composant majeur des phosphoglycans caractérisés par la présence d'unités de disaccharides-phosphates Gal(β 1,4)Man(α 1-PO₄→6). LPG est également la principale molécule exprimée sur la totalité de la surface de la forme promastigote de toutes les espèces de *Leishmania* avec près de 5 000 000 de copies par promastigote. Ce nombre de copies diminue grandement voir, est complètement éliminé une fois le parasite transformé en amastigote (McConville and Blackwell 1991). LPG est essentiel à la survie du parasite autant chez le vecteur que chez son hôte mammifère (Turco and Sacks 2003, Novozhilova and Bovin 2010). LPG consiste en un noyau de glycans ancré à la membrane par une ancre lipidique 1-O-alkyl-2-*lysophosphatidyl(myo)inositol* (GPI) suivi d'une chaîne de 16 à 30 unités répétitives de Gal(β 1,4)Man(α 1-PO₄→6) avec une coiffe d'oligosaccharides (Figure 1. 18).

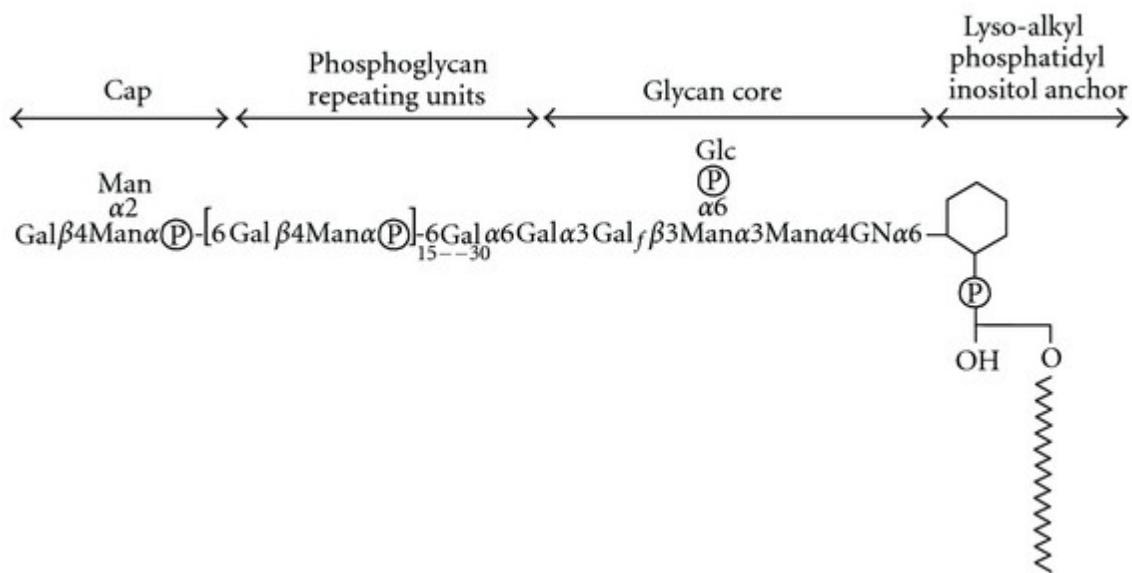


Figure 1. 18 La conformation du LPG

Les molécules de LPG sont formées d'une ancre lipidique, d'un noyau de glycans, d'unités répétitives de phosphoglycans et d'une coiffe. Libre d'accès (Franco, Beverley et al. 2012).

LPG tient son hétérogénéité de la coiffe d'oligosaccharides, les trois autres domaines étant invariables et conservés à travers toutes les espèces de *Leishmania* (McConville, Thomas-Oates et al. 1990). Trois types de LPG ont également été décrits en fonction des chaînes latérales de leurs domaines PG, soit une absence de chaîne latérale pour le LPG de *L. donovani*, une glycosylation en position C3 des galactoses pour le LPG de *L. major*, *L. mexicana*, *L. infantum* et *L. tropica* ou une mannosylation fréquente en position C2 des mannoses pour le LPG de *L. aethiopica*. Le nombre de répétitions des unités répétitives en chaîne ainsi que la nature de chapeau d'oligosaccharides peuvent également varier tout au long du cycle de vie du parasite. Il existe également des variations entre les LPG de parasites de différentes souches de la même espèce (McConville, Schnur et al. 1995, Sacks, Pimenta et al. 1995).

2. 4 Se rendre aux phagocytes

La première étape importante à franchir pour le parasite est de se rendre jusqu'aux phagocytes qui permettront leur transformation en amastigote et leur survie au niveau de l'hôte mammifère.

2. 4. 1 Métacyclogénèse

Lors de l'infection de son vecteur, *Leishmania* utilise les phosphoglycans afin de permettre sa survie. LPG en particulier permet l'attachement des parasites au niveau de l'intestin de l'insecte (Pimenta, Turco et al. 1992). La métacyclogénèse du promastigote entraîne des changements morphologiques comme l'allongement de son flagelle jusqu'à deux fois la longueur de la cellule (Zakai, Chance et al. 1998). Elle cause également l'allongement des LPG, le nombre de sous-unités répétitives étant doublé, ce qui entraîne le détachement et la migration de la forme métacyclique du promastigote de l'intestin vers la gorge de l'insecte (Sacks, Brodin et al. 1990). Une fois à la gorge, le promastigote sécrète un gel (PSG) contenant notamment des PPGs qui permettent de boucher la gorge de l'animal et de moduler son alimentation. Pour permettre à l'animal de se nourrir, les parasites métacycliques sont régurgités dans la plaie lors du prochain repas de sang. Le PSG régurgité avec les parasites permet également d'exacerber l'infection (Rogers 2012).

2. 4. 2 Le sacrifice essentiel

Lors de l'établissement d'une infection par *Leishmania* tous les parasites ne sont pas voués au succès. La mort d'une sous-population de parasites est par contre cruciale au développement de l'infection dans l'hôte mammifère, puisque l'injection de parasites 100% viables entraîne l'élimination de l'infection et le développement de l'immunité contre *L. major* (van Zandbergen, Bollinger et al. 2006). Cette mortalité nécessaire arrive naturellement au niveau de l'intestin de la mouche infectée et génère des parasites semblables à des cellules apoptotiques qui exposent des phosphatidylserines (PS) à leur surface qui peuvent être reconnues par les phagocytes professionnels (Wanderley, Thorpe et al. 2013).

En condition normale, la reconnaissance des PS est un mécanisme qui entraîne une activation non agressive des phagocytes où la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est inhibée pour éviter une réaction immunitaire inutile et où des molécules anti-inflammatoires comme TGF- β , PGE₂ et PAF sont produites (Fadok, Bratton et al. 1998, Ravichandran 2010). La reconnaissance des PS entraîne également une diminution de la production d'oxyde nitrique (Birge, Boeltz et al. 2016). La reconnaissance des PS exposées par les parasites morts contrebalance donc la réponse inflammatoire engagée par les parasites vivants (Figure 1. 19). Cette diminution de la réponse inflammatoire a également été liée à un processus d'internalisation différent, soit la phagocytose associée à LC3 (LAP). L'internalisation par LAP entraîne une augmentation de la production d'IL-10 et de TGF- β , deux molécules importantes de la voie tolerogénique, ainsi qu'une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6 (Crauwels, Bohn et al. 2015). L'importance du détournement de la machinerie de l'autophagie a également été démontrée par l'utilisation d'anticorps contre les PS qui entraîne une diminution de la parasitémie et de la grandeur des plaies causées par *L. amazonensis* *in vivo* (Wanderley, Thorpe et al. 2013).

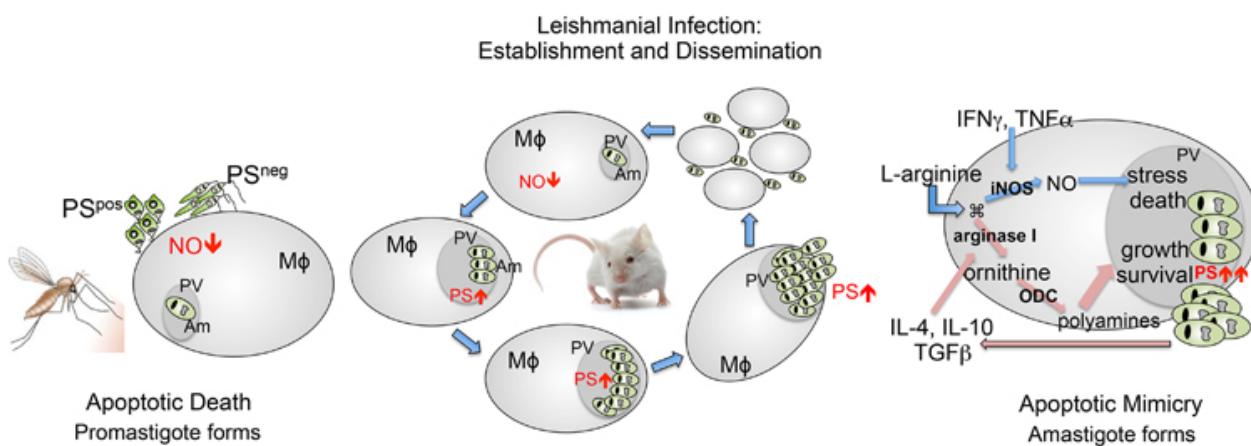


Figure 1. 19 Exposition de PS à la surface des parasites

Lors de l'infection, une sous-population de parasites est apoptotique et entraîne la diminution de la réponse inflammatoire comme la production de NO nécessaire à l'établissement de l'infection. Les amastigotes possèdent quant à eux la capacité de présenter des PS à leur surface pour imiter les cellules apoptotiques et diminuent la réponse pro-inflammatoire. Libre d'accès (Birge, Boeltz et al. 2016).

2. 4. 3 Complément et galectine

L'antigène majeur de surface GP63 est capable de dégrader la matrice extracellulaire sous-cutanée afin de faciliter le mouvement du parasite suite à son inoculation au derme de son hôte mammifère (McGwire, Chang et al. 2003). GP63 inhibe également l'activité du complément en liant C3b et causant sa conversion en la forme inactive C3bi de façon protéolytique, ce qui entraîne une diminution de la fixation des complexes d'attaque membranaire C5-C9 (Brittingham, Morrison et al. 1995). L'absence de GP63 chez *L. major* entraîne notamment une susceptibilité à la lyse par le complément (Joshi, Kelly et al. 2002). En condition normale, la lyse par le complément joue un important rôle lors de la réponse immunitaire innée permettant l'élimination des agents pathogènes. Suite à son activation par l'une de trois voies: classique, des lectines ou alternative, la C3 convertase convertit la C3 en C3b. Cette dernière lie la C3 convertase pour former la C5 convertase et entraîner la cascade finale. Cette C5 convertase entraînera la formation de C5b qui lie C6 pour faciliter la liaison de C7, C8 et C9 pour former le complexe d'attaque membranaire (MAC) C5b-9 qui forme des pores à la surface de la cellule attaquée et cause la lyse cellulaire (De Vries, Sethi et al. 2015) (Figure 1. 20). La liaison du complément permet également d'augmenter la phagocytose des promastigotes par les macrophages à travers leurs récepteurs CR3 et CR1 et représente donc une étape importante de la survie de *Leishmania* chez les mammifères (Da Silva, Hall et al. 1989, Dunkelberger and Song 2010). En plus du complément, la lectine liant les B-galactosides solubles de mammifère, Galectin-3 joue un rôle dans la défense de l'hôte contre *Leishmania*. Elle favorise la migration des neutrophiles capables de diminuer la parasitémie en début d'infection. Elle limite également la présence des Treg (CD4+. CD25+ Foxp3+) suppressif qui produisent de l'IL-10 (Bhaumik, St-Pierre et al. 2013, Fermino, Dias et al. 2013). La formation des treillis de Galectin-3 d'ordre supérieur est par contre clivé par GP63 au niveau de l'épitope de polygalactose suite à leur liaison au LPG de *L. major*, ce qui influence possiblement la réponse immunitaire contre *Leishmania* (Pelletier and Sato 2002, Sato, Bhaumik et al. 2014).

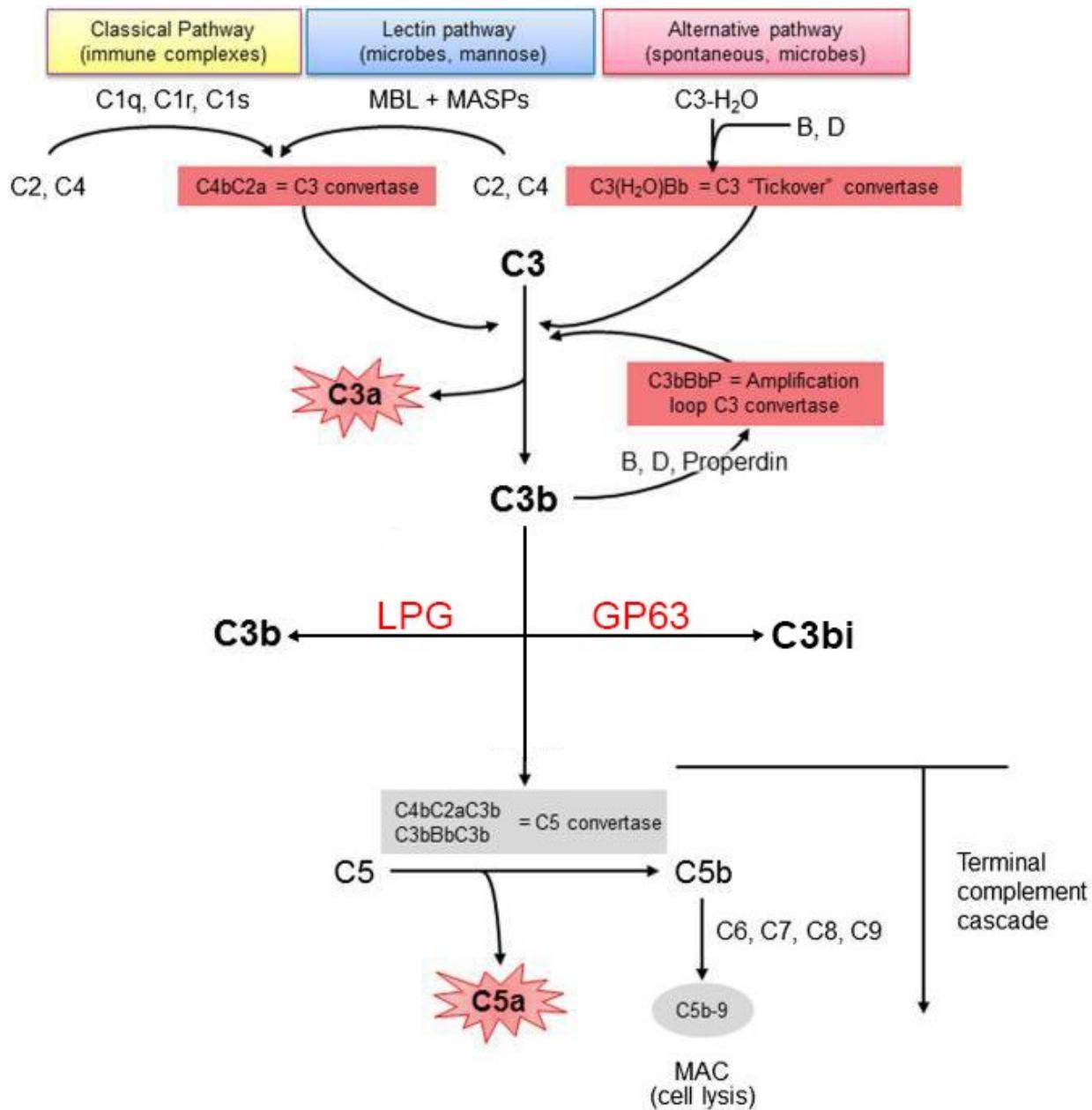


Figure 1. 20 La cascade du complément

L'activation de façon classique, par les lectines ou spontanément entraîne la formation de la C3 convertase ou de la C3 "tickover" convertase qui permettront de convertir la C3 en C3b qui participera à la formation de la C5 convertase. La C5 convertase enclenche par la suite la cascade terminale du complément en convertissant la C5 en C5b qui facilite la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9 (MAC) qui entraîne la lyse cellulaire. Lors de l'infection par *Leishmania*, le LPG lie la C3b et empêche la formation du complexe d'attaque membranaire à la membrane du parasite tandis que GP63 lie et inactive la C3b (C3bi) par clivage protéolytique (Brittingham, Morrison et al. 1995, Spath, Garraway et al. 2003). Adaptée avec la permission de "American society of Nephrology" (De Vriese, Sethi et al. 2015).

2. 4. 4 Th1 et Th2

La métalloprotéase GP63 peut également inactiver directement les cellules tueuses naturelles (NK) en empêchant la prolifération des cellules NK activées par l'IL-2 et en affectant l'expression des récepteurs à leur surface (Lieke, Nylen et al. 2008, Rasolzadeh, Haji Fatahaliha et al. 2015). Les cellules NK jouent un rôle important lors de la réponse immunitaire à *L. major* par leur production importante d'IFN-γ qui assistent la modulation de la réponse adaptative en réponse protectrice Th1 (Scharton and Scott 1993). La réponse Th1 protectrice est stimulée par l'IL-12 en association avec la production d'IFN-γ, d'IL-2 et de TNF-α tandis que la réponse Th2 permissive a été associée à une production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10, d'IL-13 et de TGF-β (Heinzel, Sadick et al. 1991, Wilson, Jeronimo et al. 2005). Par contre, même les souris établissant une réponse Th1 efficace voient une production et une accumulation d'IL-10 au niveau de la plaie initiale 2 semaines après l'infection suggérant qu'un recrutement plus élevé de T CD4+ produisant de l'IFN-γ au site d'inoculation pourrait être une méthode efficace pour obtenir une cure stérile (Pagan, Peters et al. 2013)(Figure 1. 21).

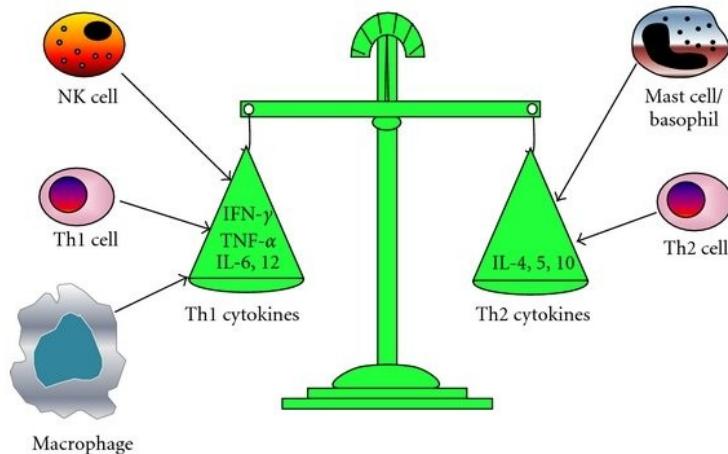


Figure 1. 21 Réponse Th1 vs Th2

La réponse protectrice Th1 est caractérisée par l'activité des cellules NK, Th1 et des macrophages sécrétant les cytokines IFN-γ, TNF-α, IL-6 et IL-12, tandis que la réponse permissive Th2 est caractérisée par l'activité des mastocytes, des basophiles ainsi que des cellules Th2 sécrétant les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10. Libre d'accès (Zhang, Wu et al. 2011).

2. 4. 5 Pièges extracellulaires des neutrophiles

Les promastigotes de plusieurs espèces comme *L. amazonensis*, *L. donovani* et *L. major* peuvent infecter les neutrophiles et causer la dégranulation de leur ADN rapide pour former une structure filamenteuse capable de capturer et de tuer les micro-organismes nommée pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) (Guimaraes-Costa, Nascimento et al. 2009, Gabriel, McMaster et al. 2010). Ces NETs peuvent entraîner la mort de certaines espèces comme *L. amazonensis* ou simplement leur immobilisation, promouvant leur internalisation par d'autres phagocytes comme les monocytes pour d'autres espèces comme *L. donovani*. Cette capacité à survivre aux NETs est conférée par les LPG ou la 3'-Nucleotidase/Nuclease puisque les parasites ne possédant pas de LPG où ayant une expression diminuée de 3'-Nucleotidase/Nuclease sont plus susceptibles aux NETs (Gabriel, McMaster et al. 2010, Guimaraes-Costa, DeSouza-Vieira et al. 2014). La 3'-Nucleotidase/Nuclease est une enzyme ancrée à la membrane précédemment associée à la nutrition par sa capacité de générer des nucléotides et des phosphates à partir d'acides nucléiques (Dwyer and Gottlieb 1984, Hammond and Gutteridge 1984, Sopwith, Debrabant et al. 2002)

2. 4. 6 Cheval de Troie

Suite à l'inoculation, des espèces de *Leishmania* comme *L. chagasi* entraînent une migration de cellules de l'hôte dans une tentative de réparer les dommages aux tissus causés par la piqûre du phlébotome. Les premières cellules à arriver au niveau de la morsure sont les neutrophiles qui seront suivis par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Cette migration est favorisée par la salive du vecteur qui est capable de tripler la migration cellulaire. Étonnamment, la majorité de ces cellules restent dans les tissus périphériques de la blessure. *L. chagasi* entraîne également un influx plus important de neutrophiles que de macrophages suggérant une stratégie visant la minimalisation de la réponse pro-inflammatoire initiale (Vasconcelos, Coelho et al. 2014). Les parasites internalisés par ces neutrophiles induisent une expression élevée de marqueurs apoptotiques. Ces cellules sont par la suite rapidement internalisées par les macrophages et les cellules dendritiques, ce qui entraîne une réponse immunosuppressive retardant l'acquisition de la résistance à l'infection (Savill, Dransfield et al. 2002, Ribeiro-Gomes, Peters et al. 2012).

L'utilisation des neutrophiles comme cheval de Troie permet la survie de *L. major* dans l'initialisation de l'infection, ce qui souligne l'exploitation des interactions entre les neutrophiles et les macrophages et cellules dendritiques (Peters, Egen et al. 2008, Peters and Sacks 2009). L'exploitation des neutrophiles permet également l'inhibition de la réponse Th1 protectrice, tandis que l'épuisement des neutrophiles chez les souris susceptibles BALB/c entraîne la résistance à l'infection en inhibant la réponse Th2 permissive (Tacchini-Cottier, Zweifel et al. 2000, Ribeiro-Gomes, Romano et al. 2015) (Figure 1. 21).

2. 5 Internalisation du parasite

Les C3b et C3bi liés aux LPG et GP63 entraînent la reconnaissance et l'internalisation du parasite par le CR1 et le CR3. Quoique participant à ce processus d'internalisation, le LPG n'est pas strictement nécessaire lors de cette étape puisque son absence n'entraîne pas une diminution de la liaison et de l'internalisation des promastigotes (Lodge and Descoteaux 2008). Le récepteur des mannoses-fucoses (MFR), le TLR2, le TLR9, le récepteur de la fibronectine, ainsi que les récepteurs des glycoconjugués avancés sont également impliqués lors de l'internalisation de *Leishmania* (Mosser and Rosenthal 1993, Martinez-Salazar, Berzunza-Cruz et al. 2008). Malgré la multitude de récepteurs impliqués dans la reconnaissance de *Leishmania*, le cytosquelette d'actine ainsi que des GTPases de la famille Rho sont actifs lors de l'internalisation du parasite. Ces GTPases permettent le réarrangement du réseau d'actine ainsi que la formation de filaments de F-actine autour du phagosome. Il est donc probable que l'opsonisation rapide des promastigotes favorise une internalisation par les CR dépendant de RhoA, tandis que les parasites non opsonisés entraînent leur internalisation de façon dépendante à Rac1 et Cdc42 (Lodge and Descoteaux 2005). L'internalisation des amastigotes nécessite quant à elle la polymérisation d'actine et la colocalisation de F-actine, paxilline et de talin à la coupe phagocytique (Love, Mentink Kane et al. 1998). L'opsonisation des amastigotes pourrait également entraîner des évènements d'internalisation similaires aux promastigotes (Morehead, Coppens et al. 2002). Les amastigotes peuvent également être phagocytés par le Fc-γR et les récepteurs des PS qui induisent une réponse au facteur de croissance transformateur bêta (TGF-B) et à l'IL-10 inhibant l'activation des macrophages et permettant la survie du parasite (Kima 2007)(Figure 1. 19 et 1. 22).

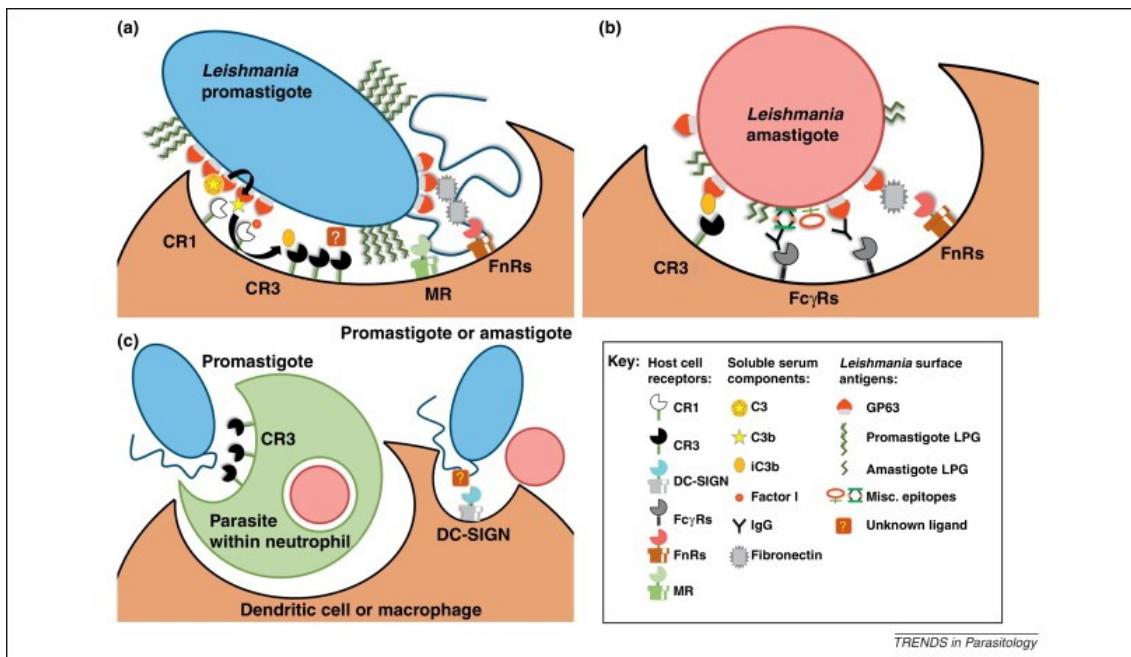


Figure 1.22 Récepteurs impliqués lors de la phagocytose de *Leishmania*

A. Les promastigotes utilisent les récepteurs du complément CR3, le récepteur du mannose et de la fibronectine afin d'être internalisés. B. Les amastigotes utilisent quant à eux le CR3, le Fc_yR et le récepteur de la fibronectine. C. Les parasites peuvent également utiliser des neutrophiles apoptotiques comme cheval de Troie. Reproduit avec la permission d'Elsevier (Ueno and Wilson 2012).

2. 6 Survie intracellulaire

Une fois internalisés, les parasites commencent la modulation de leur nouvel environnement afin de promouvoir leur survie et de favoriser l'infection.

2. 6. 1 Formation de la vacuole parasitophore

Les parasites procèdent à la modification du nouveau phagosome en vacuole parasitophores (PV) pouvant être petite et serrée autour du parasite pour les espèces comme *L. major* et *L. donovani* ou large et communale pour les espèces comme *L. mexicana* et *L. amazonensis*. Cette modification des phagosomes est médiée par les différents facteurs de pathogénèse de *Leishmania*. Les différences de mécanismes menant à l'un ou l'autre des types PV restent à ce jour méconnus. (Chakraborty, Banerjee et al. 2005)

LPG joue plusieurs rôles importants lors de la formation des vacuoles individuelles de *L. major* et *L. donovani* en bloquant la biogenèse des phagosomes en empêchant le recrutement de Rab7, ce qui diminue la capacité fusogénique des PV envers les endosomes et les lysosomes. (Desjardins and Descoteaux 1997, Scianimanico, Desrosiers et al. 1999, Moradin and Descoteaux 2012). Il entraîne la diminution du stress oxydatif par l'inhibition de l'assemblage de la NADPH oxydase à la membrane de la PV qu'il effectue en empêchant le recrutement des composantes cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox}, gp91^{phox} et Rac1 étant tous deux présent à la PV (Lodge, Diallo et al. 2006). Il perturbe également les microdomaines lipidiques phagosomaux par son insertion, entraînant l'exclusion de la V-ATPase de la PV et limitant ainsi l'acidification vacuolaire par l'exclusion de la synaptotagmine V (Tolson, Turco et al. 1990, Vinet, Fukuda et al. 2009, Winberg, Holm et al. 2009). *L. donovani*, par la perturbation des microdomaines lipidiques de sa PV, diminue également la capacité de présentation antigénique des macrophages hôtes en limitant l'accessibilité du cholestérol. LPG induit également l'accumulation d'un anneau d'actine en périphérie de la PV qui crée une barrière physique pouvant potentiellement empêcher le trafic vésiculaire à la PV (Holm, Tejle et al. 2001). Le rôle de LPG est limité au stade promastigote, son expression étant grandement diminuée une fois le parasite au stade amastigote (Bahr, Stierhof et al. 1993).

Une fois le niveau de LPG diminué, la PV recouvre la capacité de fusionner avec les lysosomes et est acidifiée par les V-ATPase nouvellement recrutées. L'amastigote est cependant résistant à cette acidification, son pH optimal se situant entre 4.0 et 5.5 (Mukkada, Meade et al. 1985). Les vacuoles individuelles de ces amastigotes recrutent également Rab7, LAMP1 et LAMP2 ainsi que la calnexine et la SNARE Sec22b sans avoir d'assemblage de complexe NADPH oxydase à sa membrane, les amastigotes n'induisant pas la phosphorylation de p47^{phox} nécessaire à son activation (Lodge, Diallo et al. 2006, Lodge and Descoteaux 2008, Vinet, Fukuda et al. 2009, Ndjamena, Kang et al. 2010)(Figure 1. 23). Le LPG possède également une capacité modulatoire de l'expression d'iNOS (Proudfoot, Nikolaev et al. 1996, Kavoosi, Ardestani et al. 2006).

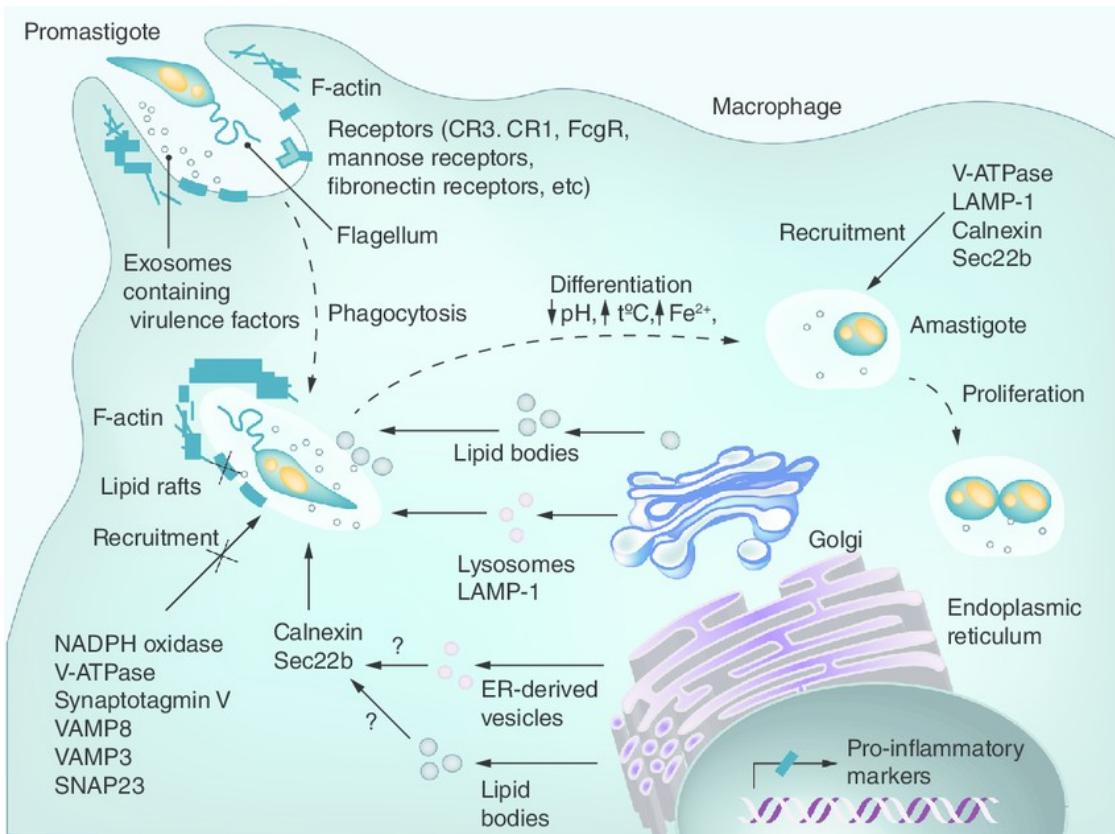


Figure 1. 23 Maturation de la vacuole individuelle de *Leishmania*

La forme promastigote des espèces produisant des PVs individuelles bloque la maturation du phagosome par la création d'un anneau d'actine autour de sa PV et par la perturbation des radeaux lipidiques qui inhibe le recrutement des SNAREs Synaptotagmine V, VAMP3, VAMP8 et SNAP23 ainsi que l'assemblage de la NADPH oxydase et de la V-ATPase. Une fois le parasite transformé en amastigote, la PV fusionne librement avec les lysosomes et est acidifiée. Reproduit avec la permission de "Future Medicine" (Podinovskaia and Descoteaux 2015).

Contrairement aux PVs individuelles, les PVs communales de *L. amazonensis* possèdent une très grande capacité fusogénique étant notamment capables de fusionner avec des vacuoles individuelles de *L. major* et avec des phagosomes contenant du zymosan (Veras, Topilko et al. 1996, Real, Mortara et al. 2010). L'élargissement de la PV était même considéré essentiel à la survie des parasites qui forment des vacuoles communales. En absence de Lyst/Beige, le volume des PV et la survie des parasites augmentent, tandis que sa surexpression entraîne une diminution du volume des PV et la mort des parasites (Wilson, Huynh et al. 2008). L'utilisation de la molécule Retro-2 ciblant la SNARE du réticulum endoplasmique Stx 5 entraîne une diminution du volume de la PV et de la survie de *L. amazonensis* (Canton and Kima 2012). La modulation à la baisse de Sec22b et Stx18 a des effets similaires.

De plus, la modulation à la baisse de Stx 18 entraîne une diminution de la phagocytose de *L. amazonensis* (Canton, Ndjamen et al. 2012). Contrairement aux espèces produisant des PVs individuelles, le LPG de l'espèce produisant des PVs communales *L. mexicana* n'est pas essentiel au développement de l'infection (Ilg 2000). De plus, l'accumulation d'actine en périphérie de la PV communale de *L. amazonensis* est rapidement dégradée (Courret, Frehel et al. 2002). Le récepteur CD36 de l'ox-LDL permet également l'élargissement des vacuoles communales de *L. amazonensis*, les PV étant incapables de fusionner efficacement avec les endosomes tardifs et les lysosomes en son absence (Okuda, Tong et al. 2016). La sous-unité ATP6V₀d2 de la V-ATPase joue un rôle important lors de la biogenèse des vacuoles communales de *L. amazonensis*. De concert avec CD36, cette sous-unité permet la rétention du cholestérol à la PV ce qui entraîne son élargissement et permet la survie du parasite aux ox-LDL retrouvés aux plaies chroniques (Pessoa, Reis et al. 2019) (Figure 1. 24). Cependant, selon la même étude il n'y aurait pas de diminution de la survie de *L. amazonensis* en absence d'ATP6V₀d2 malgré la taille réduite de leur PV. Plusieurs espèces de *Leishmania* dont *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. major* et *L. mexicana*, perturbent l'homéostasie du cholestérol. *L. donovani* bloque la biogenèse du cholestérol en clivant l'endoribonucléase Dicer tandis que *L. amazonensis* et *L. major* augmentent la biogenèse du cholestérol en régulant à la hausse la 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) (Osorio y Fortea, de La Llave et al. 2009, Rabhi, Rabhi et al. 2012, Ghosh, Bose et al. 2013). *L. major* inhibe également l'efflux du cholestérol en modulant à la baisse ABCA1 (Rabhi, Rabhi et al. 2012). *L. mexicana* bloque le transport du cholestérol des endosomes en modulant à la baisse la protéine Niemann-Pick C1 (NPC1) (Semini, Paape et al. 2017). L'impact de ces perturbations sur la réponse inflammatoire et sur la présentation antigénique sera discuté dans les sections 2.6.2 et 2.6.3 respectivement. *L. amazonensis* entraîne également une diminution de l'expression d'iNOS pour favoriser sa survie intracellulaire (Calegari-Silva, Vivarini et al. 2015, Calegari-Silva, Vivarini et al. 2018).

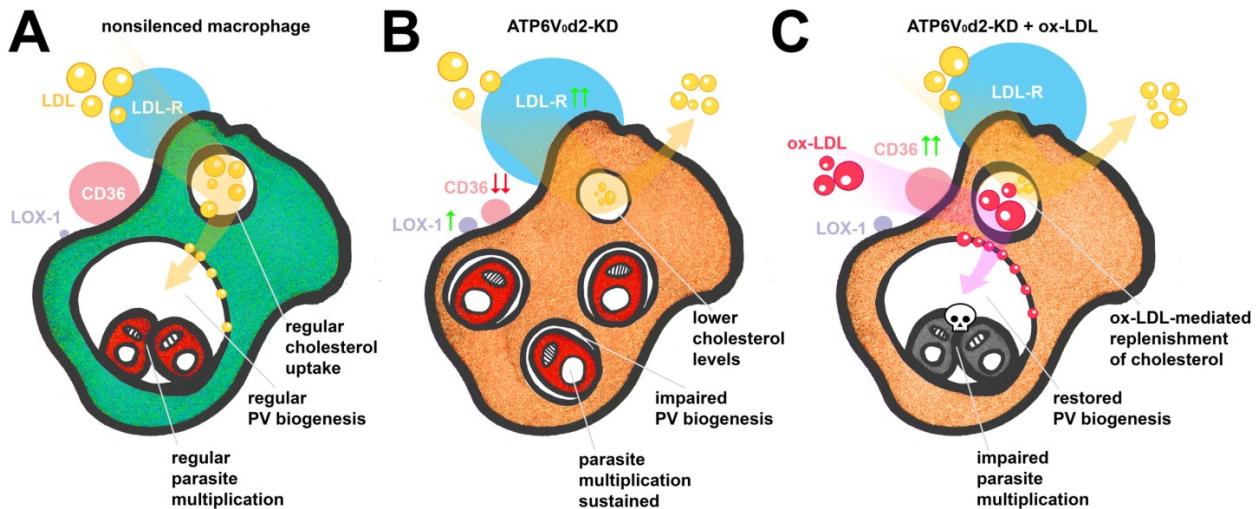


Figure 1. 24 Biogenèse de la vacuole communale

A. L'homéostasie du cholestérol joue un rôle important lors de la biogenèse des vacuoles communales et son apport à la PV par CD36 entraîne l'expansion de la PV. B. Cette homéostasie est sous le contrôle de la sous-unité ATP6V₀d2 de la V-ATPase, son absence entraînant une diminution de l'expression du CD36, l'export du cholestérol, ainsi que la diminution du volume des PV. C. Le volume des PV est récupéré par l'ajout d'ox-LDL en absence de la sous-unité ATP6V₀d2, mais s'avère létale indiquant un rôle pour le domaine V₀ de la V-ATP-ase dans la sélection du cholestérol se rendant à la PV. Libre d'accès (Pessoa, Reis et al. 2019).

2. 6. 2 Modulation de la réponse inflammatoire

Une fois internalisée par un macrophage, la forme promastigote de *L. major* commence à moduler la sécrétion des cytokines du phagocyte afin de faciliter sa survie et de favoriser la phagocytose d'autres parasites. Le groupe d'Olivier a révélé que GP63 entraîne l'activation des protéines tyrosine phosphatases (PTP) SHP-1, PTP1B et des phosphatases des lymphocytes T (TCPTP) au niveau des radeaux lipidiques. SHP-1, une fois activée par l'infection entraîne la déphosphorylation de la Janus kinase 2 (JAK2) et l'inactivation d'IRAK-1 par un motif inhibiteur à base de tyrosine de son domaine kinase (KTIM). PTP1B et TCPTP régule également négativement les voies de signalisation de JAK/STAT et des MAPK par déphosphorylation. L'activation des PTP limite l'activation des macrophages suite à la stimulation à l'IFN-γ et limite la production de NO ainsi que la production d'IL-12 et d'INF-γ ce qui promeut l'infection (Blanchette, Racette et al. 1999, Martiny, Meyer-Fernandes et al. 1999, Abu-Dayyeh, Shio et al. 2008, Gomez, Contreras et al. 2009) (Figure 1. 25).

GP63 peut sélectivement réguler à la baisse la synthèse des protéines de la cellule hôte en altérant la voie mTORC1, ce qui résulte notamment en une diminution de la réponse à l'IFN de type I et de la production de NO (Weinstein, Finn et al. 2000, Bogdan, Mattner et al. 2004). La synthèse protéique est contrôlée par un répresseur, la protéine de liaison 1 au eIF4E (4E-BP1) qui lie le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E) et empêche la formation du complexe du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4F (eIF4F) composés de eIF4E, eIF4A et eIF4G. Une fois 4E-BP1 hyper-phosphorylé par mTOR, il est dissocié de eIF4E ce qui entraîne l'activation du complexe eIF4F et initie la traduction. Pour ce faire, GP63 clive mTOR, le régulateur négatif du répresseur de la traduction 4E-BP1, ce qui entraîne l'inhibition de la formation du complexe mTORC1 et l'activation de 4E-BP1 (Jaramillo, Gomez et al. 2011) (Figure 1. 25).

L'activité de la sérine/thréonine kinase PKC impliquée lors du transfert du signal suite à une stimulation au LPS est diminuée par LPG (Descoteaux, Matlashewski et al. 1992). Son activité pourrait également être inhibée protéolytiquement par GP63. Deux substrats de PKC, le substrat myriostoylée riche en alanine des Kinases C (MARKS) et les protéines apparentées aux MARKS (MRP) sont également clivées par GP63 de *L. major* (Corradin, Ransijn et al. 2002)(Figure 1. 25).

De plus, GP63 modifie l'activité de plusieurs facteurs de transcription. AP-1 est un facteur de transcription impliqué lors de la production de NO en réponse à l'IFN- γ , ainsi que dans la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Olivier, Gregory et al. 2005). AP-1 fonctionne sous forme d'homodimère de membres de la famille Jun (c-Jun, Jun B et Jun D) ou d'hétérodimères de membres des familles Jun et Fos (c-Fos, FosB, Fra 1 et Fra 2)(Ding, Pan et al. 2013). GP63 clive les sous-unités c-Jun et c-Fos pour entraîner l'inactivation d'AP-1 et inhiber la production de NO (Contreras, Gomez et al. 2010). En condition normale, la sous-unité p65 RelA de NF- κ B interagit avec la sous-unité p50 pour médier les fonctions cellulaires. GP63 clive la sous-unité p65 RelA de NF- κ B au cytoplasme. Le fragment de p65 RelA migre par la suite au noyau où il induit l'expression des chimiokines MIP-2/CXCL2, MCP-1/CCL2, MIP-1alpha/CCL3 et MIP-1beta/CCL4)(Gregory, Godbout et al. 2008)(Figure 1. 25). GP63 est même capable de s'attaquer à l'enveloppe nucléaire en dégradant les nucléoporines des complexes de pores nucléaires (Isnard, Christian et al. 2015).

La GP63 de *L. donovani* perturbe également l'homéostasie du cholestérol en clivant Dicer, ce qui entraîne une diminution de la biogenèse du cholestérol (Ghosh, Bose et al. 2013). L'infection par *L. donovani* déplete ainsi le cholestérol de la membrane plasmique ce qui pourrait contrôler la réponse inflammatoire en empêchant la signalisation efficace par le récepteur de l'IFN- γ (Sen, Roy et al. 2011). La séquestration du cholestérol aux endosomes par *L. mexicana* pourrait également entraîner des défauts de signalisation similaires (Semini, Paape et al. 2017).

Ces modifications signalétiques et de transcriptions entraînent l'inhibition de la sécrétion de l'IL-12 et de NO contribuant ainsi à la survie du parasite et facilitant sa réPLICATION (Cameron, McGachy et al. 2004, Forget, Gregory et al. 2006, Abu-Dayyeh, Shio et al. 2008).

Notre groupe a également récemment démontré que GP63 peut aussi entraîner la sécrétion de cytokine en clivant de façon protéolytique la SNARE synaptogamine XI présente aux endosomes de recyclage et aux lysosomes qui régule négativement la sécrétion de TNF et d'IL-6 (Arango Duque, Fukuda et al. 2013). Ces deux cytokines pro-inflammatoires sont responsables de l'augmentation de l'influx de neutrophiles et de monocytes inflammatoires au site d'inoculation qui contribue indirectement au maintien, ainsi qu'à la dissémination de l'infection (Arango Duque, Fukuda et al. 2014). Un autre facteur de pathogenèse de *L. mexicana*, la cystéine protéinase B (CPB), contribue à la virulence, les parasites "knock-out" induisant une réponse Th1 protectrice avec de faibles lésions lors d'infection de souris BALB/c (Denise, McNeil et al. 2003). La CPB est également capable de modifier la signalisation et les fonctions des macrophages en altérant NF- κ B, STAT-1a et AP-1 ce qui entraîne l'inhibition de la réponse à l'IFN- γ , de la production d'oxyde nitrique et de la production d'IL-12 par les macrophages induits par le LPS (Cameron, McGachy et al. 2004, Abu-Dayyeh, Hassani et al. 2010). Notre groupe a récemment publié que CPB régule la virulence de *L. mexicana* par son contrôle de l'expression de GP63. La virulence des parasites CPB "knock-out" peut également être récupérée par l'expression d'une GP63 exogène (Casgrain, Martel et al. 2016). La présence du LPG à la surface des promastigotes agit également en inhibant la production d'oxyde nitrique et la sécrétion d'IL-12 (Winberg, Rasmusson et al. 2007, Assis, Ibraim et al. 2012).

Vingt-quatre à quarante-huit heures post-internalisation, le promastigote se transforme en amastigote. Les signaux menant à cette différentiation restent à ce jour mécompris, mais l'acidification de la vacuole parasitophore et l'augmentation de la température seraient à sa base (Zilberstein and Shapira 1994). La différentiation en amastigote est capable de stimuler une production de cytokines associées avec la réponse inefficace Th2 qui n'est pas retrouvée lors d'infection par des parasites avirulents incapables de se différencier en amastigotes (Ali, Rees et al. 2013).

Un autre facteur de pathogénèse de *Leishmania*, la protéine membranaire 11 kinétoplasmide (KMP-11), dont l'expression est augmentée lors de la métacyclogénèse et au stade amastigote de *L. amazonensis*, est capable d'exacerber l'infection des macrophages péritonéaux de souris BALB/c en augmentant la sécrétion d'IL-10 (Matos, Faccioli et al. 2010, Lacerda, Cysne-Finkelstein et al. 2012). De plus, KMP-11 promeut la survie du parasite en augmentant l'activité de l'arginase des macrophages et en réduisant simultanément la production d'oxyde nitrique. KMP-11 est même présentement considérée comme une cible de vaccination potentielle (de Mendonca, Cysne-Finkelstein et al. 2015). Les amastigotes de *Leishmania* possèdent également la capacité d'imiter les cellules apoptotiques de l'hôte en exposant des PS à leur surface afin d'éviter la réponse immunitaire. Le niveau d'expression des PS à la surface des parasites a également été lié à l'infectiosité des parasites, les amastigotes recueillis des souris susceptibles BALB/c exposant plus de PS et étant plus infectieux que les amastigotes isolés des souris résistantes C57/BL6 (Wanderley, Moreira et al. 2006)(Figure 1. 25).

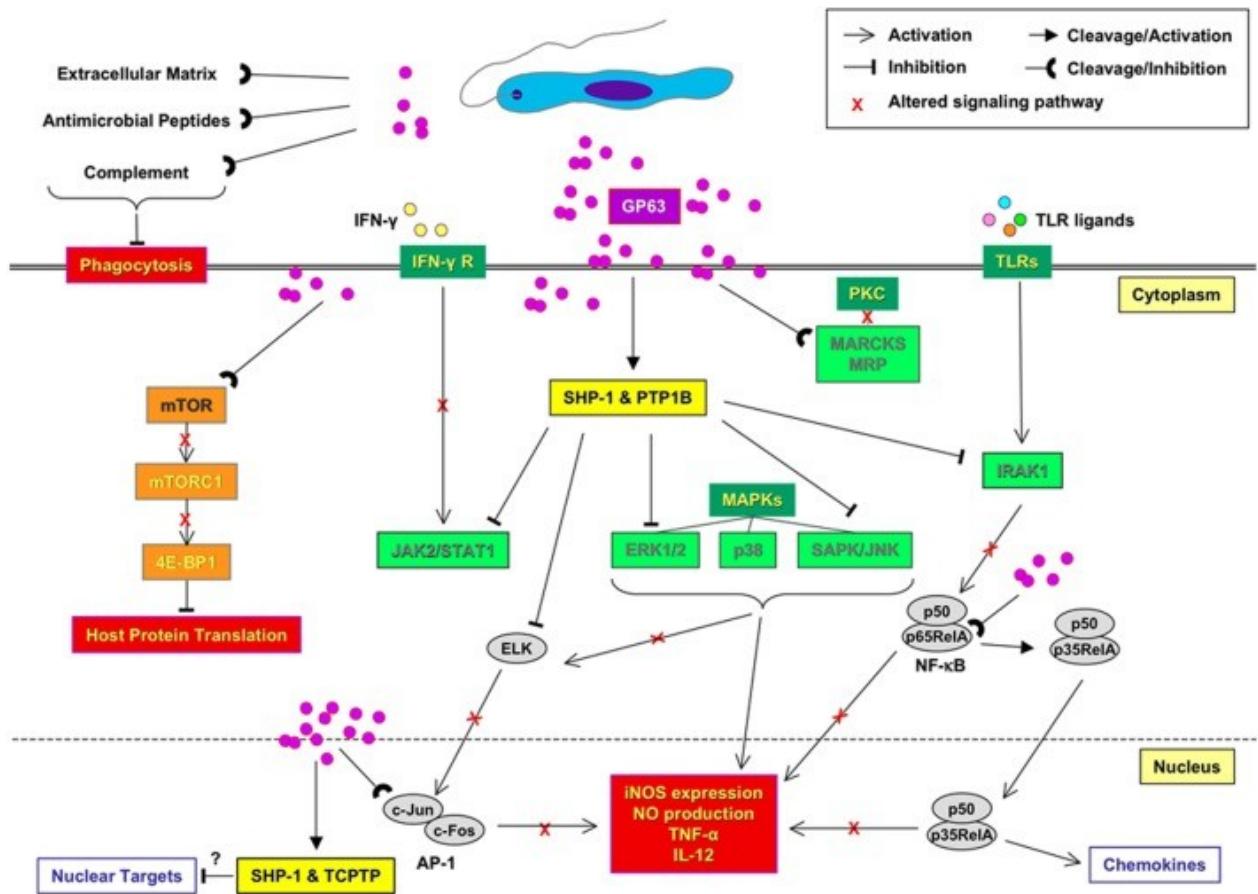


Figure 1. 25 Impact de GP63 sur les voies de signalisation

GP63 protège de la lyse par le complément et augmente la phagocytose des parasites. Une fois à la cellule, GP63 active les tyrosines phosphatases SHP-1, PTP1B et TCPTP ce qui altère les voies JAK, MAP et IRAK-1. GP63 diminue également la synthèse protéique de la cellule hôte en altérant la voie mTORC1. GP63 inhibe également PKC à travers MARCKS et inactive même les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Libre d'accès (Isnard, Shio et al. 2012).

2. 6. 3 Altération de la présentation antigénique

Une fois établi à l'intérieur des cellules de son hôte, le parasite peut débuter la modulation de la réponse immunitaire adaptative. *L. donovani* et *L. major*, par le clivage protéolytique de VAMP8 par leur GP63, inhibent la présentation antigénique croisée menant à une activation des cellules T CD8⁺ réduite (Matheoud, Moradin et al. 2013). L'importance de la présentation antigénique croisée lors de l'infection à *L. major* a été démontrée par l'utilisation de souris déficientes en Balf3 dépourvues des sous-populations de cellules dendritiques CD8a⁺ et CD103 produisant l'IL-12 et effectuant la présentation antigénique croisée (Martinez-Lopez, Iborra et al. 2015). Ces souris développent de plus grandes lésions avec une parasitémie plus importante liée à une production diminuée d'IFN-γ et une augmentation des cytokines Th2 et Th17 avec production d'immunoglobulines 1 spécifique à *Leishmania* (IgG1). La délétion de Balf3 et la délétion des sous-populations de cellules dendritiques effectuant la présentation antigénique croisée entraînent une augmentation similaire des tailles des lésions et de la parasitémie (Ashok, Schuster et al. 2014). *L. donovani* diminue également la présentation antigénique croisée en déplétant le cholestérol de la membrane plasmique (Chakraborty, Banerjee et al. 2005).

2. 6. 4 Activation des cellules T

L'inhibition de la présentation antigénique croisée n'est qu'une des diverses méthodes par laquelle *Leishmania* s'évade de la réponse immunitaire adaptative. Par exemple, *L. donovani* possède la capacité de réguler à la baisse l'expression des CD80 et ICAM-1 des cellules infectées ce qui empêche l'activation optimale des cellules T. *L. major* module quant à lui l'expression du CD40 pour anergiser les cellules T et favoriser le développement de cellules Treg dans le contexte d'une expression à la baisse du CD40. Ces cellules Treg agiront à l'encontre des cellules Th pro-inflammatoires et exacerberont l'infection (Kaye, Rogers et al. 1994, Saha, Das et al. 1995, Campbell, Ovendale et al. 1996, Martin, Agarwal et al. 2010). L'importance du CD40 lors de l'infection par *L. major* a été démontrée par l'utilisation de souris déficientes en CD40 chez qui une production significativement diminuée d'IL-12 entraînant une réponse Th2 inefficace a été observée (Campbell, Ovendale et al. 1996, Martin, Agarwal et al. 2010). GP63 possède également la capacité de cliver le co-récepteur CD4 essentiel à l'activation des cellules T (Hey, Theander et al. 1994).

3 Mise en contexte et Hypothèses

Comme précédemment mentionné, *Leishmania* peut efficacement survivre à l'intérieur des cellules immunitaires en modifiant son phagosome en PV. Cette vacuole peut être soit individuelle, petite et serré autour du parasite ou communale, large et volumineuse selon l'espèce. Les différents mécanismes menant à la formation de ces deux types de PV restent à ce jour méconnus. Nous savons que la propriété anti-fusogénique des LPG de *L. major* et *L. donovani* est directement liée à la formation de leurs vacuoles individuelles ainsi qu'à leur survie intracellulaire. Leurs LPG permettent notamment de limiter la fusion avec les lysosomes et sont ainsi essentiels à la formation des PVs individuelles (Desjardins and Descoteaux 1997, Spath, Garraway et al. 2003). Le LPG de *L. mexicana* produisant une vacuole communale, quant à lui, n'est pas essentiel à l'infection et ne possède vraisemblablement pas la même propriété anti-fusogénique (Ilg 2000). Quelques études ont démontré que les SNAREs, de petites protéines dirigeant la fusion membranaire, sont importantes pour l'élargissement des PVs communales. L'inhibition de Stx5, Stx18 et Sec22b entraîne une diminution marquée du volume des PVs communales de *L. amazonensis*. La fusion avec les lysosomes est également importante au processus d'élargissement de la PV (Wilson, Huynh et al. 2008, Canton and Kima 2012, Canton, Ndjamen et al. 2012). Les relations fusogéniques des PVs individuelles et communales sont donc fondamentalement différentes et soulignent également des mécanismes de survie fondamentalement différents.

Nous avons donc proposé que la formation des vacuoles individuelles de *L. major* et des vacuoles communales de *L. amazonensis* possèdent des profils d'événements de fusion membranaire distincts qui mènent aux différences observables entre ces espèces, tant lors de la biogenèse de leurs PV que dans leurs mécanismes de survie. Pour évaluer les disparités des événements de fusion membranaire, nous nous sommes concentrés sur l'étude des SNAREs.

Le premier but de ce projet était de développer un modèle complet de recrutement de SNAREs et de leurs membranes associées aux vacuoles individuelles de *L. major* GLC94 et aux vacuoles communales de *L. amazonensis* LV79. Ce modèle avait pour but de caractériser les différences menant à la formation de ces deux types de PV.

Les interactions entre *Leishmania* et les SNAREs ne sont par contre pas limitées à la formation des PVs. Notre groupe a précédemment démontré que *L. major*, *L. donovani* et *L. mexicana* utilisent leur GP63 afin de cliver VAMP8 (Matheoud, Moradin et al. 2013, Casgrain, Martel et al. 2016). Cette modulation à la baisse entraîne une inhibition du recrutement de GP91^{phox} aux PVs individuelles de *L. major* et limite ainsi la présentation antigénique croisée (Matheoud, Moradin et al. 2013). Le rôle de VAMP8 lors de la biogenèse des PVs communales n'avait par contre toujours pas été étudié. Notre groupe a également démontré que *L. major*, *L. donovani* et *L. mexicana* entraînent aussi une modulation à la baisse de VAMP3 (Matheoud, Moradin et al. 2013, Casgrain, Martel et al. 2016). VAMP3 et VAMP8 possèdent des rôles interchangeables et sont toutes deux retrouvées aux mêmes compartiments contenant le CMH-I. Notre second but était donc d'identifier les rôles de VAMP3 et de VAMP8 lors de l'infection par *Leishmania* et lors de la biogenèse des différentes PVs.

La réalisation des deux objectifs proposés dans le cadre de mon projet de doctorat s'est conclue par notre publication "VAMP3 and VAMP8 regulate the development and functionality of parasitophorous vacuoles housing *Leishmania amazonensis*".

CHAPITRE 2: ARTICLE

1 VAMP3 and VAMP8 regulate the development and functionality of parasitophorous vacuoles housing *Leishmania amazonensis*

VAMP3 et VAMP8 régule le développement et la fonctionnalité des vacuoles parasitophores de *Leishmania amazonensis*

Auteurs:

Olivier Séguin¹, Linh Thùy Mai¹, Sidney Whiteheart², Simona Stäger¹, Albert Descoteaux^{1*}

¹Institut national de la recherche scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Québec, Canada

²Department of Molecular and Cellular Biochemistry, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, KY, USA

Titre de la revue:

PLoS Pathogens

Soumis le 2 juillet 2020

Contribution des auteurs:

Les expériences ont été conçues par OS et AD et faite par OS, LTM. Les résultats ont été analysés par OS et LMT. SW à contribuer des réactifs/matériaux/outils d'analyse. L'article a été écrit par OS, AD et SS.

Responsable de toutes les manipulations effectuées sauf exception de l'analyse par FACS des cellules T.

1. 1 ABSTRACT

To colonize mammalian phagocytic cells, the parasite *Leishmania* remodels phagosomes into parasitophorous vacuoles that can be either tight-fitting individual or communal. The molecular and cellular bases underlying the biogenesis and functionality of these two types of vacuoles are poorly understood. In this study, we investigated the contribution of host cell Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor proteins in the expansion and functionality of communal vacuoles as well as on the replication of the parasite. The differential recruitment patterns of Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor to communal vacuoles harboring *L. amazonensis* and to individual vacuoles housing *L. major* led us to further investigate the contribution of VAMP3 and VAMP8 in the interaction of *Leishmania* with its host cell. We show that whereas VAMP8 contributes to optimal expansion of communal vacuoles, VAMP3 negatively regulates *L. amazonensis* replication, vacuole size, as well as antigen cross-presentation. In contrast, neither proteins has an impact on the fate of *L. major*. Collectively, our data support a role for both VAMP3 and VAMP8 in the development and functionality of *L. amazonensis*-harboring communal parasitophorous vacuoles.

1. 2 INTRODUCTION

Leishmania is the protozoan parasite responsible for a spectrum of diseases termed Leishmaniasis. Shortly after inoculation into a mammalian host by an infected sand fly, promastigote forms of the parasite are taken up by host phagocytes. To colonize those cells, promastigotes subvert their microbicidal machinery by targeting signaling pathways and altering intracellular trafficking (Isnard, Shio et al. 2012, Moradin and Descoteaux 2012, Matte and Descoteaux 2016), and create a hospitable niche that will allow their differentiation and replication as mammalian-stage amastigote forms (Young and Kima 2019, Batista, Najera et al. 2020). Most *Leishmania* species replicate in tight-fitting individual parasitophorous vacuoles (PVs), with the exception of species of the *L. mexicana* complex which replicate in spacious communal PVs. For tight-fitting individual PVs, replication of the parasites entails vacuolar expansion and fission, yielding two individual PVs containing one parasite each. In contrast, communal PVs occupy a large volume within infected cells and contain several amastigotes. These two different lifestyles imply that *Leishmania* uses distinct strategies to create the space needed for its replication within infected cells. Biogenesis and expansion of communal PVs is accomplished through the acquisition of membrane from several intracellular compartments (Young and Kima 2019). Hence, shortly after phagocytosis, phagosomes harboring *L. amazonensis* fuse extensively with host cell late endosomes/lysosomes and secondary lysosomes (Alexander and Vickerman 1975, Courret, Frehel et al. 2002), consistent with the notion that communal PVs are highly fusogenic (Case, Smith et al. 2016). Homotypic fusion between *L. amazonensis*-containing PVs also occurs, but its contribution to PV enlargement remains to be further investigated (Real, Pouchelet et al. 2008, Real and Mortara 2012). Interaction of these PVs with various sub-cellular compartments indicates that the host cell membrane fusion machinery is central to the biogenesis and expansion of communal PVs and is consistent with a role for Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor (SNARE) proteins in this process (Stow, Manderson et al. 2006). In this regard, *Leishmania*-harboring communal PVs interact with the host cell endoplasmic reticulum (ER) and disruption of the fusion machinery associated with the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) was shown to inhibit parasite replication and PV enlargement (Ndjamen, Kang et al. 2010, Canton and Kima 2012, Canton and Kima 2012, Canton, Ndjamen et al. 2012).

PV size and parasite replication were also shown to be controlled by LYST (Wilson, Huynh et al. 2008), a protein associated to the integrity of lysosomal size and quantity (Holland, Torgersen et al. 2014), and by the scavenger receptor CD36, possibly through the modulation of fusion between the PV and endolysosomal vesicles (Okuda, Tong et al. 2016). Interestingly, the V-ATPase subunit d2, which does not participate in phagolysosome acidification, was recently shown to control expansion of *L. amazonensis*-harboring PVs through its ability to modulate membrane fusion (Pessoa, Reis et al. 2019). In addition to regulating the biogenesis of phagolysosomes, trafficking and fusion events play a critical role in the acquisition by phagosomes of the capacity to process antigens for presentation to T cells (Houde, Bertholet et al. 2003, Mantegazza, Magalhaes et al. 2013, Sengupta, Graham et al. 2019). In the case of *Leishmania*-harboring PVs, investigations on their immunological properties revealed that *Leishmania* may interfere with the capacity of these organelles to process antigens for the activation of T cells (Kaye, Coburn et al. 1993, Prina, Jouanne et al. 1993, Lang, Hellio et al. 1994, Prina, Lang et al. 1996, Garcia, Graham et al. 1997, Kima, Ruddle et al. 1997, Antoine, Prina et al. 1998, Antoine, Lang et al. 1999, Courret, Prina et al. 1999, Antoine, Prina et al. 2004, Bertholet, Goldszmid et al. 2006, Matheoud, Moradin et al. 2013).

How parasites of the *L. mexicana* complex co-opt host cell processes to create and maintain hospitable communal PVs is poorly understood. In the case of *Leishmania* species living in tight-fitting individual PVs, two abundant components of the promastigotes surface coat modulate PV composition and properties: the glycolipid lipophosphoglycan (LPG) and the zinc-metalloprotease GP63. LPG contributes to the ability of *L. donovani*, *L. major*, and *L. infantum* to colonize phagocytes (Spath, Garraway et al. 2003, Lodge, Diallo et al. 2006, Lazaro-Souza, Matte et al. 2018) by reducing phagosome fusogenecity towards late endosomes and lysosomes, impairing assembly of the NADPH oxidase, and inhibiting phagosome acidification (Desjardins and Descoteaux 1997, Scianimanico, Desrosiers et al. 1999, Spath, Garraway et al. 2003, Lodge, Diallo et al. 2006, Vinet, Fukuda et al. 2009, Rodriguez, Gaur Dixit et al. 2011, Ueno and Wilson 2012). In contrast, LPG is not required for infection of macrophages or mice by *L. mexicana* (Ilg 2000) suggesting that LPG has little impact on the formation and properties of communal PV.

GP63 contributes to the properties and functionality of tight-fitting PVs by targeting components of the host membrane fusion machinery, including the SNARE proteins VAMP8 and Syt XI, both of which regulate microbicidal and immunological properties of phagosomes (Matheoud, Moradin et al. 2013, Arango Duque, Fukuda et al. 2014). We also previously reported that episomal expression of GP63 increases the ability of a *L. mexicana* Δ *cpb* mutant to replicate in macrophages and to generate larger communal PV (Casgrain, Martel et al. 2016). This correlated with the exclusion of the endocytic SNARE, VAMP3, from the PV, suggesting that this component of the host cell membrane fusion machinery participates in the regulation of communal PVs biogenesis.

In the present study, we investigated the recruitment and trafficking kinetics of host SNAREs to communal PVs induced by *L. amazonensis* and to tight-fitting individual PVs induced by *L. major*. We provide evidence that the endocytic SNAREs VAMP3 and VAMP8 regulate the development and functionality of communal PVs and impact the growth of *L. amazonensis*.

1. 3 RESULTS

1. 3. 1 Differential recruitment of SNAREs to PVs harboring *L. major* and *L. amazonensis*

To study the host cell machinery associated with the development of *Leishmania*-harboring PVs, we first compared the recruitment and trafficking kinetics of host SNAREs to tight-fitting individual and communal PVs. To this end, we infected BMM with either *L. major* strain GLC94 or *L. amazonensis* strain LV79 and used confocal immunofluorescence microscopy to assess the fate of SNAREs associated with various host cell compartments up to 72 h post-infection. As shown in Fig 2. 1A, we found a gradual increase in the proportion of *L. amazonensis* LV79-harboring, communal PVs, positive for the recycling endosomal v-SNARE VAMP3, whereas the proportion of VAMP3-positive tight-fitting PVs harboring *L. major* GLC94 remained below 5%. We observed a similar selective recruitment pattern to communal PVs harboring *L. amazonensis* LV79 for the plasma membrane-associated t-SNARE SNAP23 (Fig 2. 1B), the ER t-SNARE Syntaxin-18 (Fig 2.1 C), and the trans-Golgi t-SNARE Vt1a (Fig 2. 1D).

The lysosomal-associated protein LAMP1, which we used to define lysosomes (Kornfeld and Mellman 1989, Hunziker, Simmen et al. 1996), also accumulated mainly on communal PVs containing *L. amazonensis* LV79 (Fig. 2S 1A). In contrast, the late endosomal v-SNARE VAMP8 was gradually recruited to tight-fitting PVs containing *L. major*, but not to communal PVs containing *L. amazonensis* LV79 (Fig. 1E). In the case of the early endosomal t-SNARE Syntaxin-13, only a small subset (10-15%) of either *L. major* GLC94 or *L. amazonensis* LV79 were housed in a positive PV (Fig 2S 1B). These results support the notion that in contrast to *L. major*, *L. amazonensis* recruits components from both the host cell endocytic and the secretory pathways for the development and maintenance of communal PVs (Canton and Kima 2012, Young and Kima 2019).

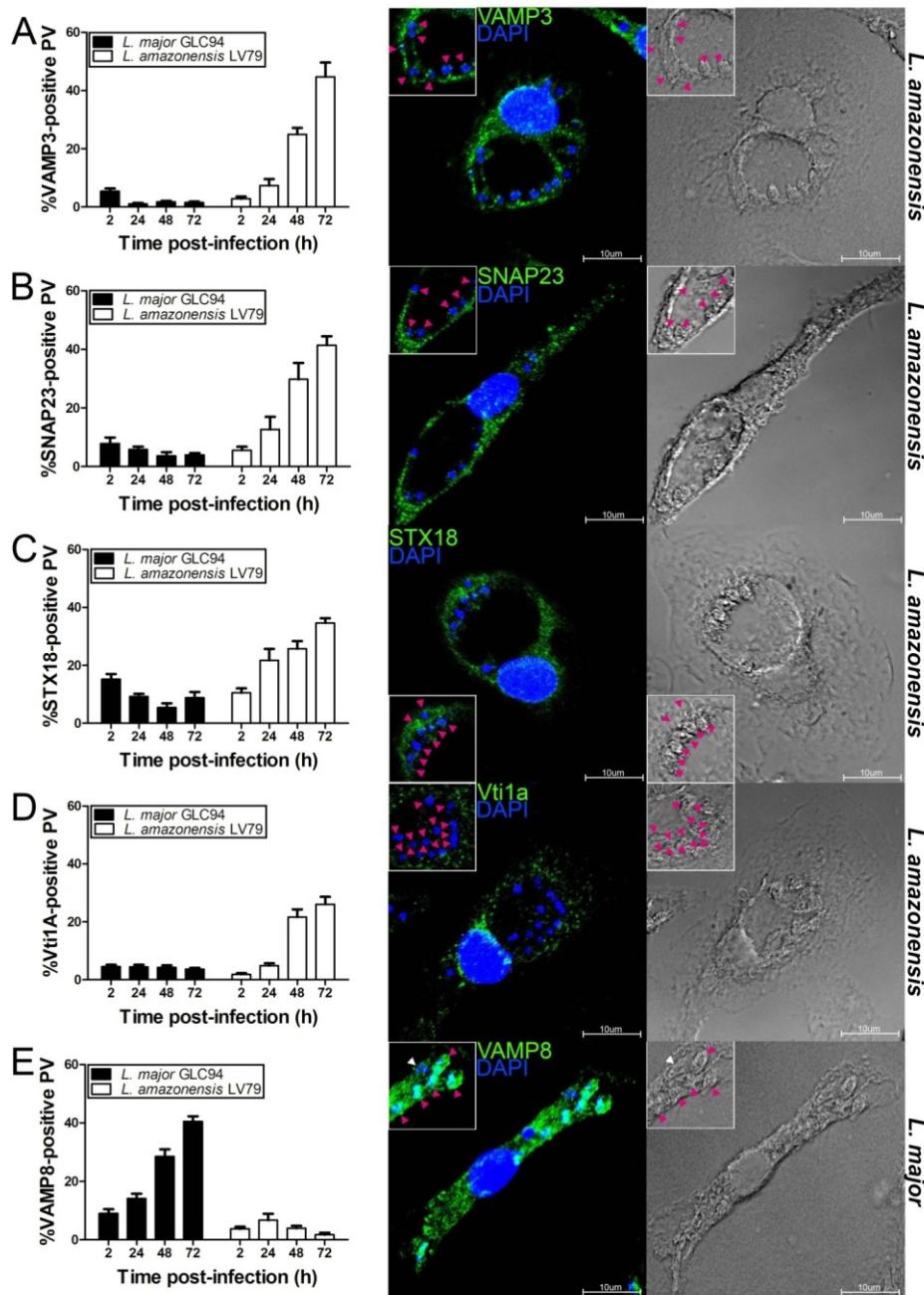


Figure 2.1 Differential recruitment of SNAREs to *Leishmania*-harboring PVs

WT BMMs were infected with serum-opsonized *L. major* GLC94 or *L. amazonensis* LV79 promastigotes and the presence of (A) VAMP3 (B) SNAP23 , (C) STX18, (D) Vti1A, and (E) VAMP8 to PVs was assessed and quantified by confocal microscopy at 2, 24, 48 and 72 h post-phagocytosis. SNAREs are shown in green and DNA in blue. Data are presented as the mean ± SEM of values from three independent experiments. Representative images of 3 experiments at 72h p.i. are shown. Insets display PV area. Pink arrowhead indicates recruitment while white arrowheads indicate absence of recruitment. Bar, 10μm.

1. 3. 2 VAMP3 and VAMP8 contribute to the control of *Leishmania* infection

Given the differential recruitment patterns of the endocytic v-SNAREs VAMP3 and VAMP8 to tight-fitting individual and communal PVs, we used them as exemplars to further investigate the development of individual and communal PVs. We first investigated the impact of these two SNAREs on parasite replication. To this end, we infected wild type, *Vamp3*^{-/-}, and *Vamp8*^{-/-} BMM with either *L. major* GLC94 or *L. amazonensis* LV79 and at various time points, we assessed parasite burden and PV surface area. In the case of VAMP8, we previously reported that its absence had no impact on the replication of *L. major* GLC94 (48). Similarly, absence of VAMP8 had no effect on the replication of *L. amazonensis* LV79 up to 72 h post-infection (Fig 2. 2A). Strikingly, absence of VAMP3 rendered BMM more permissive to the replication of *L. amazonensis* LV79, with nearly twice as many parasites per infected macrophages at 72 h post-infection (Fig 2. 2B). Moreover, PVs harboring *L. amazonensis* LV79 were significantly larger in the absence of VAMP3 (Fig 2. 2C). In contrast, absence of VAMP3 had no impact on the survival and replication of *L. major* GLC94 over a period of 72 h post-infection (Fig 2. 2B). These results indicate a role for VAMP3 in the control of *L. amazonensis* LV79 replication and of communal PVs expansion.

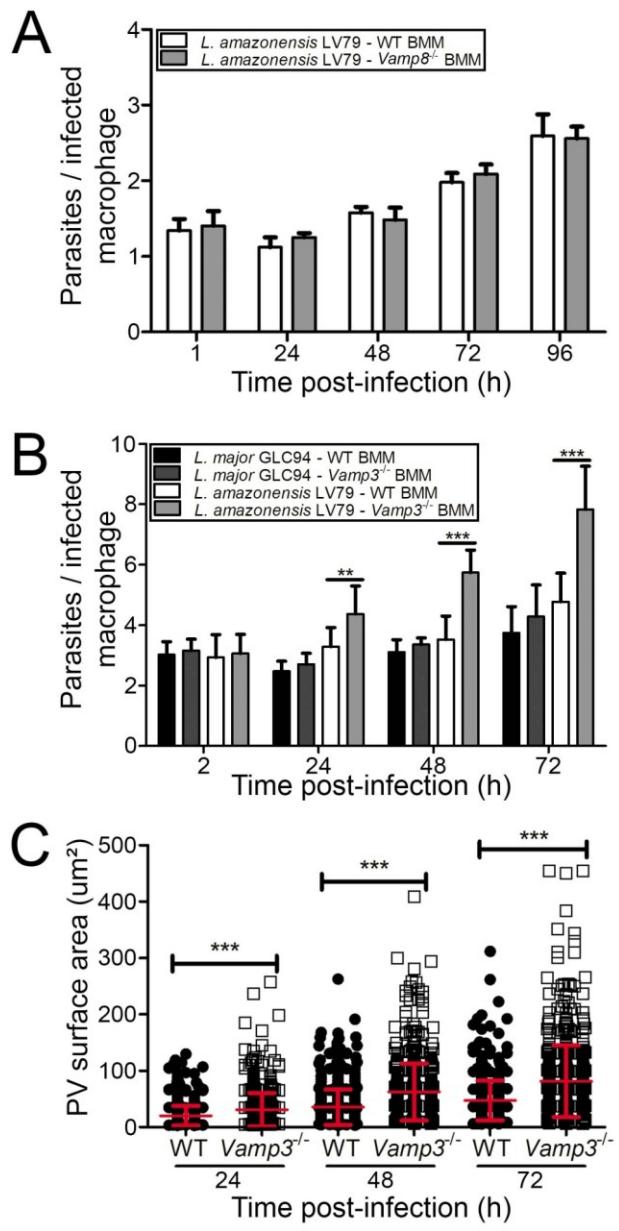


Figure 2.2 VAMP3 negatively regulates the replication of *L. amazonensis* LV79 and PV expansion

WT, *Vamp8^{-/-}*, and *Vamp3^{-/-}* BMM were infected with serum-opsonized *L. major* GLC94 or *L. amazonensis* LV79 promastigotes and at various time points post-phagocytosis, parasite replication and PV size were assessed. A. Quantification of *L. amazonensis* LV79 promastigotes replication in WT or *Vamp8^{-/-}* BMM at 1, 24, 48, 72, and 96 h post-infection. Data are presented as the mean \pm SEM of values from three independent experiments. B. Quantification of *L. major* GLC94 and *L. amazonensis* LV79 replication in WT or *Vamp3^{-/-}* at 2, 24, 48 and 72h post-infection. Data are presented as the mean \pm SEM of values from three independent experiments. **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001. C. Quantification of PV size in WT and *Vamp3^{-/-}* BMM infected with *L. amazonensis* LV79 at 24, 48 and 72h post-infection. Data are presented as a cloud with mean \pm SD of values from three independent experiments for a total of 450 PV. ***p \leq 0.001

A quantitative proteomic analysis has recently been performed on lesion-derived amastigotes of the highly virulent *L. amazonensis* strain PH8 and of strain LV79 (de Rezende, Kawahara et al. 2017). Interestingly, the virulence factor GP63 was found to be expressed at higher levels by *L. amazonensis* PH8 amastigotes (de Rezende, Kawahara et al. 2017). Our previous report suggesting that GP63 contributes to the expansion of large communal PVs harboring *L. mexicana* (Casgrain, Martel et al. 2016), led us to compare PVs harboring these two *L. amazonensis* strains. First, we assessed the levels of GP63 expressed by both strains by Western blot analysis of infected BMM lysates for various time points after phagocytosis (Fig 2. 3A). Higher levels of GP63 were present in BMM infected with *L. amazonensis* PH8 compared to BMM infected with *L. amazonensis* LV79 at 2 h post-phagocytosis. In contrast, at later time points (24, 48, and 72 h post-phagocytosis), we detected higher levels of GP63 in BMM infected with LV79 compared to BMM infected with PH8 (Fig. 2. 3A). We observed a similar pattern for the activity of GP63 in lysates of infected BMM (Fig. 2. 3B). Since both VAMP3 and VAMP8 are down-modulated in infected macrophages (Matheoud, Moradin et al. 2013, Casgrain, Martel et al. 2016, Matte, Casgrain et al. 2016), we assessed the levels of those SNAREs by Western blot analysis of lysates of BMM infected for 2, 24, and 72 h with either strains of *L. amazonensis*. As shown in Fig 2. 3C, both SNAREs were down-modulated by nearly 50% at 72 h post-phagocytosis in infected BMM. Using confocal immunofluorescence microscopy, we compared the kinetics of VAMP3 recruitment to PVs in BMM infected for various time points with either strains of *L. amazonensis*. Remarkably, data shown in Fig 2. 3D revealed that in contrast to PVs harboring *L. amazonensis* LV79, there was no significant recruitment of VAMP3 to PVs containing *L. amazonensis* PH8. Evidence that VAMP3 and VAMP8 may exert overlapping function within the endocytic pathway and that both SNAREs can substitute for each other (Wang, Ng et al. 2004) led us to assess the fate of VAMP8 during infection of BMM with both strains of *L. amazonensis*. Unexpectedly, we observed a significant recruitment of VAMP8 to *L. amazonensis* PH8-harboring PVs at 48 h and 72 h post-infection (Fig 2. 3E). Together, these findings suggest that recruitment of VAMP3 and VAMP8 to *L. amazonensis*-harboring communal PVs is strain-dependent.

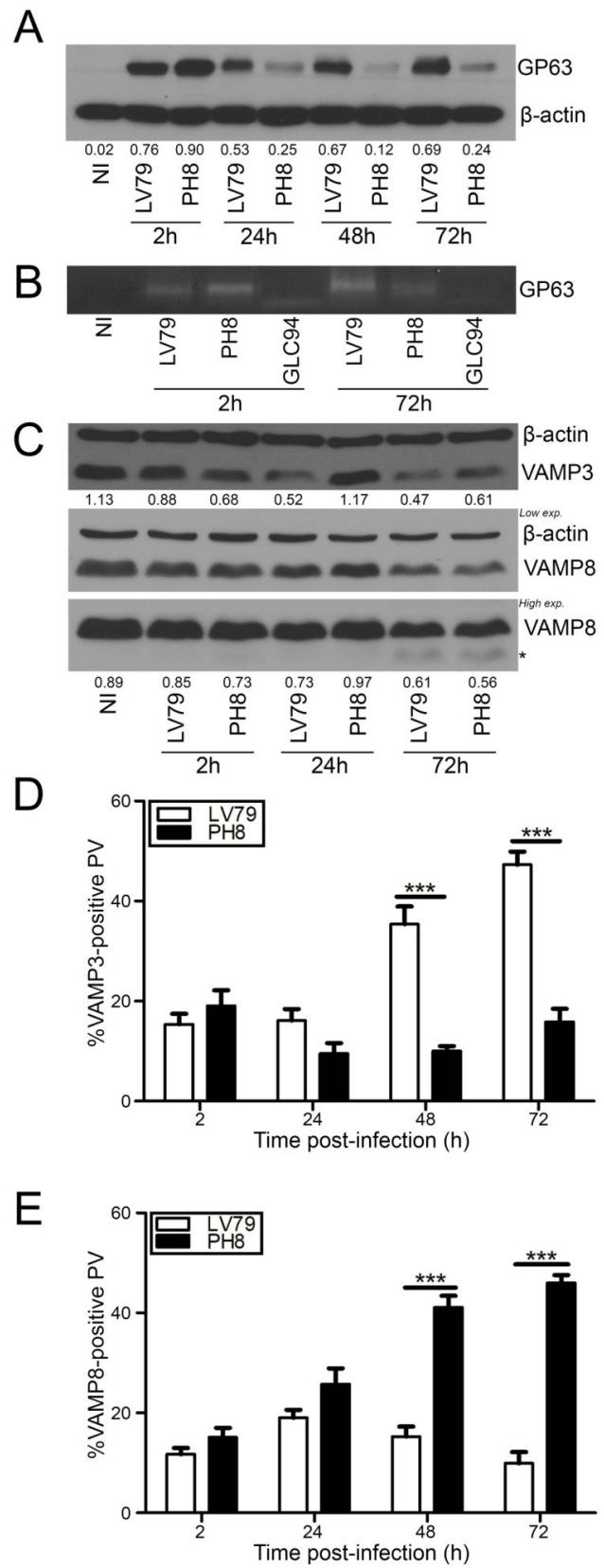


Figure 2. 3 Strain-specific differences in the recruitment of VAMP3 and VAMP8 to PVs harboring *L. amazonensis*

Lysates of BMMs infected for 2, 24, 48 and 72h with serum-opsonized *L. amazonensis* LV79 or PH8 promastigotes were prepared. A. GP63 levels were assessed by western blotting. Representative blot of 3 independent experiments is shown. Band intensities were normalized to β -actin. B. GP63 activity was determined by zymography. Representative image of 3 experiments is shown. C. BMMs were infected for 2, 24 and 72h with serum-opsonized *L. amazonensis* LV79 or *L. amazonensis* PH8 promastigotes and integrity of both VAMP3 and VAMP8 cleavage was assessed through immunoblot analysis. Representative blots of 3 experiments are shown. Band intensities were normalized to β -actin.* Indicates cleavage fragments. D and E. BMMs were infected with opsonized *L. amazonensis* LV79 or *L. amazonensis* PH8 promastigotes and localization of VAMP3 (D) and VAMP8 (E) to PVs was quantified by confocal microscopy at 2, 24, 48 and 72h. Data are presented as the mean \pm SEM of values from three independent experiments. ***p \leq 0.001

Given these strain-dependent differences in the recruitment of VAMP3 and VAMP8 to communal PVs, we assessed the impact of those SNAREs on the replication of both strains of *L. amazonensis* and on PV expansion. We infected either WT, *Vamp3*^{-/-}, or *Vamp8*^{-/-} BMM and we determined parasite burden and PV size at various time points post-phagocytosis. As shown in Fig 2. 4A, VAMP3-deficient BMM were more permissive than WT BMM for the replication of both *L. amazonensis* strains. Additionally, for both strains, absence of VAMP3 led to the formation of larger PVs at 48 h and 72 h post-infection (Fig 2. 4B), consistent with a role for that SNARE in the control of PV size and *L. amazonensis* replication.

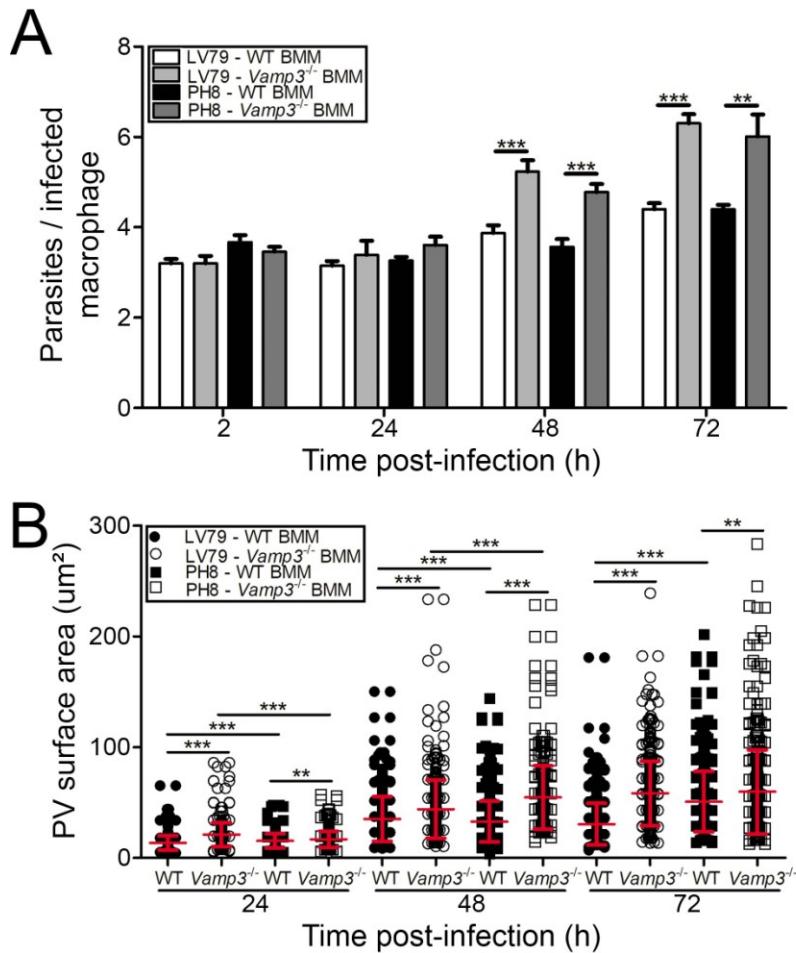


Figure 2.4 Impact of VAMP3 on the replication of *L. amazonensis* LV79 and PH8 and PV size

WT and *Vamp3^{-/-}* BMM were infected with serum-opsonized *L. amazonensis* LV79 and PH8 promastigotes and at various time points post-phagocytosis, parasite replication and PV size were assessed. A. Parasite replication, data presented as the mean \pm SEM of values from three independent experiments. **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001. B. PV surface area, data are presented as a cloud with mean \pm SD of values from three independent experiments for a total of 450 PV. **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001.

In contrast, whereas absence of VAMP8 had no impact on the replication of *L. amazonensis* LV79, it significantly restricted the replication of strain PH8 at 24, 48, and 72 h post-phagocytosis (Fig 2. 5A). These results suggest that VAMP8 participates in fusion events required for the replication of *L. amazonensis* PH8. Interestingly, for both *L. amazonensis* strains, PV size was reduced in the absence of VAMP8 (Fig 2. 5B), indicating a role for this SNARE in the regulation of PV expansion. In addition, these results suggest that there is no direct correlation between PV size and parasite replication.

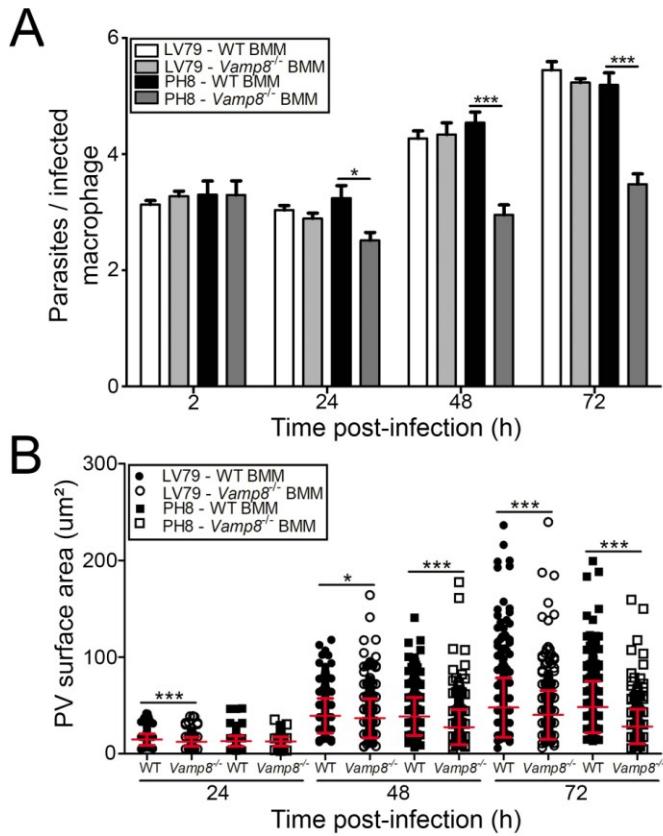


Figure 2.5 Impact of VAMP8 on the replication of *L. amazonensis* LV79 and PH8 and PV size

WT and *Vamp8^{-/-}* BMM were infected with serum-opsonized *L. amazonensis* LV79 and PH8 promastigotes and at various time points post-phagocytosis, parasite replication and PV size were assessed. A. Parasite replication, data presented as the mean \pm SEM of values from three independent experiments. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$. B. PV surface area, data are presented as a cloud with mean \pm SD of values from three independent experiments for a total of 450 PV. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

1. 3. 3 VAMP3 negatively regulates antigen cross-presentation

Given the impact of VAMP3 on parasite replication and PV size, we sought to investigate whether absence of VAMP3 alters communal PV functionality. We therefore elected to focus on antigen cross-presentation, a phagosomal function which has received little attention in the context of *L. amazonensis* infection. To this end, we first compared the capacity of WT and *Vamp3^{-/-}*-bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) to cross-present ovalbumin following internalization of OVA-coated latex beads. As shown in Fig 2. 6A, at 6 h post-phagocytosis, OVA-pulsed WT and *Vamp3^{-/-}* BMDC were equally efficient at activating OVA₂₅₇₋₂₆₄-specific B3Z hybridomas, as previously reported for BMDC fed with *E. coli*-OVA (Nair-Gupta, Baccarini et al. 2014).

Next, we generated *L. major* GLC94 and *L. amazonensis* strains LV79 and PH8 expressing ovalbumin (OVA) at similar levels (Fig 2. 6B) and used them to infect WT and *Vamp3^{-/-}* BMDC for 48 h prior to adding OVA-specific OT-I CD8⁺T cells (52). At this time, both *L. amazonensis*-OVA strains were present in enlarged PVs, whereas *L. major*-OVA replicated in tight individual PVs (Fig 2S 2). We then assessed cross-presentation by measuring the expression of T cell activation markers CD69 and CD44 on OT-I T cells following exposure to *L. amazonensis*-OVA- and *L. major*-OVA- infected BMDC. As shown in Figures 2. 6C-E, *L. major*-OVA and *L. amazonensis*-OVA efficiently suppressed the ability of WT infected BMDC to cross-present ovalbumin and activate OT-I CD8 T cells. Interestingly, significantly lower frequencies of CD44⁺ OT-I T cells (Fig. 2. 6C) and CD69 MFI levels (Fig. 2. 6D) were observed for OT-I T cells exposed to *L. amazonensis*-OVA-infected compared to *L. major*-infected BMDC, suggesting that *L. amazonensis* may be more efficient at inhibiting cross-presentation than *L. major*. Similar to WT BMDC, *L. major*-OVA-infected *Vamp3^{-/-}* BMDC also failed to prime OT-I T cells. In contrast, cross-presentation was significantly increased in VAMP3-deficient BMDC infected with either strain of *L. amazonensis*-OVA. Collectively, our results suggest that *L. amazonensis* efficiently suppresses antigen cross-presentation in BMDC, and that VAMP3 negatively regulates the ability of communal PVs harboring *L. amazonensis* to cross-present antigens.

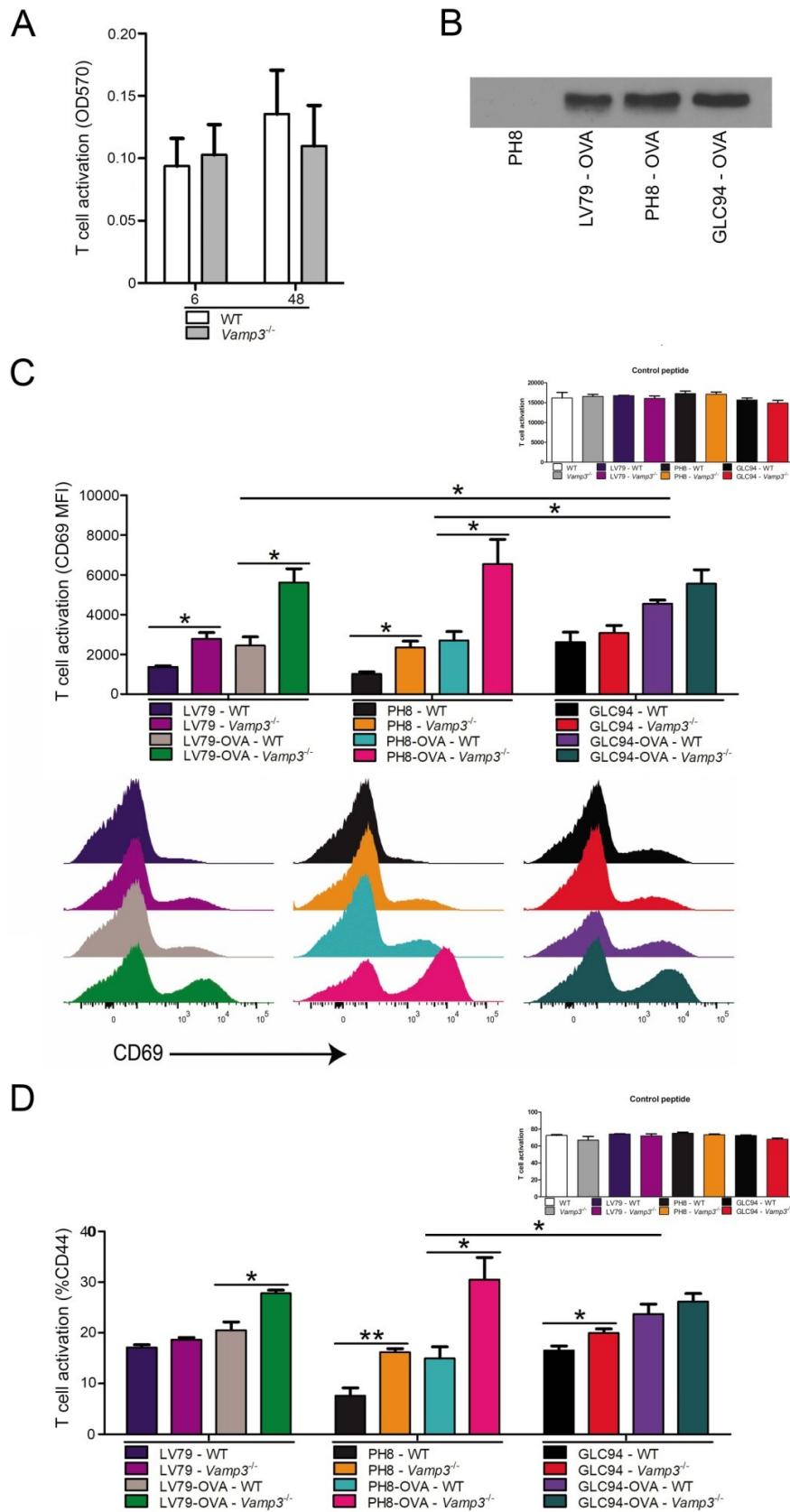


Figure 2. 6 VAMP3 negatively regulates antigen cross-presentation from communal PVs harboring *L. amazonensis*

A. OVA-coated beads were fed to WT and *Vamp3*-/- BMDC and cross-presentation was evaluated using B3Z T cell hybridoma after 5h incubation at 37°C (570nm). Data are presented as the mean ± SEM of values from three independent experiments. B. Expression of ovalbumin by *L. amazonensis*-OVA LV79, *L. amazonensis*-OVA PH8 and *L. major*-OVA GLC94 was assessed by western blotting. Representative blot of two experiments is shown. C and D. WT and *Vamp3*-/- BMDC were infected with either *L. major* GLC94, *L. amazonensis* LV79 and *L. amazonensis* PH8 or *L. major*-OVA GLC94, *L. amazonensis*-OVA LV79, and *L. amazonensis*-OVA PH8. SIINFEKL peptide was added for assessment of surface MHC class I expression to non-infected and infected BMDCs (upper graph). BMDCs infected or not for 48 h were incubated with CD8 OT-1 T cells, and cross-presentation was assessed by measuring the levels of CD69 (C) or CD44 expression (D) by flow cytometry. Histogram and FACS histograms show one representative experiment of 6 independent experiments *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01

1. 4 DISCUSSION

Biogenesis and functionality of phagosomes depend on intracellular vesicular trafficking and membrane fusion events mediated by SNAREs (Stow, Manderson et al. 2006, Cebrian, Visentin et al. 2011, Matheoud, Moradin et al. 2013, Dingjan, Linders et al. 2018). In this study, we compared and analyzed the recruitment and trafficking kinetics of host cell SNAREs to tight-fitting individual PVs induced by *L. major* and to large communal PVs induced by *L. amazonensis*. Our results revealed differences in the components of host cell membrane fusion machinery associated to these two types of PVs, consistent with the notion that tight-fitting individual PVs and large communal PVs differ in their capacity to interact with host cell compartments. Moreover, we obtained evidence that both VAMP3 and VAMP8 regulate the development and functionality of *L. amazonensis*-harboring PVs.

Previous studies revealed that although VAMP3 plays no major role in phagocytosis (Allen, Yang et al. 2002), this SNARE contributes to host defense against infections by regulating the delivery of TNF at the nascent phagocytic cup through focal exocytosis and by contributing to the formation of autophagosomes during xenophagy (Bajno, Peng et al. 2000, Murray, Kay et al. 2005, Nozawa, Minowa-Nozawa et al. 2017). Moreover, VAMP3 may be co-opted by vacuolar pathogens to create and develop their intracellular replicative niches. Hence, in macrophages infected with *Yersinia pseudotuberculosis*, VAMP3 participates in the formation of single-membrane LC3-positive vacuoles containing the bacteria, although it is not known whether VAMP3 influences *Yersinia* replication (Ligeon, Moreau et al. 2014). Using host cells co-expressing EGFP-VAMP3 and tetanus toxin (which cleaves VAMP3), Campoy and colleagues obtained evidence that VAMP3 is involved in the biogenesis and enlargement of the *Coxiella burnetti* replicative vacuoles, by mediating fusion of these replicative vacuoles with multivesicular bodies (Campoy, Mansilla et al. 2013). In the case of *Brucella melitensis*, although infection increases VAMP3 expression in the mouse macrophage cell line J774, its silencing had no effect on the survival and replication of the bacteria, indicating that VAMP3 is not essential for the biogenesis and expansion of *Brucella*-containing vacuoles (Castaneda-Ramirez, Puente et al. 2012). For *Leishmania*, our results revealed no role for VAMP3 in the replication of *L. major*, which resides in individual tight-fitting PVs.

In contrast, we found that VAMP3 is gradually recruited to *L. amazonensis* LV79-harboring PV starting at 24 h post-infection, when PV expansion becomes noticeable. Unexpectedly, we observed increased replication of *L. amazonensis* and increased PV size in the absence of VAMP3, suggesting that this SNARE may be part of a complex that controls the development of communal PVs, possibly by negatively regulating membrane fusion events as we previously reported for the regulator of membrane fusion complexes synaptotagmin XI (Arango Duque, Fukuda et al. 2013). Of interest, a negative regulatory role for VAMP3 has recently been reported in platelets, where absence of VAMP3 led to enhanced platelet spreading and clot retraction (Banerjee, Joshi et al. 2017). In this context, it was proposed that absence of VAMP3 could increase the formation of other SNARE complexes and thus increase the exocytosis events needed for spreading. One may thus envision that absence of VAMP3 may favor the formation of SNARE complexes that lead to increased fusion events required for PV expansion. It is also possible that VAMP3 acts as an inhibitory SNARE (or i-SNARE) (Varlamov, Volchuk et al. 2004), where it would compete with and substitute for a fusogenic subunit, thereby inhibiting fusion and limiting PV expansion. Alternatively, VAMP3 may mediate the delivery of an anti-microbial cargo to PV harboring *L. amazonensis*, thereby limiting parasite replication and PV expansion. Clearly, our study revealed a novel role for VAMP3 in the control of communal PV expansion and *L. amazonensis* replication, highlighting the fact that depending of the pathogen, a molecule involved in regulating vesicular trafficking and membrane fusion events may either favor or impair pathogen growth, as recently described for Rab11 in the context of *L. pneumophila* infection (Anand, Choi et al. 2020). Further studies will be aimed at elucidating the underlying mechanism(s).

Our previous work revealed that whereas VAMP8 has no influence on the survival and replication of *L. major*, it contributes to the ability of phagosomes to cross-present antigens by regulating the phagosomal recruitment of NOX2 (Matheoud, Moradin et al. 2013, Matte, Casgrain et al. 2016). Here, we obtained evidence that absence of VAMP8 leads to reduced expansion of communal PVs harboring *L. amazonensis*. This suggests that VAMP8 participates to the recruitment of membrane required for the expansion of communal PVs by mediating their interactions with endosomes/lysosomes, and/or by mediating homotypic fusion among communal PVs.

The observation that reduction of PV size in the absence of VAMP8 impacted the replication *L. amazonensis* PH8, but not of *L. amazonensis* LV79, is intriguing and suggests that *L. amazonensis* replication does not absolutely correlate with PV expansion. Hence, whether parasite growth is the main signal governing PV expansion remains a lingering question (Antoine, Prina et al. 1998)(27) for which there has been little data to provide a clear answer. It will thus be of interest to further investigate the nature of the host factors and parasite effectors that modulate PV expansion. The different fates of *L. amazonensis* LV79 and PH8 in *Vamp8^{-/-}* macrophages illustrate the perils of drawing conclusions based on experiments performed with a single *Leishmania* strain or isolate (da Silva Vieira, Arango Duque et al. 2019).

Cross-presentation of microbial peptides on major histocompatibility (MHC) I molecules is an important host defense mechanism aimed at deploying CD8⁺ T cells responses against intracellular pathogens, including *Leishmania* (Hill, Awwad et al. 1989, Muller, Pedrazzini et al. 1991, Belkaid, Von Stebut et al. 2002, Uzonna, Joyce et al. 2004, Stager and Rafati 2012, Blander 2016, Blander 2018). Previous studies revealed that phagosomes acquire, through a series of interactions with other organelles, the machinery required to become self-sufficient for antigen cross-presentation (Houde, Bertholet et al. 2003, Mantegazza, Magalhaes et al. 2013, Sengupta, Graham et al. 2019). However, the involvement of the various vesicular trafficking pathways in this process remains to be fully understood (Blander 2016, Cruz, Colbert et al. 2017, Blander 2018). To date, a number of SNAREs associated to these pathways have been shown to regulate the trafficking events involved in the acquisition of the phagosomal cross-presentation machinery, including the ER/ERGIC SNARE Sec22b (Cebrian, Visentin et al. 2011) and the endocytic SNAREs VAMP8 and SNAP-23 (Matheoud, Moradin et al. 2013, Nair-Gupta, Baccarini et al. 2014). Sec22b was shown to mediate the delivery of the MHC-I peptide loading complex from the ERGIC to phagosomes through pairing with the plasma membrane SNARE syntaxin-4 present on phagosomes (Cebrian, Visentin et al. 2011). Recruitment of the NOX2, whose activity is crucial to regulate the levels of phagosomal proteolysis required for optimal cross-presentation (Savina, Jancic et al. 2006), is mediated by both VAMP8 and SNAP-23 (Sakurai, Hashimoto et al. 2012, Matheoud, Moradin et al. 2013).

Our finding that absence of VAMP3 increases the level of cross-presentation by *L. amazonensis*-harboring communal PVs illustrates the complex regulation of this process and indicates that communal PVs do not behave like model phagosomes used to define the molecular bases of cross-presentation (Houde, Bertholet et al. 2003, Savina, Peres et al. 2009, Sengupta, Graham et al. 2019). Further characterization of communal PVs induced by *L. amazonensis* and of the role of VAMP3 in their formation may therefore yield novel information on the process of antigen cross-presentation in the context of cells infected with a pathogen residing in communal vacuoles.

We provided evidence that both VAMP3 and VAMP8 participates in the development and functionality of *L. amazonensis*-harboring communal PVs. Whereas VAMP3 has a detrimental impact on parasite replication, PV size, and antigen cross-presentation, VAMP8 contributes to PV expansion but does not affect replication. In both cases, the exact mechanisms remain to be elucidated. This is an interesting issue since both VAMP3 and VAMP8 have previously been shown to exert overlapping function and they can substitute for each other (Wang, Ng et al. 2004). Depending on the cell type and of the intracellular compartment, both SNAREs form complexes with SNAP-23 and various syntaxins. To shed more light on the biology of *L. amazonensis*-harboring PVs, future studies will be aimed at identifying the *trans*-SNARE complexes formed by VAMP3 and VAMP8 during biogenesis and expansion of communal PVs. Since phagosomes play a central role in innate and adaptive immunity, a better understanding of the biology of communal PVs containing *L. amazonensis* may provide new insights into the mechanisms used by this parasite to develop in a communal PV and to evade the immune system, which may be useful for the design of future interventions to prevent or treat infection.

1. 5 MATERIALS AND METHODS

1. 5. 1 Ethics statement

Experiments involving mice were done as prescribed by protocol 1406-02, which was approved by the *Comité Institutionnel de Protection des Animaux* of the *Institut national de la recherche scientifique*. These protocols respect procedures on good animal practice provided by the Canadian Council on animal care.

Vamp8^{-/-} mice were obtained from Dr Wan Jin Hong (A Star Institute, Singapore), *Vamp3^{-/-}* mice were obtained from Dr Sidney Whiteheart (University of Kentucky), and OT-I mice were purchased from Jackson Laboratory. All mice were bred and housed at the Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) animal facility under specific pathogen-free conditions and used at 6-12 weeks of age.

1. 5. 2 Antibodies

The rabbit polyclonal anti-VAMP3, anti-VAMP8, anti-SNAP23, anti-Syntaxin 13, anti-Syntaxin 18 and the guinea pig polyclonal anti-Vti1b antibodies were obtained from Synaptic Systems (SySy). The rat monoclonal anti-LAMP-1 antibody was developed by J. T. August (1D4B) and obtained through the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa, and the National Institute of Child Health and Human Development. The mouse monoclonal anti-GP63 antibody was provided by Dr. W. R. McMaster (University of British Columbia). FACS analysis were completed with fluorochrome conjugated antibodies against CD3-PECy7 (clone 14S-2C11; BD Bioscience), CD8-PB (clone 53-6.7; BD Bioscience), CD44-APC (clone IM7; BD Bioscience) and CD69-PE (clone H1.2F3; eBioscience).

1. 5. 3 Bone marrow-derived macrophages and dendritic cells

We used *Vamp8^{-/-}* (50) and *Vamp3^{-/-}* (Yang, Mora et al. 2001) mice which were maintained on a mixed C57BL/6-129/Sv/J background, and wild type mice were matched littermates. Bone marrow-derived macrophages (BMM) were differentiated from the bone marrow of 6- to 8-week-old mice. Cells were differentiated in complete medium (DMEM [Life Technologies] supplemented with L-glutamine [Life Technologies], 10% heat-inactivated FBS [Gibco], 10 mM HEPES [Bioshop] at pH 7.4, and antibiotics [Life Technologies]) containing 15% v/v L929 cell-conditioned medium as a source of M-CSF at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ for a week. To render BMM quiescent prior to experiments, cells were transferred to 6- or 24-well tissue culture microplates (TrueLine) and kept for 16 h in complete DMEM without L929 cell-conditioned medium. Bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) were differentiated from the bone marrow of 6- to 8-week-old mice.

Cells were differentiated in complete medium (RPMI [Life Technologies] supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 10 mM HEPES [Bioshop] at pH7.4 and antibiotics [Life Technologies]) containing 10% v/v GM-CSF at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ for a week. Sixteen hours prior to infection, non-adherent cells were transferred in 96-well tissue culture microplates (TrueLine) and kept in RPMI-1640 containing 10% heat-inactivated FBS and 5% v/v GM-CSF.

1. 5. 4 Parasite strains and culture

The *Leishmania* strains used in this study were *L. major* GLC94 (MHOM/TN/95/GLC94 zymodeme MON25, obtained from Dr Guizani-Tabbane, Institut Pasteur de Tunis), *L. amazonensis* LV79 (MPRO/BR/72/M1841, obtained from the American Type Culture Collection), and *L. amazonensis* PH8 (IFLA/BR/67/PH8, obtained from the American Type Culture Collection). Promastigotes were obtained from lesion-derived amastigotes and were cultured in *Leishmania* medium (Medium 199 [Sigma-Aldrich] with 10% heat-inactivated FBS, 40 mM HEPES at pH 7.4, 100 µM hypoxanthine, 5 µM hemin, 3 µM biopterin, 1 µM biotin, and antibiotics), in an incubator at 26°C. Promastigotes expressing a secreted form of OVA (*L. major*-OVA and *L. amazonensis*-OVA) were generated by electroporating the pKS-NEO SP:OVA construct, which encodes a fusion protein containing the signal peptide of the *L. donovani* 3' nucleotidase-nuclease fused to a portion of OVA protein (139–386) containing both MHC class I OVA257-264- and class II OVA323-339-restricted epitopes (Bertholet, Debrabant et al. 2005) kindly provided by Dr Alain Debrabant, FDA). Transfected parasites were grown in *Leishmania* medium supplemented with 50 µg/ml G418.

1. 5. 5 Infection of macrophages

Promastigotes in late stationary phase were opsonised with C5-deficient serum from DBA/2 mice prior to infections. Phagocytosis was synchronized by incubating macrophages and parasites at 4°C for 10 min and spun at 167 g for 1 min. Internalization was then triggered by transferring the plates to 34°C. Two hours post-infection, macrophages were washed twice with complete DMEM to remove non-internalized parasites. Cells were then prepared for confocal immunofluorescence microscopy.

1. 5. 6 Confocal immunofluorescence microscopy

Cells adhered to coverslips were fixed with 2% paraformaldehyde (Canemco and Mirvac) for 40 min and blocked/permeabilized for 17 min with a solution of 0.05% saponin, 1% BSA, 6% skim milk, 2% goat serum, and 50% FBS followed by 2 h incubation with primary antibodies and a subsequent incubation with a suitable secondary antibodies in PBS for 45 min (anti-rabbit Alexa Fluor 488 and anti-rat 568; Molecular Probes) and DAPI in PBS for 15 min (Life technologies). Three washes in PBS took place after every step. After the final washes, Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates) was used to mount coverslips on glass slides, and coverslips were sealed with nail polish (Sally Hansen). Macrophages were visualised with the LSM780 microscope 63X objective (Carl Zeiss Microimaging) and images were taken in sequential scanning mode. Image analysis and vacuole size measurements were performed with the ZEN 2012 software. The vacuole size measurements were accomplished via the closed Bezier tool on ZEN 2012 that calculates the surface of a selected area on LAMP-1 and DAPI stained coverslips.

1. 5. 7 Lysis, SDS-PAGE and Western blotting

Adherent macrophages in 6-well plates were washed with PBS containing 1 mM sodium orthovanadate and 10 mM 1,10-phenanthroline (Roche) on ice prior to lysis. Cells were then scraped in lysis buffer containing 1% Nonidet P-40 (Caledon), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) (Bioshop), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), 10 mM 1,10-phenanthroline, and phosphatase and protease inhibitors (Roche). The lysates were left on ice for 10 min then stored at -70°C. Lysates were thawed on ice and centrifuged for 10 min to remove insoluble matter and then quantified. 10ug of samples were boiled (100°C) for 6 min in SDS sample buffer and migrated in 10% SDS-PAGE gels then transferred onto Hybond-ECL membranes (Amersham Biosciences). The membrane was subsequently blocked for 1h in TBS1X-0.1% Tween containing 5% skim milk, incubated overnight at 4°C with primary antibodies (diluted in TBS 1X-0.1% Tween containing 5% BSA) and incubated 1 h at room temperature with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies. 3 washes took place after every step. Membranes were finally incubated in ECL (GE Healthcare) and immunodetection was achieved via chemiluminescence.

1. 5. 8 Antigen cross-presentation

BMDC were infected for 48 h with WT *L. amazonensis* LV79-OVA, *L. amazonensis* PH8-OVA or *L. major* GLC94-OVA promastigotes, or with promastigotes not expressing OVA. Cells were then washed and fixed for 5 min at 23°C with 1% (w/v) paraformaldehyde, followed by three washes in complete medium containing 0.1 M glycine. OT-I T cells were enriched from splenocytes of OT-I mice by magnetic cell sorting (MACS) using a CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotech) as previously described (Hammami, Charpentier et al. 2015). They were then added to the culture for 16 h. The SIINFEKL peptide was used as control for T cell activation and expansion. Antigen cross-presentation was assessed by measuring surface expression modulation of CD69 and CD44 within the CD3⁺CD8a⁺Va2⁺ population as markers for T cell activation. Cells were analysed after fixation with 2% (w/v) paraformaldehyde using the BD LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson). Samples were analyzed with Flowjo software.

For OVA latex bead assays, at 6 h post-infection, 10⁵ BMDC were incubated with uncoated or OVA-coated 0.8 µm latex beads for 1 h of pulse. Cells were incubated for a 3 h chase, fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde, and washed in complete medium containing 0.1 M glycine. Cells were then cultured for 16 h at 37°C together with 10⁵ B3Z cells for analysis of T cell activation. B3Z cells, which express β-galactosidase upon specific recognition of the OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL)-H-2K^b complex, were washed in PBS and lysed (0.125 M Tris base, 0.01 M cyclohexane diaminotetraacetic acid, 50% [v/v] glycerol, 0.025% [v/v] Triton X-100, and 3 mM dithiothreitol [pH 7.8]). A β-galactosidase substrate buffer (1 mM MgSO₄ × 7 H₂O, 10 mM KCl, 0.39 M NaH₂PO₄ × H₂O, 0.6 M Na₂HPO₄ × 7 H₂O, 100 mM 2-mercaptoethanol, and 0.15 mM CPRG [pH 7.8]) was added for 2-4 h at 37°C. Cleavage of CPRG was quantified in a spectrophotometer as absorbance at 570 nm, reflecting T cell activation after cross-presentation.

1. 6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank W. J. Hong for the *Vamp8^{-/-}* mice, L. Guizani-Tabbane for the *L. major* GLC94 strain, W.R. McMaster for the anti-GP63 antibody, and J. Tremblay for assistance in immunofluorescence experiments.

1. 7 FUNDING

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants PJT-156416 to AD and PJT-159647 to SS, and a Fiocruz-Pasteur-University of Sao Paulo grant. AD is the holder of the Canada Research Chair on the Biology of intracellular parasitism. OS was supported by a Doctoral Award from the Fonds de recherche du Québec - Santé. LTM was supported by a studentship from the Fondation Armand-Frappier. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

1. 8 SUPPORTING INFORMATION

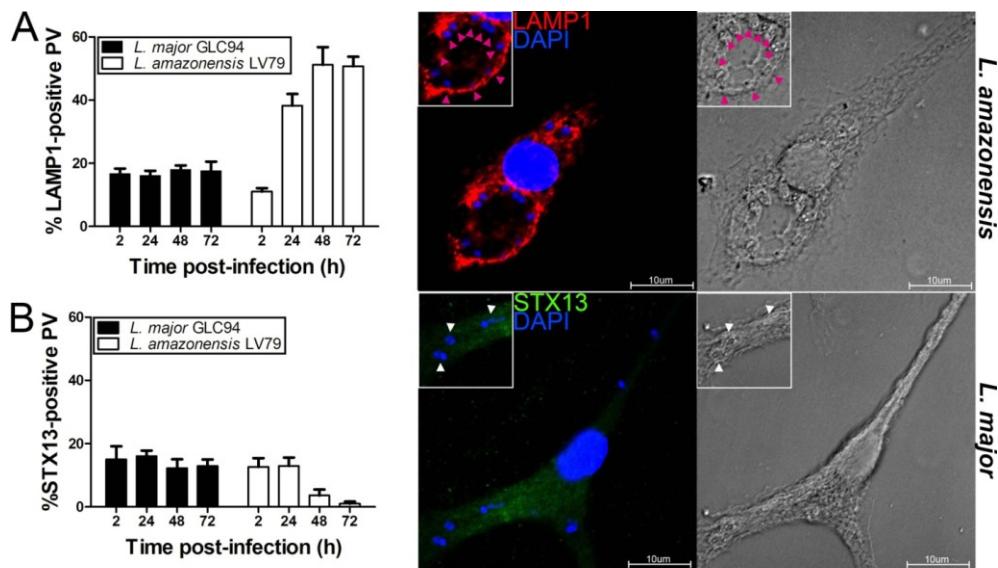


Figure 2S. 1 Lysosomes and early endosomes recruitment

BMM were infected with serum-opsonized *L. major* GLC94 or *L. amazonensis* LV79 promastigotes and the presence of (A) LAMP1 and (B) Stx13 to PVs was assessed and quantified by confocal microscopy at 2, 24, 48 and 72 h post-phagocytosis. LAMP1 is shown in red, STX13 in green and DNA in blue. Data are presented as the mean \pm SEM of values from three independent experiments. Representative images of 3 experiments are shown. Insets display PV area. Pink arrowhead indicates recruitment while white arrowheads indicate absence of recruitment. Bar, 10 μ m

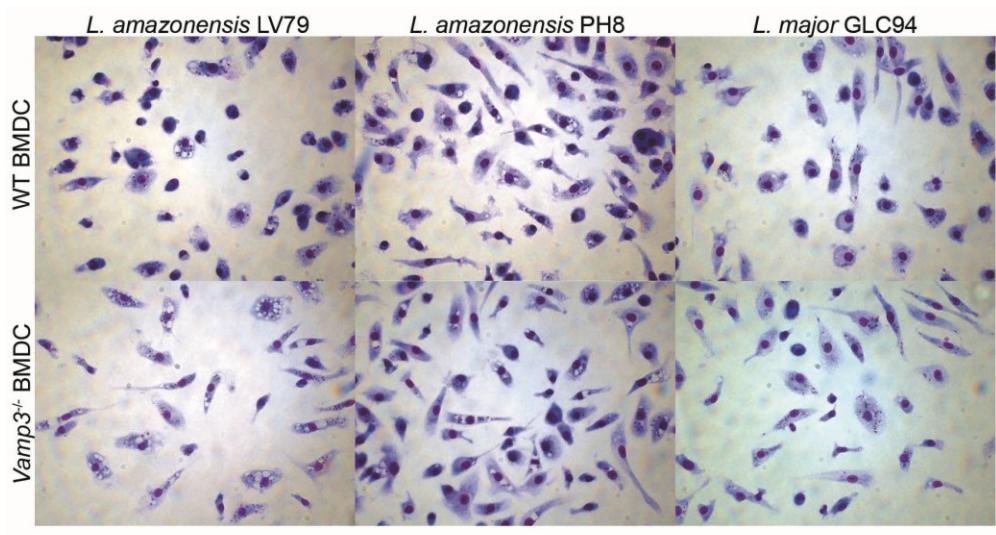


Figure 2S.2 OVA-expressing *Leishmania* replicate in BMDC

Giemsa-stained WT or Vamp3^{-/-} BMDCs infected for 48 h with serum-opsonized OVA-expressing *L. amazonensis* LV79, *L. amazonensis* PH8 and *L. major* GLC94.

CHAPTER 3: DISCUSSION

1 Biogenèse des PV de *Leishmania*

Ce projet de recherche visait une meilleure compréhension des mécanismes et des différences au niveau de la biogenèse des PV communales de *L. amazonensis* et des PV individuelles de *L. major*.

1. 1 Fusion membranaire

Considérant la nature volumineuse et hautement fusogénique des PV communales, nous avons émis l'hypothèse que les SNAREs, ces petites protéines dirigeant la fusion membranaire, jouent un rôle actif et central lors de la biogenèse des PVs. Nous nous sommes tout d'abord consacrés à établir un modèle de recrutement des SNAREs lors de la biogenèse des PVs en nous intéressant à tous les organelles qui pourraient leur fournir de la membrane. Pour ce faire, nous avons donc sélectionné des SNAREs étant spécifiques aux différents organelles. Tout au long de cette étude, les infections ont été étudiées sur une période maximale de 72h. Cette période était idéale afin de permettre la génération de PVs communales d'un volume optimal. Ainsi, elles ne compriment pas le cytoplasme et il est possible d'analyser le recrutement. Le parasite se différenciant dans les premiers 24h, cette période de temps permet aussi l'étude du développement entier de la PV, tant au stade promastigote qu'amastigote. Toutes les analyses de recrutement ont été effectuées par microscopie confocale.

1. 1. 1 Maturation du phagosome

Lors de la phagocytose, la première membrane exposée à la particule phagocytée est la membrane plasmique à la surface de laquelle peut être retrouvée spécifiquement la Q-SNARE SNAP23 (Hong 2005). Cette membrane et ses protéines associées sont normalement rapidement recyclées du phagosome précoce, quoique certains aient également vu un rôle pour SNAP23 tout au long de la maturation du phagosome (Sakurai, Hashimoto et al. 2012). Dans le cas présent, SNAP23 est recruté à partir de 48h après l'infection à la membrane de la PV communale de *L. amazonensis* et non à celle de la PV individuelle de *L. major*. Ce recrutement indique une rétention ou un détournement de la membrane plasmique à la PV de *L. amazonensis*.

La particule nouvellement phagocytée est rapidement exposée aux endosomes précoces sur lesquelles se retrouve spécifiquement la Q-SNARE syntaxine 13. La fusion avec les endosomes précoces constitue la première étape lors de la maturation du phagosome. Le phagosome précoce ainsi formé se caractérise par un début d'acidification et un recyclage des protéines de la membrane plasmique (Flannagan, Cosio et al. 2009). Stx 13 n'est pas recrutée aux PV de *L. major* GLC94 et *L. amazonensis* LV79. Une série d'évènements de fusion aura par la suite lieu avec les endosomes de recyclage sur lesquels se retrouve la R-SNARE VAMP3. Jusqu'à ce jour, peu d'importance a été accordée à cette SNARE lors de la phagocytose, la majorité des études indiquant qu'elle n'est pas essentielle au processus. VAMP3 est très fortement recrutée à partir de 48h après l'infection aux PV communales de *L. amazonensis* et non à la PV individuelle de *L. major*, ce qui indique une rétention des endosomes de recyclage à la PV communale. Une fois les protéines de la membrane plasmique recyclées, le phagosome précoce fusionne avec les endosomes tardifs où se retrouvent la R-SNARE VAMP8 (Hong 2005). Ces évènements de fusion entraînent le changement de Rab5 pour Rab7 et continuent l'accumulation de V-ATPase acidifiant le phagosome (Flannagan, Cosio et al. 2009). VAMP8 est cette fois-ci fortement accumulée à la PV individuelle de *L. major* à partir de 48h après l'infection et non à la PV communale de *L. amazonensis* LV79. Ce recrutement indique une potentielle accumulation des endosomes tardifs aux PV individuelles. Les PV de *L. major* étant réfractaires à la fusion avec les lysosomes, cette accumulation pourrait être due à l'arrêt de la maturation de leur phagosome. La dernière étape de la maturation du phagosome est la formation du phagolysosome par fusion avec les lysosomes (Flannagan, Cosio et al. 2009). Cette fois-ci, nous avons utilisé la protéine membranaire associée au lysosome (LAMP1) afin d'évaluer le recrutement de ces compartiments aux PV (Kornfeld and Mellman 1989). LAMP1 est fortement accumulée aux PV communales de *L. amazonensis* et non aux PV individuelles de *L. major*. Ceci concorde avec la littérature et souligne une différence marquée au niveau des mécanismes de survie de ces espèces de *Leishmania*. Les espèces produisant des PVs communales diluent possiblement les agents microbicides dans un plus grand volume comme Wilson et al. l'ont proposé (Wilson, Huynh et al. 2008), tandis que les espèces produisant des PVs individuelles bloquent la maturation du phagosome et la formation du phagolysosome (Desjardins and Descoteaux 1997, Wilson, Huynh et al. 2008)(Figure 3. 1).

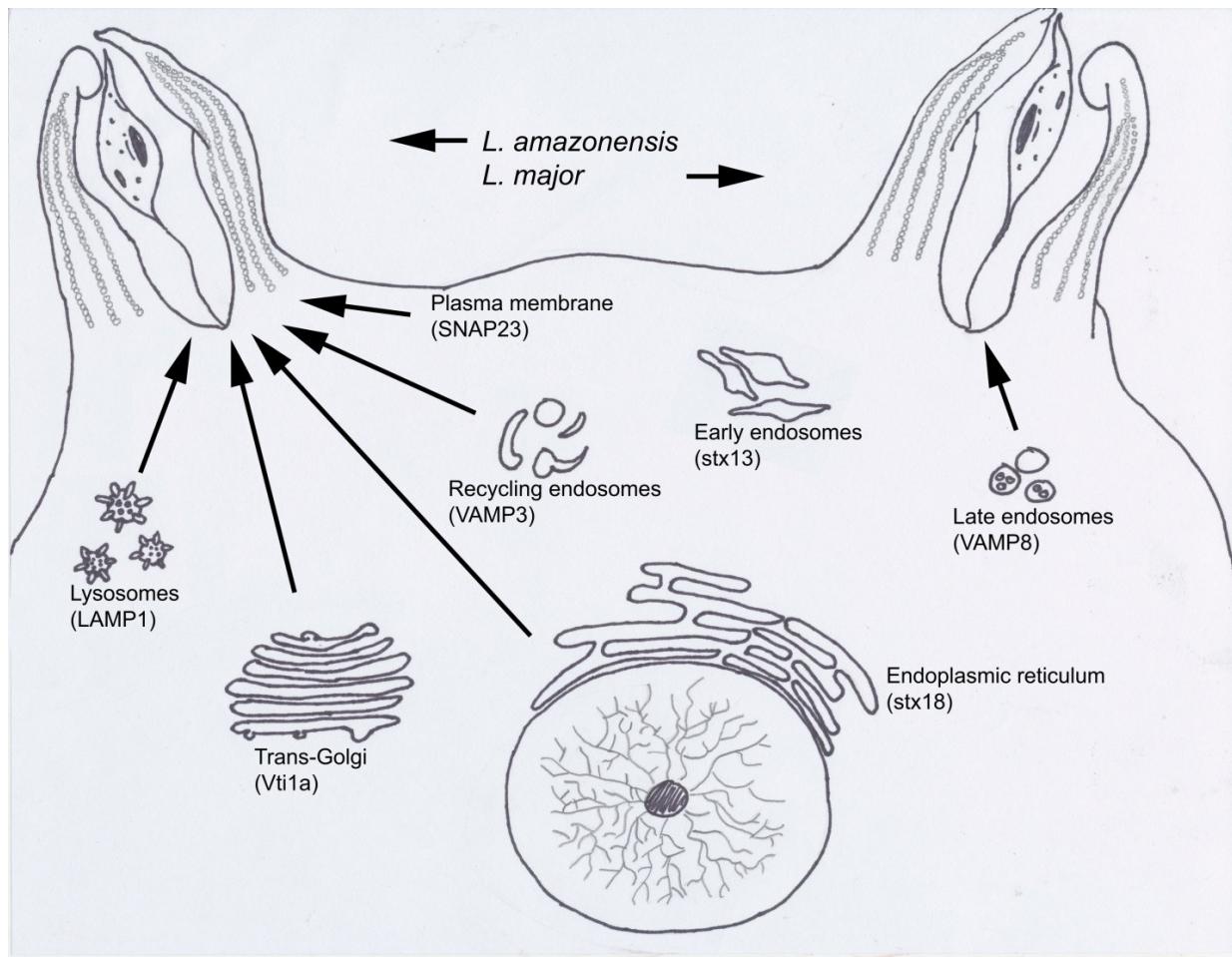


Figure 3. 1 Biogenèse des PVs

Représentation des différentes membranes et SNAREs recrutées aux PV communales de *L. amazonensis* LV79 et *L. major* GLC94.

1. 1. 2 Autres sources de membrane

Les sources de membrane à la disposition du parasite lors de la biogenèse de sa PV pourraient par contre ne pas être limitées aux membranes directement associées à la maturation du phagosome. Par exemple, le réticulum endoplasmique est essentiel à la phagocytose de grandes particules. Considérant la taille du parasite *Leishmania*, le recrutement du RE aux PVs reste une possibilité (Hatsuzawa, Tamura et al. 2006). Canton et al. ont également démontré que le "knock-down" de la Q-SNARE Stx 18 du réticulum endoplasmique entraîne non seulement une diminution de la phagocytose de *L. amazonensis*, mais qu'il entraîne également une diminution de l'élargissement des PV communales (Canton, Ndjamen et al. 2012).

Le recrutement de cette SNARE n'avait par contre jamais été évalué. Stx 18 est fortement recrutée à la PV communale de *L. amazonensis* au cours du temps et non à la vacuole individuelle de *L. major*, démontrant son rôle lors de l'apport et de la rétention de la membrane du réticulum endoplasmique aux PV communales lors de leur biogenèse. De plus, la molécule Retro-2 visant la Q-SNARE Stx 5 ainsi que le "knock-down" de la SNARE Sec22b, toutes deux également du réticulum endoplasmique, entraînent une restriction du développement des PV communales similaires au "knock-down" de Stx18 en plus de causer la mort de *L. amazonensis* (Canton and Kima 2012, Canton, Ndjamen et al. 2012). Nous avons également évalué le recrutement de la SNARE Stx 5 dont l'importance au niveau du développement de *L. amazonensis* a été démontrée. Nous n'avons par contre pas observé de recrutement pour cette SNARE aux PV individuelles de *L. major* ainsi qu'aux PV communales de *L. amazonensis* (Figure A1. 1. A).

Une autre source de membrane importante pour la cellule hôte est le Golgi. Nous nous sommes particulièrement intéressés au trans-Golgi où se retrouve spécifiquement la Q-SNARE Vti1a (Hong 2005). Le trans-Golgi est responsable de la livraison de cargo à travers l'entièreté de la cellule et participant à la machinerie de sécrétion (Di Martino, Sticco et al. 2019). Vti1a est faiblement recruté à la PV communale de *L. amazonensis* au cours du temps et non à la PV individuelle de *L. major*. Le parasite communal est donc apte à détourner la membrane provenant du trans-Golgi ce qui pourrait permettre la limitation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires ou favoriser le développement du parasite par le détournement de nutriments essentiels, le tout restant à être examiné par de futures études.

Le parasite communal pourrait finalement participer activement à la biogenèse de sa PV en fournissant, du moins en partie, la membrane nécessaire à l'expansion de son volume. Nous avons donc utilisé le PKH afin de marquer la membrane des parasites pour la suivre tout au long de l'infection et ainsi évaluer son accumulation au niveau de la PV. Nous n'avons par contre pas observé d'accumulation de membrane marquée au niveau de la PV, indiquant que le parasite lui-même ne sert pas de source de membrane lors de la biogenèse des PV communales (Figure A1. 1. B).

1. 2 Facteurs de pathogénèse

La biogenèse des PV est un processus provenant du parasite qui remodèle activement son phagosome en un environnement favorisant sa survie et son développement intracellulaire. Pour modifier le phagosome, le parasite utilise principalement ses facteurs de pathogénèse comme le lipophosphoglycan (LPG) et la métalloprotéase GP63.

1. 2. 1 LPG

Il est connu depuis longtemps déjà que le LPG de *Leishmania* est une molécule hautement variable d'une espèce à l'autre, mais également d'une souche à une autre (McConville, Schnur et al. 1995). Ces différences pourraient également être fondamentales lors de la biogenèse des différents types de PV. Les LPG de *L. major* et de *L. donovani*, une autre espèce formant des vacuoles individuelles, possèdent notamment de fortes propriétés anti-fusogéniques essentielles à l'inhibition de la formation des phagolysosomes par la fusion avec les lysosomes. La délétion du LPG de *L. major* et de *L. donovani* entraîne l'arrêt de cette inhibition ainsi que la mort des parasites (Desjardins and Descoteaux 1997, Spath, Garraway et al. 2003). Le LPG de *L. mexicana*, une autre espèce produisant des PVs communales, n'est quant à lui pas essentiel à la survie du parasite et au développement de l'infection (Ilg 2000). La cophagocytose de particules de zymosan enduites de LPG provenant de *L. donovani* lors d'infection par *L. amazonensis* est suffisante pour entraîner une diminution significative du volume de sa PV (Figure A1. 2). Cette diminution marquée permet de confirmer que l'absence de propriété anti-fusogénique des LPG des espèces produisant des PVs communales est l'un des facteurs permettant l'élargissement des PV communales. Il n'explique par contre pas le mécanisme actif de la prise de volume.

1. 2. 2 GP63

GP63 permet quant à elle de cliver et inactiver une panoplie d'effecteurs de la réponse immunitaire comme les facteurs de transcription ou une sous-unité de la NADPH oxydase (Olivier, Atayde et al. 2012). Similairement, elle peut également cliver différentes SNAREs comme VAMP3, VAMP8 et Syt XI (Matheoud, Moradin et al. 2013, Arango Duque, Fukuda et al. 2014, Casgrain, Martel et al. 2016).

C'est cette dernière capacité de s'attaquer aux protéines de fusion membranaire qui nous a particulièrement intéressés. Un mutant pour GP63 étant indisponible pour *L. amazonensis*, nous avons utilisé deux différentes souches de *L. amazonensis*, soit LV79 et PH8, étant connus comme produisant différents niveaux de GP63. Nous avons notamment démontré que, pour la forme promastigote, la production de GP63 par *L. amazonensis* PH8 est plus importante que pour *L. amazonensis* LV79, mais que ce ratio est inversé sous la forme amastigote. Sous sa forme amastigote, *L. amazonensis* LV79 produit une quantité plus importante de GP63 ayant une activité proportionnellement plus élevée, lorsqu'évaluée par zymographie. Nous avons également démontré que les deux souches de *L. amazonensis* modulent à la baisse VAMP3 et VAMP8. Le ratio de clivage observé est plus important aux temps où le recrutement de ces SNAREs est optimal ce qui suggère que la modulation à la baisse de ces SNAREs survient principalement aux PVs. Au niveau de l'élargissement des PV communales, les PV de *L. amazonensis* PH8 ne sont que légèrement plus volumineuses que celles de LV79.

1. 3 Facteurs microbicides

Comme mentionné précédemment, LPG et GP63 permettent de moduler la production d'oxyde nitrique par iNOS et de réactifs d'oxygène par la NADPH oxydase (Proudfoot, Nikolaev et al. 1996, Lodge, Diallo et al. 2006, Isnard, Shio et al. 2012, Matte, Casgrain et al. 2016). Nous avons donc procédé à la quantification de la production de NO suite à l'infection des macrophages préalablement stimulés à l'IFN- γ et au LPS. Les infections subséquentes par les deux souches de *L. amazonensis* n'ont pas entraîné une augmentation de la production de NO au-delà de la production par les cellules non infectées, contrairement à l'infection par *L. major* pour qui cette production fut significativement augmentée (Figure A1. 5D). Cette augmentation n'est par contre pas associée à une diminution de la survie de *L. major* dans les macrophages stimulés, ce qui indique, pour *L. amazonensis*, une plus grande capacité d'inhibition de la production de NO, mais également une plus grande sensibilité à la destruction par le NO en condition de stimulation. Cette sensibilité accrue peut s'expliquer par le recrutement d'iNOS aux PV communales contrairement aux PV individuelles qui l'excluent de leur membrane (Figure A1. 3. A).

En ce qui concerne la génération de ROS, aucun recrutement ne fut observé pour la sous-unité membranaire GP91^{phox} de la NADPH oxydase, *L. amazonensis* et *L. major* étant tous les deux capables de l'exclure de leur PV respective. La sous-unité GP91^{phox} est exclue de la PV de *L. major* par GP63 ce qui peut indiquer une activité similaire pour la GP63 de *L. amazonensis* (Figure A1. 3. B).

1. 4 Espèce et souche spécifiques

En utilisant deux souches de *L. amazonensis* exprimant différents niveaux de GP63 capables de cliver VAMP3 et VAMP8, nous avons voulu confirmer notre modèle de recrutement des SNAREs en nous concentrant sur ces deux SNAREs. Nous avons par la suite confirmé notre modèle de recrutement des SNAREs par l'utilisation de cette deuxième souche de *L. amazonensis*, les expériences précédentes ayant été effectuées avec la souche LV79 seulement. Étonnement, la SNARE VAMP3 fortement associée à la PV communale de *L. amazonensis* LV79 est exclue de la PV communale de *L. amazonensis* PH8 qui recrute quant à elle VAMP8. La Q-SNARE SNAP23, une partenaire connue de VAMP3 et VAMP8, est autant recrutée aux PV de *L. amazonensis* PH8 qu'aux PV de *L. amazonensis* LV79. Ces différences au niveau de la biogenèse n'affectent pas la survie des parasites, la survie intracellulaire étant similaire pour les deux souches de *L. amazonensis*. L'inhibition de la fusion avec les lysosomes conservée au stade amastigotes par *L. major* GLC94 que nous avons observée diffère également de ce qui avait précédemment été démontré, soit que le passage au stade amastigote entraîne une perte de l'inhibition de la fusion membranaire par la diminution de la quantité de LPG produite, ce qui permet l'acidification subséquente de la PV sans toutefois entraîner la mort du parasite (McConville and Blackwell 1991). Nous avons donc identifié plusieurs variations autant inter-espèces qu'intra-espèces lors de la biogenèse de la vacuole parasitophore.

2 VAMP3 et VAMP8

Le recrutement différentiel des SNAREs VAMP3 et VAMP8 aux PV, leur clivage et le rôle de VAMP8 lors de la présentation antigénique croisée nous ont poussé à étudier le rôle de ces SNAREs lors du développement des PV communales et individuelles. Pour ce faire, nous avons utilisé la souche de souris VAMP8 "knock-out" précédemment obtenue lors de l'étude sur la présentation antigénique (Matheoud, Moradin et al. 2013), ainsi qu'une souche de souris 129B6 déficientes en VAMP3, gracieusement fournie par le Pr. Sidney Whiteheart. L'utilisation de deux souches de *L. amazonensis* possédant un modèle de recrutement inversé pour VAMP3 et VAMP8 est un puissant outil pour étudier l'effet de ces SNAREs lors de l'infection. Ces souches nous permettent de déterminer si l'effet observé sur nos PV et la survie parasitaire sont dus à une modification directe du contexte membranaire des PV ou à un effet mécanistique sur la cellule.

2. 1 VAMP3 régulateur d'infection

Nous nous sommes tout d'abord concentrés sur la R-SNARE VAMP3 massivement recrutée aux PV communales de *L. amazonensis* LV79. Considérant la capacité du parasite à survivre efficacement à l'intérieur de PV VAMP3-positive nous estimions que le recrutement de VAMP3 soit dirigé par le parasite pour promouvoir sa survie. Étonnement, l'absence de VAMP3 entraîne une augmentation significative de la survie, ainsi que du volume des PV des deux souches de *L. amazonensis* sans toutefois affecter la réplication ou la PV de *L. major* avec un index d'infection de près de 100% dans tous les cas. L'absence de VAMP3 affectant similairement les souches de *L. amazonensis* recrutant ou non VAMP3 nous permet de déterminer que VAMP3 joue un rôle de régulateur négatif de l'infection par *L. amazonensis* autant au niveau de la survie du parasite, qu'au niveau de l'expansion de la PV communale. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisque VAMP3 avait été précédemment estimé comme n'étant pas indispensable lors de la phagocytose (Allen, Yang et al. 2002). Nous avons donc voulu identifier les mécanismes menant à ces changements significatifs.

2. 1. 1 Régulateur de la fusion membranaire

Les SNAREs sont des protéines ayant des rôles redondants et étant capables de se remplacer mutuellement en condition délétère afin de permettre la survie et le bon fonctionnement des cellules touchées. C'est notamment grâce à cette redondance qu'il est possible d'obtenir des souris "knock-out" en parfaite santé pour ce type de protéines. Nos deux protéines d'intérêt, soit VAMP3 et VAMP8 sont connues comme possédant des rôles compensatoires, la fusion médiée par VAMP3 étant en son absence médiée par VAMP8 (Wang, Ng et al. 2004, Hong 2005). Nous nous sommes ainsi intéressés à l'effet de l'absence de VAMP3 sur le recrutement de VAMP8, une augmentation de son recrutement pour les PV des deux souches de *L. amazonensis* aurait pu expliquer l'augmentation de leur volume. Nous n'avons par contre pas observé de différence de recrutement pour VAMP8 aux PV de nos deux souches de *L. amazonensis* en absence de VAMP3 (Figure A1. 4. A).

Nous avons également étudié le recrutement de synaptotagmine V et synaptotagmine XI, deux protéines dirigeant la fusion membranaire en fonction des influx de calcium qui sont ciblées respectivement par le LPG et GP63 pour favoriser l'infection par *Leishmania* (Vinet, Fukuda et al. 2009, Arango Duque, Fukuda et al. 2014). Aucune différence de recrutement n'a été observée entre les souches de *L. amazonensis* LV79 et PH8, autant en présence qu'en absence de VAMP3. Le recrutement de ces synaptotagmines est transitoire 24h après l'infection, soit lors de la transformation en amastigote (Figure A1. 4. C et D). L'absence de VAMP3 pourrait aussi influencer le recrutement d'un de ses partenaires de fusion membranaire comme la Q-SNARE SNAP23 qui est également recrutée à la membrane des PV de *L. amazonensis* en condition normale. Le recrutement de cette Q-SNARES aux PV des deux souches de *L. amazonensis* est diminué de moitié en absence de VAMP3 (Figure A1. 4. B). Cette diminution significative du recrutement de SNAP23 indique que sa rétention à la PV est due à VAMP3 et qu'elle agit probablement sous forme de complexe avec VAMP3 lors du contrôle de l'infection par *L. amazonensis* en collaboration avec une autre SNARE qui reste à être déterminée. Ces deux SNAREs sont notamment capables de former des complexes actifs avec Stx 4 et Vt1a qui est également recrutée aux PV communales de *L. amazonensis* LV79. Ces deux SNAREs seraient donc de bons points de départ afin d'étudier les complexes formés par VAMP3 permettant le contrôle de l'infection par *L. amazonensis*.

Le domaine V₀ de la V-ATPase possède également des propriétés fusogéniques et anti-inflammatoires. Certaines de ses sous-unités sont également surexprimées lors de l'infection par *L. amazonensis* (Peters, Bayer et al. 2001, Bayer, Reese et al. 2003, Zhang, Wang et al. 2008, Murase, Kawasaki et al. 2018, Xia, Liu et al. 2019). L'ATP6V₀a3 (TCIRG1) permet d'orienter la V-ATPase à la périphérie de la cellule ainsi qu'à la membrane plasmique où elle régule notamment la sécrétion de l'insuline (Toyomura, Murata et al. 2003, Sun-Wada, Toyomura et al. 2006, Matsumoto, Sekiya et al. 2018). De paire avec l'ATP6V₀d2, elle agit à la membrane plasmique pour promouvoir les évènements de fusion membranaire lors du développement des ostéoclastes (Wu, Xu et al. 2009, Kissing, Hermsen et al. 2015, Zhang, Lin et al. 2020). Ces deux sous-unités ne sont également pas essentielles au rôle d'acidification de la V-ATPase, leur régulation à la baisse n'entraînant pas un défaut d'acidification (Lee, Rho et al. 2006, Pessoa, Reis et al. 2019, Xia, Liu et al. 2019). Le domaine V₀ de la V-ATPase stabilise les complexes de fusion membranaire (Peters, Bayer et al. 2001). Il facilite également la formation des pores de fusion (Bayer, Reese et al. 2003). Il pourrait ainsi participer à l'élargissement des PVs communales en favorisant la fusion membranaire. Nous avons donc utilisé la sous-unité TCIRG1 du domaine V₀ afin d'étudier son recrutement en présence et en absence de VAMP3. Lors de l'infection de BMM WT, le recrutement de cette sous-unité aux PV est limité, mais l'absence de VAMP3 entraîne une augmentation hautement significative de son recrutement aux PV communales de *L. amazonensis* (Figure A1. 5. A). La présence accrue du domaine V₀ pourrait conférer une plus grande fusogénicité aux PV communales de *L. amazonensis* en absence de VAMP3 en permettant un ancrage accru des vésicules aux PV, ce qui favoriserait les évènements de fusion membranaire. La quantification de l'expression du domaine V₀ par RT-qPCR et Western blot permettra de confirmer que cette augmentation de recrutement n'est pas due à une dérégulation de l'expression génique en absence de VAMP3. L'ancrage accru de vésicules aux PVs communales pourrait aisément être confirmé dans le futur par microscopie électronique qui permettrait de visualiser et quantifier l'amarrage des vésicules aux PV communales suite au traitement au N-éthymaléimide (NEM), un inhibiteur de la fusion membranaire. VAMP3 agit donc possiblement comme régulateur négatif de l'expansion des PV communales de *L. amazonensis* en recyclant ou en limitant le recrutement de TCIRG1.

L'utilisation de siRNA dirigé contre le domaine V₀ par des BMMs WT ou 129B6 *Vamp3*^{-/-} permettrait de confirmer que l'augmentation du volume des PV est bel et bien dûe à l'augmentation du recrutement de ce domaine. Le domaine V₀ participe également à l'homéostasie du cholestérol. L'implication du cholestérol lors de l'élargissement des vacuoles communales de *L. amazonensis* en absence de VAMP3 sera discutée à la section 2. 1. 5.

2. 1. 2 Régulateur du domaine V₀

VAMP3 est impliqué lors du recyclage à la membrane plasmique et lors d'évènements de sécrétion (Galli, Chilcote et al. 1994, Feng, Crane et al. 2002, Polgar, Chung et al. 2002, Proux-Gillardeaux, Gavard et al. 2005, Tayeb, Skalski et al. 2005). TCIRG1 et l'ATP6V₀d2 peuvent être présentes à la surface membranaire (Wu, Xu et al. 2009, Kissing, Hermsen et al. 2015, Zhang, Lin et al. 2020). Le recrutement augmenté de TCIRG1 en absence de VAMP3 pourrait donc suggérer un rôle pour VAMP3 lors du recyclage de cette sous-unité à la membrane plasmique. Il est également possible que VAMP3 agisse en complexe avec SNAP23 (Banerjee, Li et al. 2001). Le recrutement de l'ATP6V₀d2 reste à être évalué par microscopie confocale. L'interaction entre le domaine V₀ de la V-ATPase et la SNARE VAMP3 demeure à être évaluée. VAMP3 pourrait limiter directement le recrutement de cette sous-unité de la V-ATPase à la PV de *L. amazonensis* ou la recycler de leur PV. Il suffira d'effectuer un co-marquage de la sous-unité ATP6V₀d2 et de VAMP3 pour tout d'abord déterminer si le domaine V₀ se retrouve aux mêmes compartiments membranaires, ce qui favoriserait l'inhibition directe de la livraison de ce domaine aux PV. L'infection par *L. amazonensis* de BMMs exprimant des sous-unités ATP6V₀d2-GFP permettra également d'évaluer par microscopie confocale en temps réel si cette sous-unité est recrutée puis recyclée de la surface de la PV ou si son recrutement n'est tout simplement pas limité en présence de VAMP3. Le recyclage de la V-ATPase de la membrane plasmique pourra également être évalué par biotinylation. Brièvement, les cellules sont biotinyées sur glace pendant 30 minutes et la biotine excédante est enlevée. Les cellules sont par la suite incubées à 37°C une dizaine de minute pour permettre l'internalisation des protéines biotinylées. Les cellules sont ensuite mises sur glace afin d'enlever la biotine restée à leur surface.

Les cellules sont lysées directement pour donner la quantité totale de protéines internalisées ou incubées 10 minutes supplémentaires à 37°C avant d'enlever la biotine recyclée de la surface puis d'être lysées. Les lysats sont incubés avec le NeutrAvidin agarose, des billes qui lient la biotine. Les protéines biotylinées sont par la suite récupérées des billes d'agaroses. La soustraction des protéines biotinyliées restantes des protéines biotinylées recyclées totales permet de quantifier le recyclage à la membrane plasmique.

2. 1. 3 Régulateur de la production de NO

Le domaine V₀ possède également des propriétés anti-inflammatoires. Le "knock-out" de la sous-unité ATP6V₀d2 entraîne notamment une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires lors de l'activation par les TLR3, 7 et 9. Par contre, l'absence d'ATP6V₀d2 entraîne une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation du NF-κB lors de l'activation du TLR4 par le LPS. L'ATP6V₀d2 permet de limiter la réponse pro-inflammatoire lors de la stimulation du TLR4 par son endocytose (Murase, Kawasaki et al. 2018). Le TLR4 se retrouve également aux mêmes endosomes de recyclage où se retrouve VAMP3 (Kagan 2010). Le TLR4 est notamment engagé par le LPG de *L. amazonensis* (Nogueira, Assis et al. 2016). L'activation de la voie de signalisation du TLR4 permet, entre autres, d'activer la production d'oxyde nitrique par iNOS (Lee, Lowell et al. 2005). La limitation de l'activation du TLR4 et de la production de NO pourrait expliquer l'augmentation de la survie de *L. amazonensis* en absence de VAMP3. Nous avons donc évalué la production d'oxyde nitrique en présence et en absence de VAMP3 suite à la stimulation à l'IFN-γ et au LPS. Cette stimulation entraîna une production NO nettement inférieure par les BMMs *Vamp3*^{-/-}, la production étant réduite de moitié (Figure A1. 5. C). La stimulation de ces BMMs préalablement infectées par les souches de *L. amazonensis* n'entraîna pas d'augmentation de la production de NO contrairement à l'infection par *L. major*, indiquant soit une plus grande capacité inhibitrice de la production de NO ou une incapacité de stimulation de la production de NO par les souches produisant des PVs communales (Figure A1. 5. D).

Nous avons par la suite voulu évaluer l'effet de cette production diminuée de NO sur la survie intracellulaire de nos parasites. Nous avons infecté des BMMs WT ou *Vamp3*^{-/-} que nous avons par la suite stimulés ou non à l'IFN-γ (18h) et au LPS (24h).

Nous avons observé pour toutes nos souches une diminution marquée de la survie intracellulaire similaire chez les BMM WT stimulés. L'absence de différence de survie intracellulaire entre nos espèces malgré l'augmentation significative de la production de NO engendrée par l'infection par *L. major* nous indique que ce parasite est probablement moins sensible à la destruction par l'oxyde nitrique que *L. amazonensis*. La survie de *L. major* est également diminuée similairement lors de l'infection de BMMs *Vamp3^{-/-}* stimulé, indiquant que le contrôle de leur infection s'effectue de manière indépendante de la production de NO (Figure A1. 5E). La diminution de la survie intracellulaire de *L. amazonensis* entraînée par la stimulation à l'IFN-γ et au LPS est quant à elle complètement abolie en absence de VAMP3, les niveaux de survie étant similaires avec et sans stimulation. L'augmentation de la survie intracellulaire des souches de *L. amazonensis* observée en absence de VAMP3 pourrait donc être due à une plus faible production d'oxyde nitrique (Figure A1. 5. E). L'infection par *Leishmania* n'entraînant normalement pas de production d'oxyde nitrique, l'utilisation d'un inhibiteur d'iNOS comme le 1400W lors de l'infection de BMM WT permettrait de confirmer cette hypothèse (Cortez, Huynh et al. 2011, Shweash, Adrienne McGachy et al. 2011, Calegari-Silva, Vivarini et al. 2015, Calegari-Silva, Vivarini et al. 2018). Ainsi, VAMP3 pourrait jouer un rôle lors de l'activation par le TLR4 en limitant son internalisation par endocytose ou en favorisant son recyclage à la membrane plasmique. L'incapacité de répondre à la stimulation du TLR4 de manière dose-dépendante par les cellules non-infectées en absence de VAMP3 suggère plutôt un rôle pour VAMP3 lors du recyclage du TLR4. La diminution de la production d'oxyde nitrique en absence d'infection suggère également un effet sur le recyclage du TLR4, puisque l'ATP6V₀d2 influençant son internalisation est modulée par l'infection par *L. amazonensis* (Pessoa, Reis et al. 2019). Le recyclage du TLR4 à la surface cellulaire par VAMP3 pourrait s'effectuer en complexe avec SNAP23 et Stx11 suite à un stimulus (Kinoshita, Sakurai et al. 2019). L'étude de la distribution du TLR4 pourra permettre de confirmer le tout. Pour ce faire, il suffira tout d'abord d'effectuer un co-marquage de VAMP3 et du TLR4 afin de confirmer leur colocalisation. Il sera possible d'évaluer le recyclage du TLR4 en absence de VAMP3 de façon similaire et simultanément à celui de la V-ATPase par biotinylation. La génération de BMMs WT et *Vamp3^{-/-}* exprimant un TLR4-GFP permettra également de déterminer par microscopie confocale en temps réel si la livraison du TLR4 à la surface cellulaire est limitée en absence de VAMP3.

La quantification de l'oxyde nitrique suite à la déplétion par siRNA de l'ATP6V₀d2 et de TCIRG1 des souris *Vamp3*^{-/-} permettra également de déterminer si le domaine V₀ est responsable de la diminution de la production d'oxyde nitrique.

2. 1. 4 Régulateur de la présentation antigénique croisée

Un autre élément important de la réponse immunitaire anti-*Leishmania* est la présentation antigénique croisée. La limitation de l'acidification vacuolaire est l'un des mécanismes importants permettant aux cellules dendritiques de présenter plus efficacement l'antigène et il a été précédemment proposé que la sous-unité ATP6V₀d2 de la V-ATPase pourrait être responsable des différences d'activité menant à cette capacité de présentation accrue, cette sous-unité étant surexprimée chez les cellules dendritiques (Sato, Shikano et al. 2006). La grande majorité des études sur la présentation antigénique croisée ont été effectuées en utilisant des particules inertes comme des billes recouvertes d'ovalbumine. L'utilisation de ces billes a précédemment démontrée que les SNAREs VAMP3 et VAMP8 retrouvées aux compartiments contenant le CMH-I ne jouaient pas de rôle important lors de la présentation antigénique croisée (Nair-Gupta, Baccarini et al. 2014). Notre groupe a par contre observé que le clivage de VAMP8 par *L. major* entraîne une diminution significative de la présentation antigénique croisée en empêchant le recrutement de la sous-unité GP91^{phox} de la NADPH oxydase ce qui permet au parasite d'éviter la réponse T CD8+ délétère (Matheoud, Moradin et al. 2013). Ainsi, l'infection par un microorganisme pathogène permet de révéler des mécanismes précédemment inconnus lors de la présentation antigénique croisée. À ce jour, personne ne s'est intéressé à l'effet de la formation de vacuoles volumineuses comme celles de *L. amazonensis* lors de la présentation antigénique croisée. Nous avons donc procédé à l'évaluation de la présentation antigénique croisée vacuolaire ou totale des BMDCs par leur capacité à stimuler des cellules T CD8+ spécifiques pour l'ovalbumine. Nous avons évalué la capacité des différents parasites à inhiber la présentation antigénique dans la totalité de la cellule et non simplement à leur propre PV par la cophagocytose de billes recouvertes d'ovalbumine lors d'infection par les souches de *L. amazonensis* ou par *L. major*. La capacité des parasites à bloquer la présentation antigénique à leur PV a quant à elle été évaluée par l'utilisation de parasites exprimant l'ovalbumine que nous avons générés. Un index d'infection de près de 100% a été obtenu lors de ces expériences.

L'absence de VAMP3 n'entraîna pas une augmentation de la réPLICATION de *L. amazonensis* LV79 et *L. major* GLC94 lors de ces infections (Figure A1. 8). Qualitativement, l'augmentation du volume des PVs de *L. amazonensis* ne fut également pas observée. Cette différence est possiblement due à la nature moins microbicide des BMDC. Les cellules dendritiques sont notamment moins efficaces que les macrophages lors de l'élimination de *S. Typhimurium* (Kalupahana, Mastroeni et al. 2005). Elles sont également moins protéolytiques (Delamarre, Pack et al. 2005, Savina, Jancic et al. 2006). Certaines cellules dendritiques expriment également une grande quantité d'ATP6V_{0d2}, ce qui pourrait aussi contribuer à l'obtention de volume de PV similaires (Sato, Shikano et al. 2006).

Nous avons proposé que *L. amazonensis* est capable, tout comme *L. major*, d'inhiber la présentation antigénique croisée puisque nos deux souches de *L. amazonensis* possèdent la même capacité à cliver VAMP8 et à limiter le recrutement de GP91^{phox} (Figure A1. 3. B). La comparaison de la présentation antigénique croisée dans le contexte d'infection des souches produisant des PVs communales de *L. amazonensis* LV79 et PH8 et de la souche produisant des PVs individuelles *L. major* GLC94 nous révéla que les souches produisant des PVs communales sont non seulement capables d'inhiber la présentation antigénique croisée, mais qu'elles sont également significativement plus efficaces à le faire que la souche produisant des PVs individuelles de *L. major*.

Les deux voies de présentation antigénique croisée, soit les voies vacuolaires et du phagosome au cytosol, sont importantes lors de la présentation antigénique croisée des antigènes de *L. major* (Bertholet, Goldszmid et al. 2006, Ndjamen, Kang et al. 2010). La voie du phagosome au cytosol est inhibée par l'acidification des phagosomes, la limitation de cette acidification par l'activité limitée de la V-ATPase et par l'activité de NOX2 étant essentielle à la présentation antigénique croisée optimale par cette voie (Trombetta, Ebersold et al. 2003, Savina, Jancic et al. 2006). La fusion prononcée avec les lysosomes des PVs communales de *L. amazonensis* et l'acidification vacuolaire qui en découle pourrait donc nuire à la présentation antigénique croisée par une préparation inadéquate des antigènes. La capacité à bloquer la présentation antigénique peut également s'expliquer par le clivage prononcé de VAMP8 par les souches de *L. amazonensis* ainsi que par leur inhibition du recrutement de la sous-unité membranaire de la NADPH oxydase GP91^{phox} à sa PV.

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'effet de VAMP3 sur la présentation antigénique croisée, VAMP3 étant notamment retrouvé aux compartiments contenant le CMH-I en parallèle avec VAMP8 (Nair-Gupta, Baccarini et al. 2014). En utilisant le même contexte expérimental que précédemment, nous avons évalué la stimulation des cellules T CD8+ OVA spécifique par des BMDC WT et *Vamp3*^{-/-}. Ainsi, les BMDCs *Vamp3*^{-/-} ne démontrent pas une plus grande capacité à présenter l'antigène en absence d'infection, en concordance avec ce qui avait précédemment été démontré. L'infection par *Leishmania* entraîna par contre une augmentation significative de la présentation antigénique totale par les BMDCs *Vamp3*^{-/-} à court terme lors de l'infection par *L. amazonensis* et tout au long de l'infection pour *L. major*. Ces résultats suggèrent encore une fois une plus grande capacité d'inhibition de la présentation antigénique croisée pour les espèces produisant des PVs communales (Figure A1. 6). La fusion massive des vacuoles communales avec les phagosomes de bille recouvertes d'ovalbumine 48h après l'infection entraîne une diminution de la quantité de billes disponibles pour la présentation antigénique croisée ce qui pourrait expliquer l'absence d'augmentation observée.

Aux PVs elles-mêmes, l'absence de VAMP3 entraîne une augmentation de la présentation antigénique croisée pour les souches de *L. amazonensis* et non pour *L. major* GLC94. L'absence de différence de présentation antigénique croisée par les cellules non-infectées suggère qu'il n'y a pas de dérégulation basale en absence de VAMP3. Par sa présence aux compartiments contenant le CMH-I, VAMP3 pourrait également réguler négativement la présentation antigénique croisée en limitant l'accessibilité du CMH-I aux PV, en recyclant des PV ou en limitant son transport subséquent à la membrane plasmique (Nair-Gupta, Baccarini et al. 2014). La différence de présentation antigénique croisée totale et aux PV lors de l'infection par *L. major* pourrait s'expliquer par leur faible fusogénicité qui limiterait le recrutement du CMH-I, les phagosomes de bille pouvant les recruter librement. Il est à noter que la présence du CMH-I à la membrane plasmique est similaire chez les BMDC WT et *Vamp3*^{-/-} ce qui peut indiquer que le transport à la membrane plasmique à partir des phagosomes n'est pas modifié en absence de VAMP3.

Pour évaluer le mécanisme exact de régulation de la présentation antigénique croisée auquel VAMP3 prend part, il suffira tout d'abord d'évaluer le recrutement du CMH-I aux PV communales lors d'infections de BMDCs WT ou *Vamp3*^{-/-}.

Un recrutement augmenté en absence de VAMP3 signifiera un rôle de limitation de fusion aux PV ou de recyclage de la surface des PVs. L'expression de CMH-I GFP chez ces BMDCs permettra également d'évaluer leur distribution en temps réel et de visualiser le recyclage des PV ou le transport diminué à la membrane plasmique en présence de VAMP3. Il est également possible que le CMH-I impliqué lors de la présentation antigénique croisée provienne de la membrane plasmique. Il est donc possible que VAMP3 soit responsable du recyclage du CMH-I à la membrane plasmique et que son absence entraîne une plus grande disponibilité du CMH-I provenant de la membrane plasmique pour participer à la présentation antigénique croisée suite à un échange de peptides. L'évaluation du recyclage du CMH-I pourra être effectuée de façon similaire et simultanément à celui de la V-ATPase et du TLR4. L'origine du CMH-I recruté aux PVs et aux phagosomes de billes en condition d'infection pourra être confirmé. Il suffira d'évaluer le ratio des recrutements observés lors de l'immunofluorescence totale des CMH-I et lors du marquage des CMH-I de la surface membranaires par un anticorps couplé à un fluorochrome par microscopie confocale en temps réel.

La sous-unité ATP6V₀d2 a également été observée aux endosomes contenant les antigènes (Sato, Shikano et al. 2006). L'augmentation de la présentation antigénique aux PV ayant un recrutement accru du domaine V₀ pourrait indiquer l'importance de cette sous-unité lors de la préparation de l'antigène et lors de la modulation des propriétés du phagosome. VAMP3, en limitant le recrutement de la sous-unité TCIRG1 et possiblement de l'ATP6V₀d2 qui ne sont toutes deux pas essentielles à l'acidification, pourrait entraîner la destruction des antigènes en permettant l'augmentation des propriétés microbicides du phagosome. Cette destruction accrue limiterait la présentation antigénique croisée. Ainsi, VAMP3 participerait à la modulation des propriétés du phagosome et à sa spécialisation. Cette idée est notamment renforcée par l'augmentation de la survie de *L. amazonensis* en absence de VAMP3, concordant avec le recrutement accru de TCIRG1. Il sera par contre nécessaire de confirmer le recrutement de ces sous-unités de la V-ATPase lors de l'infection de BMDC, puisque nos observations ont été faites lors d'infection de BMM.

VAMP3 et sa SNARE interchangeable VAMP8 agissent donc de manière antagoniste sur la présentation antigénique croisée lors de l'infection par *Leishmania*. VAMP8 favorise la présentation antigénique croisée tandis que VAMP3 la limite.

L'implication possible du cholestérol lors de la présentation antigénique croisée en absence de VAMP3 sera discutée à la section suivante.

2. 1. 5 VAMP3 et l'homéostasie du cholestérol

La section suivante se base sur des observations faites lors de l'infection de macrophages et de cellules dendritiques. L'évaluation du recrutement du domaine V₀ et de l'accumulation de goutelettes lipidiques (LD) en absence de VAMP3 lors de l'infection de BMDC devrait être tout d'abord confirmée. La présentation antigénique croisée en absence de VAMP3 par des BMMs infectés devrait également être évaluée.

L'infection par *L. major* ou *L. amazonensis* entraîne une perturbation de l'homéostasie du cholestérol. Tous deux entraînent une augmentation de la biogénèse du cholestérol en régulant à la hausse l'expression de l'HMG-CoA et entraînent la formation de LD (Osorio y Fortea, de La Llave et al. 2009, Pinheiro, Nunes et al. 2009, Rabhi, Rabhi et al. 2012, Rabhi, Rabhi et al. 2016). *L. mexicana*, une autre espèce possédant une vacuole communale, entraîne également une accumulation du cholestérol aux endosomes en modulant à la baisse NPC1 (Semini, Paape et al. 2017). Aux endosomes tardifs, NPC2 permet le transfert du cholestérol libre à NPC1 situé à la membrane, ce qui permet sa redistribution à la membrane plasmique ou au réticulum endoplasmique (Li, Saha et al. 2016). *L. major* entraîne quant à lui une régulation à la baisse de ABCA1 ce qui limite l'efflux du cholestérol (Rabhi, Rabhi et al. 2012). Ces deux espèces de *Leishmania* entraînent donc une augmentation de la disponibilité du cholestérol intracellulaire par sa séquestration et l'augmentation de sa biogénèse. *Leishmania* étant incapable de générer son propre cholestérol, la perturbation de l'homéostasie du cholestérol pourrait être essentielle à leur survie intracellulaire (Roberts, McLeod et al. 2003).

La V-ATPase joue également un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol. L'arrêt de son activité entraîne notamment une déplétion du cholestérol de la membrane plasmique ainsi qu'un arrêt de son efflux à l'apolipoprotéine A1 (APOA1) à travers ABCA1 (Lorkowski, Brubaker et al. 2018). Ainsi, la V-ATPase est proposée comme étant essentielle au transport du cholestérol à la membrane plasmique afin de maintenir son homéostasie. La livraison du cholestérol à la membrane plasmique par la V-ATPase pourrait être dépendante des sous-unités TCIRG1 et ATP6V_{0d2}.

La SNARE VAMP3 possède également un domaine de reconnaissance du cholestérol qui pourrait également favoriser son transport à la membrane plasmique de concert avec la V-ATPase (Enrich, Rentero et al. 2015).

Par la modulation de l'homéostasie du cholestérol, *L. major* et *L. amazonensis* pourraient entraîner une diminution partielle du niveau de cholestérol à la membrane plasmique. Ainsi, la régulation à la hausse de l'ATP6V₀d2 lors de l'infection par *L. amazonensis* pourrait en fait être un mécanisme utilisé par la cellule afin de permettre un recyclage du cholestérol des endosomes à la membrane plasmique afin de maintenir l'homéostasie. Ce recyclage permettrait indirectement à la cellule de limiter l'expansion de la PV communale de *L. amazonensis* en retirant le cholestérol des PV. En modulant à la baisse VAMP3, ces parasites pourraient limiter le recyclage du cholestérol en permettant une meilleure rétention de la V-ATPase provenant de la membrane plasmique. La déplétion du cholestérol de la membrane plasmique des cellules WT par le M β CD qui enclenche le recyclage rapide par Rab4 permettra d'observer la colocalisation entre VAMP3, la V-ATPase et le cholestérol. Le recyclage du cholestérol à la membrane plasmique pourrait également entraîner une augmentation de son efflux afin de limiter l'accumulation intracellulaire. L'efflux en absence de VAMP3 pourra être estimé par l'utilisation de (³H) cholestérol et mesuré dans le surnageant. Il pourrait aussi être évalué par l'utilisation d'un kit commercial comme celui d'abcam (ab196985) utilisant un cholestérol fluorescent. La présence de la V-ATPase à la membrane plasmique pourra également être mesurée par cytométrie en flux en absence de perméabilisation ou par western-blot suite à l'isolation de la membrane plasmique. Le recrutement accru de l'ATP6V₀a3 aux PV de *L. amazonensis* en absence de VAMP3 pourrait ainsi permettre de concentrer le cholestérol à la PV communale, ce qui expliquerait la prise de volume importante. L'augmentation de la rétention du cholestérol aux PVs communales pourrait favoriser la fusion membranaire en causant des invaginations des membranes aux limites des sites concentrés en cholestérol. La visualisation de la distribution du cholestérol par microscopie confocale en utilisant le TopFluor (bodipy)-Cholestérol, le NBD-cholestérol et filipin permettra de confirmer la présence accrue du cholestérol aux PV communales en absence de VAMP3. STX4, STX5, STX6, STX7, STX10, STX12, STX18, Vti1B et VAMP2 possèdent également un motif de reconnaissance du cholestérol et pourraient être relocalisées aux PV communales par l'accumulation de cholestérol (Enrich, Rentero et al. 2015).

Aux PV, ces SNAREs pourraient entraîner des événements de fusion membranaire supplémentaires qui permettraient l'augmentation du volume des PV. L'évaluation du recrutement de ces SNAREs aux vacuoles communales de *L. amazonensis* en présence et en absence de VAMP3 permettra de visualiser cette possibilité.

Le recyclage à la membrane plasmique du CD36, le récepteur du ox-LDL, a tout récemment été démontré comme étant dépendant de VAMP3 (Yu, Du et al. 2020). Le CD36 est essentiel au développement des PV communales, il favorise la fusion des PV aux endosomes tardifs et aux lysosomes (Okuda, Tong et al. 2016). La rétention de ce récepteur aux endosomes a également été liée au fonctionnement de la V-ATPase (Liu, Steinbusch et al. 2017). L'absence de VAMP3 pourrait donc entraîner une augmentation du recrutement et de la rétention du CD36 aux PV communales. Aux PVs communales, le CD36 pourrait favoriser la fusion aux endosomes tardifs et aux lysosomes (Okuda, Tong et al. 2016). Le recrutement du CD36 aux PV communales de *L. amazonensis* en absence de VAMP3 pourra être visualisé par microscopie confocale tandis que son recyclage à la membrane plasmique pourra être évalué de façon similaire et simultanément à celui de la V-ATPase, du TLR4 et du CMH-I.

La perturbation de l'homéostasie du cholestérol pourrait également être responsable de la modulation de la présentation antigénique croisée en absence de VAMP3. Premièrement, nous avons observé, en absence de VAMP3, une augmentation du recrutement des goutelettes lipidiques aux PV communales de *L. amazonensis*. Les LD et le membre m3 de la famille des GTPase lié à l'immunité (IRGM3) retrouvés à leur surface ont été démontrés comme étant essentiels à la présentation antigénique croisée en ralentissant la maturation des phagosomes, ce qui permet d'éviter la destruction des antigènes (Bougnères, Helft et al. 2009). L'augmentation du recrutement des LD aux PV communales de *L. amazonensis* pourrait ainsi favoriser la présentation antigénique en ralentissant la maturation des PV. La génération des LD lors de l'activation classique des macrophages est dépendante des LDL exogènes (Rosas-Ballina, Guan et al. 2020). Le défaut de recyclage entraîné par l'absence de VAMP3 pourrait permettre d'expliquer l'accumulation des LD exogènes et pourrait participer à la diminution du niveau de cholestérol à la membrane plasmique.

Le recrutement d'IRGM3 en absence de VAMP3 aux PV communales de *L. amazonensis* et aux phagosomes de bille lors de l'infection par *L. major* et *L. amazonensis* pourra être visualisé par microscopie confocale, tandis que la présentation antigénique croisée pourra être évaluée suite à la limitation de la formation des LD par l'utilisation de milieu dépourvu de LDL.

Deuxièmement, le niveau de cholestérol à la membrane plasmique module la présentation antigénique croisée. L'infection par *L. donovani* entraîne notamment une diminution prononcée du niveau de cholestérol à la membrane plasmique, ce qui entraîne un défaut de présentation antigénique croisée qui est rétabli lors de l'ajout de cholestérol à la membrane plasmique (Chakraborty, Banerjee et al. 2005). Une diminution partielle du niveau de cholestérol à la membrane plasmique entraîne par contre une augmentation de la présentation antigénique croisée en limitant les radeaux lipidiques. La limitation des radeaux lipidiques entraîne une concentration des CMH-I, ce qui facilite la reconnaissance par les cellules T et stabilise la synapse immunologique (Fooksman, Gronvall et al. 2006). Le défaut potentiel de recyclage du cholestérol à la membrane plasmique en absence de VAMP3 pourrait ainsi y diminuer partiellement le niveau de cholestérol et promouvoir la présentation antigénique croisée. La quantification du cholestérol d'isolats de membrane plasmique et de cellules totales en absence de VAMP3 par l'utilisation de kits commerciaux comme celui d'abcam (ab65359) permettra d'évaluer cette possibilité. Le cas échéant, la présentation antigénique par les BMDC *Vamp3^{-/-}* infectés dont le niveau de cholestérol à la membrane plasmique aura été rétabli à un niveau similaire aux BMDC WT pourra être évalué afin de confirmer le rôle du cholestérol lors de la présentation antigénique en absence de VAMP3. Finalement, le cholestérol est également essentiel à la présentation antigénique croisée de l'ovalbumine, sa déplétion entraînant l'inhibition de la présentation antigénique (Albrecht, Gatfield et al. 2006). Il est donc possible que l'homéostasie du cholestérol ait un impact sur la présentation antigénique croisée de notre système qui utilise l'ovalbumine. De plus, la déplétion du cholestérol à la membrane plasmique entraîne une augmentation du recyclage rapide via Rab4 (Chen, Yang et al. 2008). Cette augmentation du recyclage rapide pourrait servir à rétablir le niveau de cholestérol à la membrane plasmique et pourrait être dépendant de VAMP3.

Finalement, une des particularités des cellules dendritiques leur permettant de présenter plus efficacement l'antigène est leur capacité à contrôler l'assemblage de la V-ATPase. Les cellules dendritiques contrôlent ainsi l'acidification des phagosomes, ce qui limite la destruction des antigènes (Trombetta, Ebersold et al. 2003). L'accumulation du cholestérol aux endosomes entraîne également la dissociation de la V-ATPase (Cox, Griffin et al. 2007, Lafourcade, Sobo et al. 2008). L'accumulation accrue de cholestérol aux PV communales de *L. amazonensis* et non aux PV individuelles de *L. major* en absence de VAMP3 pourraient ainsi limiter l'assemblage de la V-ATPase ce qui entraînerait une augmentation de la présentation antigénique. La dissociation de la V-ATPase lors des infections par *L. major* et *L. amazonensis* pourra être mesurée par l'utilisation de billes-FITC dont la fluorescence diminue avec le pH.

L'absence de différence de présentation antigénique croisée observée entre les cellules WT et Vamp3^{-/-} pourrait donc s'expliquer par l'absence de perturbation de l'homéostasie du cholestérol en absence d'infection. La perturbation de cette homéostasie par *L. major* et *L. amazonensis* pourrait ainsi expliquer l'augmentation de la présentation antigénique croisée des billes-OVA 6h et 48h après l'infection pour *L. major*. L'absence d'augmentation de la présentation antigénique croisée 48h après l'infection lors de l'infection par *L. amazonensis* peut s'expliquer par la nature hautement fusogénique de ces PV. Les PVs de *L. amazonensis* sont capables de fusionner avec les phagosomes de billes et nous avons également observé une grande quantité de billes-OVA à l'intérieur des PV communales de *L. amazonensis*. Comme précédemment suggéré, les billes-OVA internalisées par les PV communales se retrouvent donc dans un compartiment limitant la présentation antigénique, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence de présentation antigénique croisée observée à 48h après l'infection pour les billes-OVA. *L. major* pour sa part n'a pas d'augmentation de recrutement de l'ATP6V₀a3 à sa PV en absence de VAMP3, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence de présentation antigénique croisée en absence de VAMP3 pour ces parasites. L'augmentation de la présentation antigénique croisée de *L. amazonensis* OVA en absence de VAMP3 pourrait donc quant à elle être expliquée par le recrutement accru de la V-ATPase et des gouttelettes lipidiques et par le recrutement potentiellement accru du cholestérol aux PV communales.

2. 1. 6 *In vivo*

Nous avons finalement voulu étudier l'effet engendré par l'absence de VAMP3 au niveau de l'infection de la souris. Pour ce faire, nous avons utilisé la forme la plus infectieuse du parasite, soit la forme métacyclique, obtenue par gradient de Ficoll. Pour ces infections, nous avons injecté 10 000 promastigotes métacycliques de *L. amazonensis* LV79 au niveau intradermal des oreilles de souris WT ou *Vamp3^{-/-}*. Nous avons évalué la taille des lésions aux 2 semaines et la parasitémie et le recrutement cellulaire aux oreilles infectées aux semaines 3, 6 et 9. Nous nous sommes limités à 9 semaines d'infection pour éviter l'entrée en nécrose des oreilles qui peut avoir lieu entre 10 et 12 semaines après l'injection selon la souche de parasite à l'étude. Ces infections ne démontrent qu'une tendance pour les souris *Vamp3^{-/-}* à développer de plus grandes plaies avec une plus grande parasitémie, ainsi qu'une tendance à avoir un recrutement de monocytes totaux et monocytes pro-inflammatoires diminué. (Figure A1. 7). Cette absence de différence significative pour les souris *Vamp3^{-/-}* pourrait s'expliquer de manière multifactorielle. Tout d'abord, l'absence de VAMP3 entraîne une diminution de la mobilité et de l'adhésion cellulaire, notamment par une diminution du recyclage des intégrines à la membrane plasmique. Cette diminution peut également se traduire par un nombre diminué de cellules afférentes au site d'infection, ce qui limiterait ainsi l'échelle de l'infection. Ainsi donc, même si les macrophages *Vamp3^{-/-}* permettent une meilleure survie intracellulaire, leur nombre limité entraîne une diminution de la parasitémie observable. De plus, la présentation antigénique croisée augmentée pourrait également jouer un rôle important lors de la limitation de la parasitémie et de l'infection en général. Un plus grand nombre de réplicats pourrait tout d'abord rendre les tendances observées significatives, les infections *in vivo* ayant en général une grande variabilité. Des "knock-out" cellules spécifiques pourraient également permettre de mieux comprendre le rôle de VAMP3 lors de l'infection du modèle animal.

2. 2 VAMP8 régulateur d'infection

Notre groupe ayant précédemment démontré l'importance de VAMP8 lors de l'infection par *L. major* et *L. amazonensis* PH8 recrutant massivement VAMP8 à sa PV communale, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'absence de VAMP8 sur la formation des PV communales et sur la survie de *L. amazonensis*. Pour ce faire, nous avons infecté des BMM WT et *Vamp8^{-/-}*. Étonnamment, l'absence de VAMP8 entraîna une diminution du volume des PV de nos deux souches de *L. amazonensis*, indiquant un effet indépendant du recrutement sur la biogenèse de ces PV. L'absence de VAMP8 entraîna également une diminution significative de la survie intracellulaire de *L. amazonensis* PH8 sans toutefois affecter *L. amazonensis* LV79 et *L. major* GLC94 avec un index d'infection de près de 100% dans tous les cas (Figure A3. 7). L'élargissement des vacuoles communales peut donc être dissocié de la survie intracellulaire de *Leishmania* pour les espèces les produisant, la survie de *L. amazonensis* LV79 restant similaire malgré la diminution du volume de sa PV. VAMP8 pourrait ainsi participer au recrutement des membranes essentielles au développement des PV communales en médiant la fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes ou en promouvant la fusion homotypique entre les vacuoles communales. Cette différence de survie en absence de VAMP8 pour les souches LV79 et PH8 reste par contre à étudier. Il est possible que l'interchangeabilité de VAMP8 et VAMP3 soit l'un des mécanismes menant aux différences observées. En absence de VAMP8, il est possible que les événements de fusion membranaire soient préféablement accomplis par VAMP3 qui possède, comme nous l'avons démontré, un rôle de régulateur négatif de l'infection par *L. amazonensis*. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de VAMP8 sur l'infection par *L. amazonensis* LV79 et PH8 *in vivo*.

3 Cibles thérapeutiques potentielles

Le développement d'un modèle de recrutement de SNAREs aux PV complet pour les différentes espèces de *Leishmania* pourrait également être utile d'un point de vue du traitement de la maladie. Depuis plus de 20 ans déjà, la machinerie de fusion membranaire est étudiée grâce à la génération de liposomes présentant les différentes SNAREs caractérisées. C'est notamment l'une des méthodes qui ont été utilisées *in vitro* afin de découvrir certains des nombreux complexes de SNAREs possibles (Nickel, Weber et al. 1999, Zwilling, Cypionka et al. 2007, Vicogne and Pessin 2008). Depuis peu, des liposomes chargés de molécules anti-*Leishmania* sont utilisés lors des traitements de leishmaniose. De plus, de nombreuses études démontrent que cette méthode de livraison prometteuse entraîne une diminution drastique de la parasitémie (Ortega, Giorgio et al. 2017). L'utilisation de liposomes exposant des SNAREs complémentaires à celles identifiées à la surface des PV de *Leishmania* pourrait permettre une livraison spécifique du cargo anti-*Leishmania* à la PV, augmentant l'efficacité du médicament et limitant ainsi les effets néfastes pour le restant de la cellule. De nombreux microorganismes pathogènes intracellulaires comme *Salmonella*, *Coxiella*, *Legionella*, *Chlamydia* et *Mycobacterium* résident également à l'intérieur de phagosomes modifiés. De la même façon, la caractérisation des SNAREs retrouvées à leur surface pourrait être utile à leur traitement. La redondance mécanistique des SNAREs fait également de ces SNAREs d'excellentes cibles thérapeutiques, leur ciblage n'entraînant en général pas d'effet毒ique sur la cellule comme démontré par le ciblage de STX5 par Retro-2 (Canton and Kima 2012).

Comme nous avons démontré des effets conservés indépendants du recrutement pour VAMP3 et VAMP8, l'effet des SNAREs sur les PV communales de *Leishmania* est possiblement conservé lors de la biogenèse d'organelles spécifiques par différents microorganismes pathogènes intracellulaires comme ceux mentionnés plus haut. Ainsi, l'étude de ces SNAREs pourrait également permettre d'identifier des mécanismes de pathogenèse conservés.

CONCLUSION

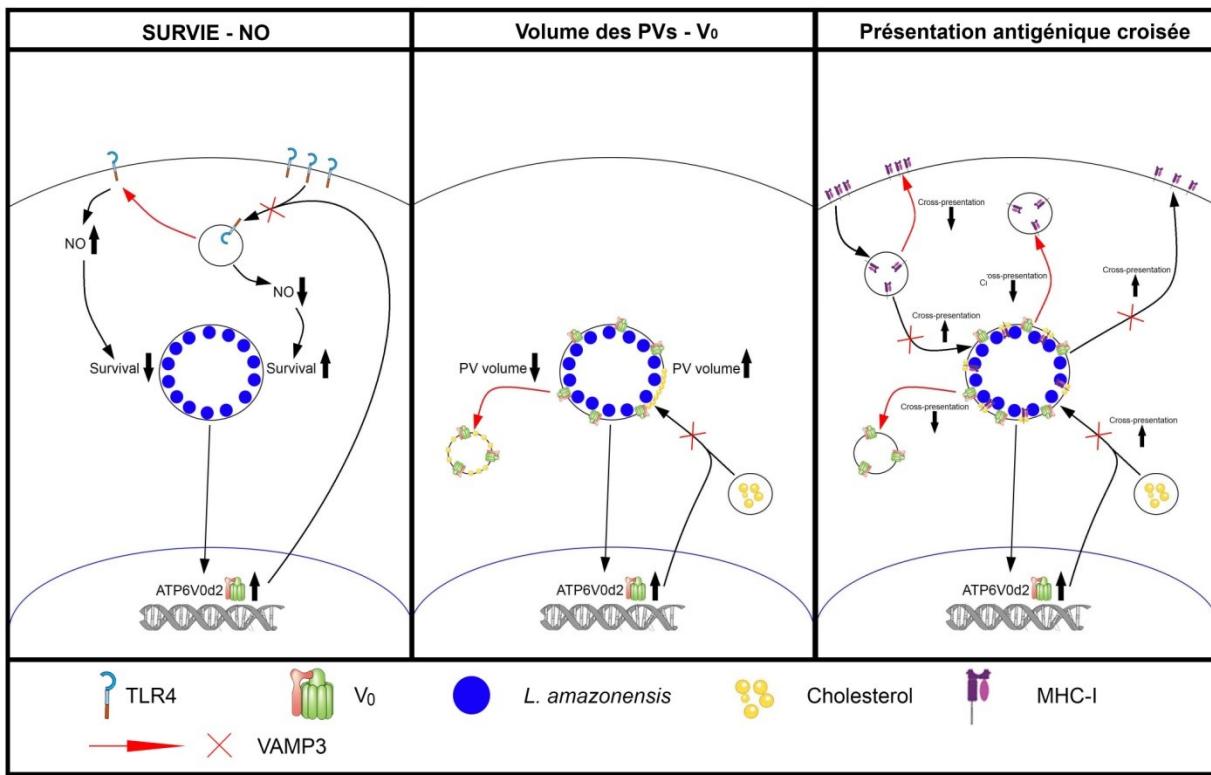


Figure 3.2 Mécanismes de régulation possibles

Ce projet fut la première étude comparative d'envergure se concentrant sur les différences au niveau de la biogenèse des vacuoles parasitophores communales et individuelles de *Leishmania*. Un des accomplissements majeurs de cette étude fut de générer un modèle complet des recrutements des protéines de fusion membranaires SNAREs et de leurs membranes associées. Ce modèle, en plus de souligner et caractériser des différences majeures au niveau des événements de fusion membranaire menant à la formation des deux types de PV et même entre souches de la même espèce, a permis de générer une quantité de cibles importantes pour de futures études, soit SNAP23, VAMP3, VAMP8, Vti1a et STX18. Nous avons également caractérisé pour une première fois l'impact des PV communales sur la présentation antigénique croisée. Nous avons établi VAMP3 comme étant un facteur de régulation de l'infection par *L. amazonensis* et comme facteur limitant la présentation antigénique croisée. Nous avons également établi VAMP8 comme facteur favorisant l'expansion des PV communales. Nous proposons que VAMP3 limite l'expansion de la PV communale de *L. amazonensis* soit en limitant le recrutement du domaine V₀, ou en le recyclant de la PV. Nous proposons également que VAMP3 promouvoit la réponse à l'oxyde nitrique soit par sa régulation du domaine V₀ ou en recyclant le TLR4 à la surface cellulaire. Nous proposons finalement que VAMP3 agit comme régulateur négatif de la présentation antigénique par sa régulation du domaine V₀ ou par la limitation du recrutement du CMH-I aux PV. L'activité du domaine V₀ pourrait donc conférer aux phagosomes les propriétés essentielles à la présentation antigénique croisée. VAMP3, par sa régulation du domaine V₀, participerait à la modulation de ces propriétés et favoriserait le développement du phagosome en organelle microbicide. Ainsi, *L. amazonensis* clive VAMP3 afin de favoriser l'expansion de sa PV et de limiter la réponse à l'oxyde nitrique pour favoriser son développement intracellulaire dans les macrophages. Ce clivage n'est toutefois pas suffisant pour empêcher l'inhibition de la présentation antigénique croisée et favorise donc l'infection (Figure 3. 2).

BIBLIOGRAPHIE

- Abonyo, B. O., D. Gou, P. Wang, T. Narasaraju, Z. Wang and L. Liu (2004). "Syntaxin 2 and SNAP-23 are required for regulated surfactant secretion." *Biochemistry* **43**(12): 3499-3506.
- Abu-Dayyeh, I., K. Hassani, E. R. Westra, J. C. Mottram and M. Olivier (2010). "Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions." *Infect Immun* **78**(6): 2438-2445.
- Abu-Dayyeh, I., M. T. Shio, S. Sato, S. Akira, B. Cousineau and M. Olivier (2008). "*Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif." *PLoS Negl Trop Dis* **2**(12): e305.
- Agarwal, V., P. Naskar, S. Agasti, G. K. Khurana, P. Vishwakarma, A. M. Lynn, P. A. Roche and N. Puri (2019). "The cysteine-rich domain of synaptosomal-associated protein of 23kDa (SNAP-23) regulates its membrane association and regulated exocytosis from mast cells." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1866**(10): 1618-1633.
- Akhoundi, M., T. Downing, J. Votypka, K. Kuhls, J. Lukes, A. Cannet, C. Ravel, P. Marty, P. Delaunay, M. Kasbari, B. Granouillac, L. Gradoni and D. Sereno (2017). "*Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis." *Mol Aspects Med* **57**: 1-29.
- Albrecht, I., J. Gatfield, T. Mini, P. Jeno and J. Pieters (2006). "Essential role for cholesterol in the delivery of exogenous antigens to the MHC class I-presentation pathway." *Int Immunol* **18**(5): 755-765.
- Alcaide, P. and M. Fresno (2004). "AgC10, a mucin from *Trypanosoma cruzi*, destabilizes TNF and cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38." *Eur J Immunol* **34**(6): 1695-1704.
- Alexander, J. and K. Vickerman (1975). "Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages." *J Protozool* **22**(4): 502-508.
- Ali, K. S., R. C. Rees, C. Terrell-Nield and S. A. Ali (2013). "Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to *Leishmania mexicana*." *Parasite Immunol* **35**(12): 441-456.
- Allen, L. A., C. Yang and J. E. Pessin (2002). "Rate and extent of phagocytosis in macrophages lacking vamp3." *J Leukoc Biol* **72**(1): 217-221.
- Amara, A. and J. Mercer (2015). "Viral apoptotic mimicry." *Nat Rev Microbiol* **13**(8): 461-469.
- Ambruso, D. R., C. Knall, A. N. Abell, J. Panepinto, A. Kurkchubasche, G. Thurman, C. Gonzalez-Aller, A. Hiester, M. deBoer, R. J. Harbeck, R. Oyer, G. L. Johnson and D. Roos (2000). "Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4654-4659.
- Anand, I. S., W. Choi and R. R. Isberg (2020). "Components of the endocytic and recycling trafficking pathways interfere with the integrity of the *Legionella*-containing vacuole." *Cell Microbiol* **22**(4): e13151.

Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, K. L. Strobe, S. L. Barrett, B. T. Cookson, S. M. Logan and A. Aderem (2005). "Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9247-9252.

Andrade, L. O. and N. W. Andrews (2004). "Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells." J Exp Med **200**(9): 1135-1143.

Andrews, N. W., C. K. Abrams, S. L. Slatin and G. Griffiths (1990). "A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH." Cell **61**(7): 1277-1287.

Aniento, F., F. Gu, R. G. Parton and J. Gruenberg (1996). "An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes." J Cell Biol **133**(1): 29-41.

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

Antoine, J. C., E. Prina, N. Courret and T. Lang (2004). "*Leishmania spp.*: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts." Adv Parasitol **58**: 1-68.

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

Aoki, T., S. Ichimura, A. Itoh, M. Kuramoto, T. Shinkawa, T. Isobe and M. Tagaya (2009). "Identification of the neuroblastoma-amplified gene product as a component of the syntaxin 18 complex implicated in Golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport." Mol Biol Cell **20**(11): 2639-2649.

Arandjelovic, S. and K. S. Ravichandran (2015). "Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis." Nat Immunol **16**(9): 907-917.

Arango Duque, G., M. Fukuda and A. Descoteaux (2013). "Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages." J Immunol **190**(4): 1737-1745.

Arango Duque, G., M. Fukuda, S. J. Turco, S. Stager and A. Descoteaux (2014). "*Leishmania* promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI." J Immunol **193**(5): 2363-2372.

Arango Duque, G., A. Jardim, E. Gagnon, M. Fukuda and A. Descoteaux (2019). "The host cell secretory pathway mediates the export of *Leishmania* virulence factors out of the parasitophorous vacuole." PLoS Pathog **15**(7): e1007982.

Arasaki, K., D. K. Toomre and C. R. Roy (2012). "The *Legionella pneumophila* effector DrrA is sufficient to stimulate SNARE-dependent membrane fusion." Cell Host Microbe **11**(1): 46-57.

Ashok, D., S. Schuster, C. Ronet, M. Rosa, V. Mack, C. Lavanchy, S. F. Marraco, N. Fasel, K. M. Murphy, F. Tacchini-Cottier and H. Acha-Orbea (2014). "Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection." Eur J Immunol **44**(5): 1422-1432.

Assis, R. R., I. C. Ibraim, F. S. Noronha, S. J. Turco and R. P. Soares (2012). "Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1543.

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

Bajno, L., X. R. Peng, A. D. Schreiber, H. P. Moore, W. S. Trimble and S. Grinstein (2000). "Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation." J Cell Biol **149**(3): 697-706.

Banerjee, A., G. Li, E. A. Alexander and J. H. Schwartz (2001). "Role of SNAP-23 in trafficking of H⁺-ATPase in cultured inner medullary collecting duct cells." Am J Physiol Cell Physiol **280**(4): C775-781.

Banerjee, M., S. Joshi, J. Zhang, C. L. Moncman, S. Yadav, B. A. Bouchard, B. Storrie and S. W. Whiteheart (2017). "Cellubrevin/vesicle-associated membrane protein-3-mediated endocytosis and trafficking regulate platelet functions." Blood **130**(26): 2872-2883.

Barcinski, M. A., M. E. Moreira, J. M. Balanco, J. L. Wanderley and A. C. Bonomo (2003). "The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior?" Kinetoplastid Biol Dis **2**(1): 6.

Bared, S. M., C. Buechler, A. Boettcher, R. Dayoub, A. Sigruener, M. Grandl, C. Rudolph, A. Dada and G. Schmitz (2004). "Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells." Mol Biol Cell **15**(12): 5399-5407.

Batista, M. F., C. A. Najera, I. Meneghelli and D. Bahia (2020). "The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival." Front Cell Dev Biol **8**: 396.

Bayer, M. J., C. Reese, S. Buhler, C. Peters and A. Mayer (2003). "Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel." J Cell Biol **162**(2): 211-222.

Behrendorff, N., S. Dolai, W. Hong, H. Y. Gaisano and P. Thorn (2011). "Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) is a SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) selectively required for sequential granule-to-granule fusion." J Biol Chem **286**(34): 29627-29634.

Belkaid, Y., E. Von Stebut, S. Mendez, R. Lira, E. Caler, S. Bertholet, M. C. Udey and D. Sacks (2002). "CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*." J Immunol **168**(8): 3992-4000.

Bertholet, S., A. Debrabant, F. Afrin, E. Caler, S. Mendez, K. S. Tabbara, Y. Belkaid and D. L. Sacks (2005). "Antigen requirements for efficient priming of CD8+ T cells by *Leishmania major*-infected dendritic cells." Infect Immun **73**(10): 6620-6628.

Bertholet, S., R. Goldszmid, A. Morrot, A. Debrabant, F. Afrin, C. Collazo-Custodio, M. Houde, M. Desjardins, A. Sher and D. Sacks (2006). "*Leishmania* antigens are

presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo." *J Immunol* **177**(6): 3525-3533.

Bethani, I., A. Werner, C. Kadian, U. Geumann, R. Jahn and S. O. Rizzoli (2009). "Endosomal fusion upon SNARE knockdown is maintained by residual SNARE activity and enhanced docking." *Traffic* **10**(10): 1543-1559.

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

Bhaumik, P., G. St-Pierre, V. Milot, C. St-Pierre and S. Sato (2013). "Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection." *J Immunol* **190**(2): 630-640.

Bierne, H., E. Milohanic and M. Kortebi (2018). "To Be Cytosolic or Vacuolar: The Double Life of *Listeria monocytogenes*." *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 136.

Binz, T. (2013). "Clostridial neurotoxin light chains: devices for SNARE cleavage mediated blockade of neurotransmission." *Curr Top Microbiol Immunol* **364**: 139-157.

Birge, R. B., S. Boeltz, S. Kumar, J. Carlson, J. Wanderley, D. Calianese, M. Barcinski, R. A. Brekken, X. Huang, J. T. Hutchins, B. Freimark, C. Empig, J. Mercer, A. J. Schroit, G. Schett and M. Herrmann (2016). "Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer." *Cell Death Differ* **23**(6): 962-978.

Blackwell, J. M., R. A. Ezekowitz, M. B. Roberts, J. Y. Channon, R. B. Sim and S. Gordon (1985). "Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum." *J Exp Med* **162**(1): 324-331.

Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K. A. Siminovitch and M. Olivier (1999). "*Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation." *Eur J Immunol* **29**(11): 3737-3744.

Blander, J. M. (2016). "The comings and goings of MHC class I molecules herald a new dawn in cross-presentation." *Immunol Rev* **272**(1): 65-79.

Blander, J. M. (2018). "Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation." *Annu Rev Immunol* **36**: 717-753.

Blum, J. S., P. A. Wearsch and P. Cresswell (2013). "Pathways of antigen processing." *Annu Rev Immunol* **31**: 443-473.

Boddul, S. V., J. Meng, J. O. Dolly and J. Wang (2014). "SNAP-23 and VAMP-3 contribute to the release of IL-6 and TNFalpha from a human synovial sarcoma cell line." *FEBS J* **281**(3): 750-765.

Bogdan, C., N. Donhauser, R. Doring, M. Rollinghoff, A. Diefenbach and M. G. Rittig (2000). "Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis." *J Exp Med* **191**(12): 2121-2130.

Bogdan, C., J. Mattner and U. Schleicher (2004). "The role of type I interferons in non-viral infections." *Immunol Rev* **202**: 33-48.

Bonifacino, J. S. and A. Hierro (2011). "Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network." *Trends Cell Biol* **21**(3): 159-167.

Bossis, I., R. B. Roden, R. Gambhira, R. Yang, M. Tagaya, P. M. Howley and P. I. Meneses (2005). "Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection." J Virol **79**(11): 6723-6731.

Botelho, R. J., D. J. Hackam, A. D. Schreiber and S. Grinstein (2000). "Role of COPI in phagosome maturation." J Biol Chem **275**(21): 15717-15727.

Bougneres, L., J. Helft, S. Tiwari, P. Vargas, B. H. Chang, L. Chan, L. Campisi, G. Lauvau, S. Hugues, P. Kumar, A. O. Kamphorst, A. M. Dumenil, M. Nussenzweig, J. D. MacMicking, S. Amigorena and P. Guermonprez (2009). "A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells." Immunity **31**(2): 232-244.

Bouvier, J., P. Schneider, R. Etges and C. Bordier (1990). "Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*." Biochemistry **29**(43): 10113-10119.

Bowie, A., E. Kiss-Toth, J. A. Symons, G. L. Smith, S. K. Dower and L. A. O'Neill (2000). "A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10162-10167.

Brandhorst, D., D. Zwilling, S. O. Rizzoli, U. Lippert, T. Lang and R. Jahn (2006). "Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2701-2706.

Braun, V., V. Fraisier, G. Raposo, I. Hurbain, J. B. Sibarita, P. Chavrier, T. Galli and F. Niedergang (2004). "TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages." EMBO J **23**(21): 4166-4176.

Brittingham, A., C. J. Morrison, W. R. McMaster, B. S. McGwire, K. P. Chang and D. M. Mosser (1995). "Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." J Immunol **155**(6): 3102-3111.

Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy and B. van Deurs (2000). "Rab7: a key to lysosome biogenesis." Mol Biol Cell **11**(2): 467-480.

Calegari-Silva, T. C., A. C. Vivarini, M. Miqueline, G. R. Dos Santos, K. L. Teixeira, A. M. Saliba, S. Nunes de Carvalho, L. de Carvalho and U. G. Lopes (2015). "The human parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF-kappaB p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway." Open Biol **5**(9): 150118.

Calegari-Silva, T. C., A. C. Vivarini, R. M. S. Pereira, K. L. Dias-Teixeira, C. T. Rath, A. S. S. Pacheco, G. B. L. Silva, C. A. S. Pinto, J. V. Dos Santos, A. M. Saliba, C. E. P. Corbett, C. M. de Castro Gomes, N. Fasel and U. G. Lopes (2018). "*Leishmania amazonensis* downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism." Eur J Immunol **48**(7): 1188-1198.

Callaghan, J., S. Nixon, C. Bucci, B. H. Toh and H. Stenmark (1999). "Direct interaction of EEA1 with Rab5b." Eur J Biochem **265**(1): 361-366.

Calvano, J. E., D. M. Agnese, J. Y. Um, M. Goshima, R. Singhal, S. M. Coyle, M. T. Reddell, A. Kumar, S. E. Calvano and S. F. Lowry (2003). "Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance." Shock **20**(5): 415-419.

- Cameron, P., A. McGachy, M. Anderson, A. Paul, G. H. Coombs, J. C. Mottram, J. Alexander and R. Plevin (2004). "Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway." J Immunol **173**(5): 3297-3304.
- Campbell, K. A., P. J. Ovendale, M. K. Kennedy, W. C. Fanslow, S. G. Reed and C. R. Maliszewski (1996). "CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*." Immunity **4**(3): 283-289.
- Campoy, E. M., M. E. Mansilla and M. I. Colombo (2013). "Endocytic SNAREs are involved in optimal *Coxiella burnetii* vacuole development." Cell Microbiol **15**(6): 922-941.
- Canton, I. and G. Battaglia (2012). "Endocytosis at the nanoscale." Chem Soc Rev **41**(7): 2718-2739.
- Canton, J. and P. E. Kima (2012). "Interactions of pathogen-containing compartments with the secretory pathway." Cell Microbiol **14**(11): 1676-1686.
- Canton, J. and P. E. Kima (2012). "Targeting host syntaxin-5 preferentially blocks *Leishmania* parasitophorous vacuole development in infected cells and limits experimental *Leishmania* infections." Am J Pathol **181**(4): 1348-1355.
- Canton, J., B. Ndjamen, K. Hatsuzawa and P. E. Kima (2012). "Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection." Cell Microbiol **14**(6): 937-948.
- Carlin, A. F., Y. C. Chang, T. Areschoug, G. Lindahl, N. Hurtado-Ziola, C. C. King, A. Varki and V. Nizet (2009). "Group B *Streptococcus* suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5." J Exp Med **206**(8): 1691-1699.
- Carlin, A. F., S. Uchiyama, Y. C. Chang, A. L. Lewis, V. Nizet and A. Varki (2009). "Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response." Blood **113**(14): 3333-3336.
- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-1721.
- Case, E. D., J. A. Smith, T. A. Ficht, J. E. Samuel and P. de Figueiredo (2016). "Space: A Final Frontier for Vacuolar Pathogens." Traffic **17**(5): 461-474.
- Casgrain, P. A., C. Martel, W. R. McMaster, J. C. Mottram, M. Olivier and A. Descoteaux (2016). "Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression." PLoS Pathog **12**(5): e1005658.
- Castaneda-Ramirez, A., J. L. Puente, A. Gonzalez-Noriega and A. Verdugo-Rodriguez (2012). "Silencing of VAMP3 expression does not affect *Brucella melitensis* infection in mouse macrophages." Virulence **3**(5): 434-439.
- Castle, J. D., Z. Guo and L. Liu (2002). "Function of the t-SNARE SNAP-23 and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) in exocytosis in mast cells." Mol Immunol **38**(16-18): 1337-1340.
- CDC. (2018 Resources for Health Professionals, October 15, 2018). "CDC, 2018 Resources for Health Professionals." Retrieved 24 April, 2020, from https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html.

CDC. (2019 courtesy of DPDx, July 17, 2019). "CDC, 2019 courtesy of DPDx." from <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

Cebrian, I., G. Visentin, N. Blanchard, M. Jouve, A. Bobard, C. Moita, J. Enninga, L. F. Moita, S. Amigorena and A. Savina (2011). "Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells." *Cell* **147**(6): 1355-1368.

Chakraborty, D., S. Banerjee, A. Sen, K. K. Banerjee, P. Das and S. Roy (2005). "*Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts." *J Immunol* **175**(5): 3214-3224.

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

Charron, A. J. and L. D. Sibley (2004). "Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*." *Traffic* **5**(11): 855-867.

Chawla, M. and R. A. Vishwakarma (2003). "Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of *Leishmania* is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression." *J Lipid Res* **44**(3): 594-600.

Chen, D., P. P. Lemons, T. Schraw and S. W. Whiteheart (2000). "Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release." *Blood* **96**(5): 1782-1788.

Chen, H., J. Yang, P. S. Low and J. X. Cheng (2008). "Cholesterol level regulates endosome motility via Rab proteins." *Biophys J* **94**(4): 1508-1520.

Chen, Y. A. and R. H. Scheller (2001). "SNARE-mediated membrane fusion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 98-106.

Chow, C., S. Cloutier, C. Dumas, M. N. Chou and B. Papadopoulou (2011). "Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2alpha kinase-dependent eIF2alpha phosphorylation." *Cell Microbiol* **13**(7): 1059-1077.

Cinelli, M. A., H. T. Do, G. P. Miley and R. B. Silverman (2020). "Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition." *Med Res Rev* **40**(1): 158-189.

Cipriano, D. J., Y. Wang, S. Bond, A. Hinton, K. C. Jefferies, J. Qi and M. Forgac (2008). "Structure and regulation of the vacuolar ATPases." *Biochim Biophys Acta* **1777**(7-8): 599-604.

Cirl, C., A. Wieser, M. Yadav, S. Duerr, S. Schubert, H. Fischer, D. Stappert, N. Wantia, N. Rodriguez, H. Wagner, C. Svanborg and T. Miethke (2008). "Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins." *Nat Med* **14**(4): 399-406.

Climer, L. K., M. Dobretsov and V. Lupashin (2015). "Defects in the COG complex and COG-related trafficking regulators affect neuronal Golgi function." *Front Neurosci* **9**: 405.

Clough, B. and E. M. Frickel (2017). "The *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host-Parasite Frontier." *Trends Parasitol* **33**(6): 473-488.

Coats, S. R., A. B. Berezow, T. T. To, S. Jain, B. W. Bainbridge, K. P. Banani and R. P. Darveau (2011). "The lipid A phosphate position determines differential host Toll-like

receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria." *Infect Immun* **79**(1): 203-210.

Collins, R. F., A. D. Schreiber, S. Grinstein and W. S. Trimble (2002). "Syntaxins 13 and 7 function at distinct steps during phagocytosis." *J Immunol* **169**(6): 3250-3256.

Contreras, I., M. A. Gomez, O. Nguyen, M. T. Shio, R. W. McMaster and M. Olivier (2010). "*Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63." *PLoS Pathog* **6**(10): e1001148.

Corradin, S., A. Ransijn, G. Corradin, J. Bouvier, M. B. Delgado, J. Fernandez-Carneado, J. C. Mottram, G. Vergeres and J. Mauel (2002). "Novel peptide inhibitors of *Leishmania* gp63 based on the cleavage site of MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate)-related protein." *Biochem J* **367**(Pt 3): 761-769.

Cortez, M., C. Huynh, M. C. Fernandes, K. A. Kennedy, A. Aderem and N. W. Andrews (2011). "*Leishmania* promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200." *Cell Host Microbe* **9**(6): 463-471.

Cosen-Binker, L. I., M. G. Binker, C. C. Wang, W. Hong and H. Y. Gaisano (2008). "VAMP8 is the v-SNARE that mediates basolateral exocytosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis." *J Clin Invest* **118**(7): 2535-2551.

Courret, N., C. Frehel, N. Gouhier, M. Pouchelet, E. Prina, P. Roux and J. C. Antoine (2002). "Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites." *J Cell Sci* **115**(Pt 11): 2303-2316.

Courret, N., E. Prina, E. Mougneau, E. M. Saraiva, D. L. Sacks, N. Glaichenhaus and J. C. Antoine (1999). "Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites." *Eur J Immunol* **29**(3): 762-773.

Cox, B. E., E. E. Griffin, J. C. Ullery and W. G. Jerome (2007). "Effects of cellular cholesterol loading on macrophage foam cell lysosome acidification." *J Lipid Res* **48**(5): 1012-1021.

Crauwels, P., R. Bohn, M. Thomas, S. Gottwalt, F. Jackel, S. Kramer, E. Bank, S. Tenzer, P. Walther, M. Bastian and G. van Zandbergen (2015). "Apoptotic-like *Leishmania* exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination." *Autophagy* **11**(2): 285-297.

Cruz, F. M., J. D. Colbert, E. Merino, B. A. Kriegsman and K. L. Rock (2017). "The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules." *Annu Rev Immunol* **35**: 149-176.

Cueto, J. A., M. C. Vanrell, B. N. Salassa, S. Nola, T. Galli, M. I. Colombo and P. S. Romano (2017). "Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required during *Trypanosoma cruzi* parasitophorous vacuole development." *Cell Microbiol* **19**(6).

Cullen, T. W., D. K. Giles, L. N. Wolf, C. Ecobichon, I. G. Boneca and M. S. Trent (2011). "*Helicobacter pylori* versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa." *PLoS Pathog* **7**(12): e1002454.

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

da Silva Vieira, T., G. Arango Duque, K. Ory, C. M. Gontijo, R. P. Soares and A. Descoteaux (2019). "*Leishmania braziliensis*: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation." *Front Cell Infect Microbiol* **9**: 319.

Dai, S., Y. Zhang, T. Weimbs, M. B. Yaffe and D. Zhou (2007). "Bacteria-generated PtdIns(3)P recruits VAMP8 to facilitate phagocytosis." *Traffic* **8**(10): 1365-1374.

Damatta, R. A., S. H. Seabra, P. Deolindo, A. C. Arnholdt, L. Manhaes, S. Goldenberg and W. de Souza (2007). "*Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism." *FEMS Microbiol Lett* **266**(1): 29-33.

Das, S., A. K. Saha, A. T. Remaley, R. H. Glew, J. N. Dowling, M. Kajiyoshi and M. Gottlieb (1986). "Hydrolysis of phosphoproteins and inositol phosphates by cell surface phosphatase of *Leishmania donovani*." *Mol Biochem Parasitol* **20**(2): 143-153.

Davis, A. S., I. Vergne, S. S. Master, G. B. Kyei, J. Chua and V. Deretic (2007). "Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes." *PLoS Pathog* **3**(12): e186.

De Groote, M. A. and F. C. Fang (1995). "NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide." *Clin Infect Dis* **21 Suppl 2**: S162-165.

de Mendonca, S. C., L. Cysne-Finkelstein and D. C. Matos (2015). "Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*." *Front Immunol* **6**: 524.

de Rezende, E., R. Kawahara, M. S. Pena, G. Palmisano and B. S. Stolf (2017). "Quantitative proteomic analysis of amastigotes from *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 strains reveals molecular traits associated with the virulence phenotype." *PLoS Negl Trop Dis* **11**(11): e0006090.

De Vriese, A. S., S. Sethi, J. Van Praet, K. A. Nath and F. C. Fervenza (2015). "Kidney Disease Caused by Dysregulation of the Complement Alternative Pathway: An Etiologic Approach." *J Am Soc Nephrol* **26**(12): 2917-2929.

Delamarre, L., M. Pack, H. Chang, I. Mellman and E. S. Trombetta (2005). "Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate." *Science* **307**(5715): 1630-1634.

Delevoye, C., M. Nilges, P. Dehoux, F. Paumet, S. Perrinet, A. Dautry-Varsat and A. Subtil (2008). "SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000022.

Denise, H., K. McNeil, D. R. Brooks, J. Alexander, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2003). "Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo." *Infect Immun* **71**(6): 3190-3195.

Deschamps, C., A. Echard and F. Niedergang (2013). "Phagocytosis and cytokinesis: do cells use common tools to cut and to eat? Highlights on common themes and differences." *Traffic* **14**(4): 355-364.

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

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

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

Desjardins, M., L. A. Huber, R. G. Parton and G. Griffiths (1994). "Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus." J Cell Biol **124**(5): 677-688.

Di Martino, R., L. Sticco and A. Luini (2019). "Regulation of cargo export and sorting at the trans-Golgi network." FEBS Lett **593**(17): 2306-2318.

Ding, X., H. Pan, J. Li, Q. Zhong, X. Chen, S. M. Dry and C. Y. Wang (2013). "Epigenetic activation of AP1 promotes squamous cell carcinoma metastasis." Sci Signal **6**(273): ra28 21-13, S20-15.

Dingjan, I., P. T. A. Linders, D. R. J. Verboogen, N. H. Revelo, M. Ter Beest and G. van den Bogaart (2018). "Endosomal and Phagosomal SNAREs." Physiol Rev **98**(3): 1465-1492.

Dingjan, I., L. M. Paardekooper, D. R. J. Verboogen, G. F. von Mollard, M. Ter Beest and G. van den Bogaart (2017). "VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release." Eur J Cell Biol **96**(7): 705-714.

Dong, G., P. A. Wearsch, D. R. Peaper, P. Cresswell and K. M. Reinisch (2009). "Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer." Immunity **30**(1): 21-32.

Dressel, R., L. Elsner, P. Novota, N. Kanwar and G. Fischer von Mollard (2010). "The exocytosis of lytic granules is impaired in Vti1b- or Vamp8-deficient CTL leading to a reduced cytotoxic activity following antigen-specific activation." J Immunol **185**(2): 1005-1014.

Duclos, S., R. Diez, J. Garin, B. Papadopoulou, A. Descoteaux, H. Stenmark and M. Desjardins (2000). "Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages." J Cell Sci **113 Pt 19**: 3531-3541.

Dulubova, I., S. Sugita, S. Hill, M. Hosaka, I. Fernandez, T. C. Sudhof and J. Rizo (1999). "A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18." EMBO J **18**(16): 4372-4382.

Dunkelberger, J. R. and W. C. Song (2010). "Complement and its role in innate and adaptive immune responses." Cell Res **20**(1): 34-50.

Dwyer, D. M. and M. Gottlieb (1984). "Surface membrane localization of 3'- and 5'-nucleotidase activities in *Leishmania donovani* promastigotes." Mol Biochem Parasitol **10**(2): 139-150.

Ellis, M., D. K. Sharma, J. D. Hilley, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2002). "Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63. Analysis using GP18

mutants deficient in glycosylphosphatidylinositol protein anchoring." *J Biol Chem* **277**(31): 27968-27974.

Emperador-Melero, J., V. Huson, J. van Weering, C. Bollmann, G. Fischer von Mollard, R. F. Toonen and M. Verhage (2018). "Vti1a/b regulate synaptic vesicle and dense core vesicle secretion via protein sorting at the Golgi." *Nat Commun* **9**(1): 3421.

Enrich, C., C. Rentero, A. Hierro and T. Grewal (2015). "Role of cholesterol in SNARE-mediated trafficking on intracellular membranes." *J Cell Sci* **128**(6): 1071-1081.

Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott and P. M. Henson (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." *J Clin Invest* **101**(4): 890-898.

Fang, F. C. (2004). "Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies." *Nat Rev Microbiol* **2**(10): 820-832.

Farah, F. S., S. A. Samra and N. Nuwayri-Salti (1975). "The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis." *Immunology* **29**(4): 755-764.

Feng, D., K. Crane, N. Rozenvayn, A. M. Dvorak and R. Flaumenhaft (2002). "Subcellular distribution of 3 functional platelet SNARE proteins: human cellubrevin, SNAP-23, and syntaxin 2." *Blood* **99**(11): 4006-4014.

Fermino, M. L., F. C. Dias, C. D. Lopes, M. A. Souza, A. K. Cruz, F. T. Liu, R. Chammas, M. C. Roque-Barreira, G. A. Rabinovich and E. S. Bernardes (2013). "Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells and influences the course of *Leishmania major* infection." *Eur J Immunol* **43**(7): 1806-1817.

Flannagan, R. S., G. Cosio and S. Grinstein (2009). "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies." *Nat Rev Microbiol* **7**(5): 355-366.

Flaumenhaft, R., K. Croce, E. Chen, B. Furie and B. C. Furie (1999). "Proteins of the exocytotic core complex mediate platelet alpha-granule secretion. Roles of vesicle-associated membrane protein, SNAP-23, and syntaxin 4." *J Biol Chem* **274**(4): 2492-2501.

Fooksman, D. R., G. K. Gronvall, Q. Tang and M. Edidin (2006). "Clustering class I MHC modulates sensitivity of T cell recognition." *J Immunol* **176**(11): 6673-6680.

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

Franco, L. H., S. M. Beverley and D. S. Zamboni (2012). "Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan." *J Parasitol Res* **2012**: 165126.

Frank, S. P., K. P. Thon, S. C. Bischoff and A. Lorentz (2011). "SNAP-23 and syntaxin-3 are required for chemokine release by mature human mast cells." *Mol Immunol* **49**(1-2): 353-358.

Fukasawa, M., O. Varlamov, W. S. Eng, T. H. Sollner and J. E. Rothman (2004). "Localization and activity of the SNARE Ykt6 determined by its regulatory domain and palmitoylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 4815-4820.

Furuta, N., N. Fujita, T. Noda, T. Yoshimori and A. Amano (2010). "Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes." Mol Biol Cell **21**(6): 1001-1010.

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

Galli, T., T. Chilcote, O. Mundigl, T. Binz, H. Niemann and P. De Camilli (1994). "Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells." J Cell Biol **125**(5): 1015-1024.

Ganley, I. G., E. Espinosa and S. R. Pfeffer (2008). "A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells." J Cell Biol **180**(1): 159-172.

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

Gaullier, J. M., A. Simonsen, A. D'Arrigo, B. Bremnes, H. Stenmark and R. Aasland (1998). "FYVE fingers bind PtdIns(3)P." Nature **394**(6692): 432-433.

Gay, G., L. Braun, M. P. Brenier-Pinchart, J. Vollaire, V. Josserand, R. L. Bertini, A. Varesano, B. Touquet, P. J. De Bock, Y. Coute, I. Tardieu, A. Bougdour and M. A. Hakimi (2016). "*Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-gamma-mediated host defenses." J Exp Med **213**(9): 1779-1798.

Gerdes, H. H. (2008). "Membrane traffic in the secretory pathway." Cell Mol Life Sci **65**(18): 2779-2780.

Ghigo, E., M. I. Colombo and R. A. Heinzen (2012). "The *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole." Adv Exp Med Biol **984**: 141-169.

Ghosh, J., M. Bose, S. Roy and S. N. Bhattacharyya (2013). "*Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection." Cell Host Microbe **13**(3): 277-288.

Gillooly, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton and H. Stenmark (2000). "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells." EMBO J **19**(17): 4577-4588.

Goldberg, A. C. and L. V. Rizzo (2015). "MHC structure and function - antigen presentation. Part 1." Einstein (Sao Paulo) **13**(1): 153-156.

Goldberg, A. C. and L. V. Rizzo (2015). "MHC structure and function - antigen presentation. Part 2." Einstein (Sao Paulo) **13**(1): 157-162.

Gomez, M. A., I. Contreras, M. Halle, M. L. Tremblay, R. W. McMaster and M. Olivier (2009). "*Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases." Sci Signal **2**(90): ra58.

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

Gordon, D. E., J. Chia, K. Jayawardena, R. Antrobus, F. Bard and A. A. Peden (2017). "VAMP3/Syb and YKT6 are required for the fusion of constitutive secretory carriers with the plasma membrane." PLoS Genet **13**(4): e1006698.

Gordon, S. (2016). "Phagocytosis: An Immunobiologic Process." Immunity **44**(3): 463-475.

Gossage, S. M., M. E. Rogers and P. A. Bates (2003). "Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle." Int J Parasitol **33**(10): 1027-1034.

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

Griffiths, G., B. Hoflack, K. Simons, I. Mellman and S. Kornfeld (1988). "The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes." Cell **52**(3): 329-341.

Guimaraes-Costa, A. B., T. S. DeSouza-Vieira, R. Paletta-Silva, A. L. Freitas-Mesquita, J. R. Meyer-Fernandes and E. M. Saraiva (2014). "3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps." Infect Immun **82**(4): 1732-1740.

Guimaraes-Costa, A. B., M. T. Nascimento, G. S. Froment, R. P. Soares, F. N. Morgado, F. Conceicao-Silva and E. M. Saraiva (2009). "*Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(16): 6748-6753.

Hajjar, A. M., M. D. Harvey, S. A. Shaffer, D. R. Goodlett, A. Sjostedt, H. Edebro, M. Forsman, M. Bystrom, M. Pelletier, C. B. Wilson, S. I. Miller, S. J. Skerrett and R. K. Ernst (2006). "Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors." Infect Immun **74**(12): 6730-6738.

Hakansson, S., A. J. Charron and L. D. Sibley (2001). "Toxoplasma vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole." EMBO J **20**(12): 3132-3144.

Hammami, A., T. Charpentier, M. Smans and S. Stager (2015). "IRF-5-Mediated Inflammation Limits CD8+ T Cell Expansion by Inducing HIF-1alpha and Impairing Dendritic Cell Functions during *Leishmania* Infection." PLoS Pathog **11**(6): e1004938.

Hammel, I., C. C. Wang, W. Hong and D. Amihai (2012). "VAMP8/endobrevin is a critical factor for the homotypic granule growth in pancreatic acinar cells." Cell Tissue Res **348**(3): 485-490.

Hammond, D. J. and W. E. Gutteridge (1984). "Purine and pyrimidine metabolism in the *Trypanosomatidae*." Mol Biochem Parasitol **13**(3): 243-261.

Handler, M. Z., P. A. Patel, R. Kapila, Y. Al-Qubati and R. A. Schwartz (2015). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management." J Am Acad Dermatol **73**(6): 911-926; 927-918.

Harrison, R. E., C. Bucci, O. V. Vieira, T. A. Schroer and S. Grinstein (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.

Hasegawa, H., Z. Yang, L. Oltedal, S. Davanger and J. C. Hay (2004). "Intramolecular protein-protein and protein-lipid interactions control the conformation and subcellular targeting of neuronal Ykt6." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4495-4508.

Hatsuzawa, K., H. Hirose, K. Tani, A. Yamamoto, R. H. Scheller and M. Tagaya (2000). "Syntaxin 18, a SNAP receptor that functions in the endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and cis-Golgi vesicle trafficking." J Biol Chem **275**(18): 13713-13720.

Hatsuzawa, K., T. Tamura, H. Hashimoto, H. Hashimoto, S. Yokoya, M. Miura, H. Nagaya and I. Wada (2006). "Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis." Mol Biol Cell **17**(9): 3964-3977.

He, H., M. P. Brenier-Pinchart, L. Braun, A. Kraut, B. Touquet, Y. Coute, I. Tardieu, M. A. Hakimi and A. Bougdour (2018). "Characterization of a *Toxoplasma* effector uncovers an alternative GSK3/beta-catenin-regulatory pathway of inflammation." Elife **7**.

Heinzel, F. P., M. D. Sadick, S. S. Mutha and R. M. Locksley (1991). "Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7011-7015.

Hepp, R., N. Puri, A. C. Hohenstein, G. L. Crawford, S. W. Whiteheart and P. A. Roche (2005). "Phosphorylation of SNAP-23 regulates exocytosis from mast cells." J Biol Chem **280**(8): 6610-6620.

Hey, A. S., T. G. Theander, L. Hviid, S. M. Hazrati, M. Kemp and A. Kharazmi (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, J. O., M. Awwad and R. J. North (1989). "Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*." J Exp Med **169**(5): 1819-1827.

Hinz, A. and R. Tampe (2012). "ABC transporters and immunity: mechanism of self-defense." Biochemistry **51**(25): 4981-4989.

Ho, Y. H., D. T. Cai, C. C. Wang, D. Huang and S. H. Wong (2008). "Vesicle-associated membrane protein-8/endobrevin negatively regulates phagocytosis of bacteria in dendritic cells." J Immunol **180**(5): 3148-3157.

Holland, P., M. L. Torgersen, K. Sandvig and A. Simonsen (2014). "LYST affects lysosome size and quantity, but not trafficking or degradation through autophagy or endocytosis." Traffic **15**(12): 1390-1405.

Holm, A., K. Tejle, K. E. Magnusson, A. Descoteaux and B. Rasmusson (2001). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation." Cell Microbiol **3**(7): 439-447.

Hong, W. (2005). "SNAREs and traffic." Biochim Biophys Acta **1744**(3): 493-517.

Hong, W. (2005). "SNAREs and traffic." Biochim Biophys Acta **1744**(2): 120-144.

- Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M. F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks and M. Desjardins (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." Nature **425**(6956): 402-406.
- Hsiao, C. H., C. Yao, P. Storlie, J. E. Donelson and M. E. Wilson (2008). "The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*." Mol Biochem Parasitol **157**(2): 148-159.
- Hu, C., M. Ahmed, T. J. Melia, T. H. Sollner, T. Mayer and J. E. Rothman (2003). "Fusion of cells by flipped SNAREs." Science **300**(5626): 1745-1749.
- Hu, C., D. Hardee and F. Minnear (2007). "Membrane fusion by VAMP3 and plasma membrane t-SNAREs." Exp Cell Res **313**(15): 3198-3209.
- Hunziker, W., T. Simmen and S. Honing (1996). "Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells." Nephrologie **17**(7): 347-350.
- Hurtado-Lorenzo, A., M. Skinner, J. El Annan, M. Futai, G. H. Sun-Wada, S. Bourgoin, J. Casanova, A. Wildeman, S. Bechoua, D. A. Ausiello, D. Brown and V. Marshansky (2006). "V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway." Nat Cell Biol **8**(2): 124-136.
- Iinuma, T., T. Aoki, K. Arasaki, H. Hirose, A. Yamamoto, R. Samata, H. P. Hauri, N. Arimitsu, M. Tagaya and K. Tani (2009). "Role of syntaxin 18 in the organization of endoplasmic reticulum subdomains." J Cell Sci **122**(Pt 10): 1680-1690.
- Ilg, T. (2000). "Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*." EMBO J **19**(9): 1953-1962.
- Indik, Z. K., J. G. Park, S. Hunter and A. D. Schreiber (1995). "The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis." Blood **86**(12): 4389-4399.
- Ip, H. S., A. Orn, D. G. Russell and G. A. Cross (1990). "*Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site-specific neutral endopeptidase." Mol Biochem Parasitol **40**(2): 163-172.
- Isberg, R. R., T. J. O'Connor and M. Heidtman (2009). "The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells." Nat Rev Microbiol **7**(1): 13-24.
- Isnard, A., J. G. Christian, M. Kodiha, U. Stochaj, W. R. McMaster and M. Olivier (2015). "Impact of *Leishmania* infection on host macrophage nuclear physiology and nucleopore complex integrity." PLoS Pathog **11**(3): e1004776.
- Isnard, A., M. T. Shio and M. Olivier (2012). "Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling." Front Cell Infect Microbiol **2**: 72.
- Jancic, C., A. Savina, C. Wasmeier, T. Tolmachova, J. El-Benna, P. M. Dang, S. Pascolo, M. A. Gougerot-Pocidalo, G. Raposo, M. C. Seabra and S. Amigorena (2007). "Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes." Nat Cell Biol **9**(4): 367-378.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-16.
- Jani, R. A., L. K. Purushothaman, S. Rani, P. Bergam and S. R. Setty (2015). "STX13 regulates cargo delivery from recycling endosomes during melanosome biogenesis." J Cell Sci **128**(17): 3263-3276.

Jaramillo, M., M. A. Gomez, O. Larsson, M. T. Shio, I. Topisirovic, I. Contreras, R. Luxenburg, A. Rosenfeld, R. Colina, R. W. McMaster, M. Olivier, M. Costa-Mattioli and N. Sonenberg (2011). "Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection." Cell Host Microbe **9**(4): 331-341.

Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina and S. Amigorena (2012). "Cross-presentation by dendritic cells." Nat Rev Immunol **12**(8): 557-569.

Jordens, I., M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts and J. Neefjes (2001). "The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors." Curr Biol **11**(21): 1680-1685.

Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks and W. R. McMaster (2002). "Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor." Mol Biochem Parasitol **120**(1): 33-40.

Kagan, J. C. (2010). "Recycling endosomes and TLR signaling--the Rab11 GTPase leads the way." Immunity **33**(4): 578-580.

Kalupahana, R. S., P. Mastroeni, D. Maskell and B. A. Blacklaws (2005). "Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Immunology **115**(4): 462-472.

Kanai, F., H. Liu, S. J. Field, H. Akbary, T. Matsuo, G. E. Brown, L. C. Cantley and M. B. Yaffe (2001). "The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K." Nat Cell Biol **3**(7): 675-678.

Karim, Z. A., J. Zhang, M. Banerjee, M. C. Chicka, R. Al Hawas, T. R. Hamilton, P. A. Roche and S. W. Whiteheart (2013). "IkappaB kinase phosphorylation of SNAP-23 controls platelet secretion." Blood **121**(22): 4567-4574.

Kaul, S., S. K. Mittal, L. Feigenbaum, M. J. Kruhlak and P. A. Roche (2015). "Expression of the SNARE protein SNAP-23 is essential for cell survival." PLoS One **10**(2): e0118311.

Kavoosi, G., S. K. Ardestani, A. Kariminia and Z. Tavakoli (2006). "Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*." Korean J Parasitol **44**(1): 35-41.

Kawahara, K., H. Tsukano, H. Watanabe, B. Lindner and M. Matsuura (2002). "Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature." Infect Immun **70**(8): 4092-4098.

Kay, J. G., R. Z. Murray, J. K. Pagan and J. L. Stow (2006). "Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup." J Biol Chem **281**(17): 11949-11954.

Kaye, P. M., C. Coburn, M. McCrossan and S. M. Beverley (1993). "Antigens targeted to the *Leishmania* phagolysosome are processed for CD4+ T cell recognition." Eur J Immunol **23**(9): 2311-2319.

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

Kean, M. J., K. C. Williams, M. Skalski, D. Myers, A. Burtnik, D. Foster and M. G. Coppolino (2009). "VAMP3, syntaxin-13 and SNAP23 are involved in secretion of matrix metalloproteinases, degradation of the extracellular matrix and cell invasion." J Cell Sci **122**(Pt 22): 4089-4098.

Kim, D. W., G. Lenzen, A. L. Page, P. Legrain, P. J. Sansonetti and C. Parsot (2005). "The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 14046-14051.

Kim, L., L. Del Rio, B. A. Butcher, T. H. Mogensen, S. R. Paludan, R. A. Flavell and E. Y. Denkers (2005). "p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection." J Immunol **174**(7): 4178-4184.

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

Kima, P. E., N. H. Ruddle and D. McMahon-Pratt (1997). "Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8+ T cells." J Immunol **159**(4): 1828-1834.

Kinoshita, D., C. Sakurai, M. Morita, M. Tsunematsu, N. Hori and K. Hatsuzawa (2019). "Syntaxin 11 regulates the stimulus-dependent transport of Toll-like receptor 4 to the plasma membrane by cooperating with SNAP-23 in macrophages." Mol Biol Cell **30**(9): 1085-1097.

Kissing, S., C. Hermsen, U. Repnik, C. K. Nesset, K. von Bargen, G. Griffiths, A. Ichihara, B. S. Lee, M. Schwake, J. De Brabander, A. Haas and P. Saftig (2015). "Vacuolar ATPase in phagosome-lysosome fusion." J Biol Chem **290**(22): 14166-14180.

Kobayashi, T., E. Stang, K. S. Fang, P. de Moerloose, R. G. Parton and J. Gruenberg (1998). "A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function." Nature **392**(6672): 193-197.

Koike, S. and R. Jahn (2019). "SNAREs define targeting specificity of trafficking vesicles by combinatorial interaction with tethering factors." Nat Commun **10**(1): 1608.

Kornfeld, S. and I. Mellman (1989). "The biogenesis of lysosomes." Annu Rev Cell Biol **5**: 483-525.

Kubo, K., M. Kobayashi, S. Nozaki, C. Yagi, K. Hatsuzawa, Y. Katoh, H. W. Shin, S. Takahashi and K. Nakayama (2015). "SNAP23/25 and VAMP2 mediate exocytic event of transferrin receptor-containing recycling vesicles." Biol Open **4**(7): 910-920.

Kumar, Y. and R. H. Valdivia (2009). "Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments." Cell Host Microbe **5**(6): 593-601.

Lacerda, D. I., L. Cysne-Finkelstein, M. P. Nunes, P. M. De-Luca, S. Genestra Mda, L. L. Leon, M. Berredo-Pinho, L. Mendonca-Lima, D. C. Matos, M. A. Medeiros and S. C. Mendonca (2012). "Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages." Mem Inst Oswaldo Cruz **107**(2): 238-245.

Lafourcade, C., K. Sobo, S. Kieffer-Jaquinod, J. Garin and F. G. van der Goot (2008). "Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization." PLoS One **3**(7): e2758.

Landsverk, O. J., O. Bakke and T. F. Gregers (2009). "MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain." Scand J Immunol **70**(3): 184-193.

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

Laniosz, V., K. C. Nguyen and P. I. Meneses (2007). "Bovine papillomavirus type 1 infection is mediated by SNARE syntaxin 18." J Virol **81**(14): 7435-7448.

Laufman, O., W. Hong and S. Lev (2013). "The COG complex interacts with multiple Golgi SNAREs and enhances fusogenic assembly of SNARE complexes." J Cell Sci **126**(Pt 6): 1506-1516.

Lawe, D. C., V. Patki, R. Heller-Harrison, D. Lambright and S. Corvera (2000). "The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization." J Biol Chem **275**(5): 3699-3705.

Lazaro-Souza, M., C. Matte, J. B. Lima, G. Arango Duque, G. Quintela-Carvalho, A. de Carvalho Vivarini, S. Moura-Pontes, C. P. Figueira, F. H. Jesus-Santos, U. Gazos Lopes, L. P. Farias, T. Araujo-Santos, A. Descoteaux and V. M. Borges (2018). "*Leishmania infantum* Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay." Front Microbiol **9**: 626.

Le Cabec, V., S. Carreno, A. Moisand, C. Bordier and I. Maridonneau-Parini (2002). "Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively." J Immunol **169**(4): 2003-2009.

Lee, J. Y., C. A. Lowell, D. G. Lemay, H. S. Youn, S. H. Rhee, K. H. Sohn, B. Jang, J. Ye, J. H. Chung and D. H. Hwang (2005). "The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4." Biochem Pharmacol **70**(8): 1231-1240.

Lee, S. H., J. Rho, D. Jeong, J. Y. Sul, T. Kim, N. Kim, J. S. Kang, T. Miyamoto, T. Suda, S. K. Lee, R. J. Pignolo, B. Koczon-Jaremko, J. Lorenzo and Y. Choi (2006). "v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation." Nat Med **12**(12): 1403-1409.

Lee, W. L., M. K. Kim, A. D. Schreiber and S. Grinstein (2005). "Role of ubiquitin and proteasomes in phagosome maturation." Mol Biol Cell **16**(4): 2077-2090.

Leiva, N., M. Pavarotti, M. I. Colombo and M. T. Damiani (2006). "Reconstitution of recycling from the phagosomal compartment in streptolysin O-permeabilized macrophages: role of Rab11." Exp Cell Res **312**(10): 1843-1855.

Li, X., P. Saha, J. Li, G. Blobel and S. R. Pfeffer (2016). "Clues to the mechanism of cholesterol transfer from the structure of NPC1 middle luminal domain bound to NPC2." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(36): 10079-10084.

Lieke, T., S. Nylen, L. Eidsmo, W. R. McMaster, A. M. Mohammadi, A. Khamesipour, L. Berg and H. Akuffo (2008). "*Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation." Clin Exp Immunol **153**(2): 221-230.

Ligeon, L. A., K. Moreau, N. Barois, A. Bongiovanni, D. A. Lacorre, E. Werkmeister, V. Proux-Gillardeaux, T. Galli and F. Lafont (2014). "Role of VAMP3 and VAMP7 in the commitment of *Yersinia pseudotuberculosis* to LC3-associated pathways involving single- or double-membrane vacuoles." Autophagy **10**(9): 1588-1602.

Lippert, U., D. M. Ferrari and R. Jahn (2007). "Endobrevin/VAMP8 mediates exocytotic release of hexosaminidase from rat basophilic leukaemia cells." FEBS Lett **581**(18): 3479-3484.

Liu, Y., L. K. M. Steinbusch, M. Nabben, D. Kapsokalyvas, M. van Zandvoort, P. Schonleitner, G. Antoons, P. J. Simons, W. A. Coumans, A. Geomini, D. Chanda, J. F. C. Glatz, D. Neumann and J. Luiken (2017). "Palmitate-Induced Vacuolar-Type H(+) -ATPase Inhibition Feeds Forward Into Insulin Resistance and Contractile Dysfunction." Diabetes **66**(6): 1521-1534.

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

Lodge, R. and A. Descoteaux (2008). "*Leishmania* invasion and phagosome biogenesis." Subcell Biochem **47**: 174-181.

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

Loo, L. S., L. A. Hwang, Y. M. Ong, H. S. Tay, C. C. Wang and W. Hong (2009). "A role for endobrevin/VAMP8 in CTL lytic granule exocytosis." Eur J Immunol **39**(12): 3520-3528.

Lorkowski, S. W., G. Brubaker, K. Gulshan and J. D. Smith (2018). "V-ATPase (Vacuolar ATPase) Activity Required for ABCA1 (ATP-Binding Cassette Protein A1)-Mediated Cholesterol Efflux." Arterioscler Thromb Vasc Biol **38**(11): 2615-2625.

Love, D. C., M. Mentink Kane and D. M. Mosser (1998). "*Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages." Exp Parasitol **88**(3): 161-171.

Lu, Y., Z. Zhang, D. Sun, S. T. Sweeney and F. B. Gao (2013). "Syntaxin 13, a genetic modifier of mutant CHMP2B in frontotemporal dementia, is required for autophagosome maturation." Mol Cell **52**(2): 264-271.

Luftman, K., N. Hasan, P. Day, D. Hardee and C. Hu (2009). "Silencing of VAMP3 inhibits cell migration and integrin-mediated adhesion." Biochem Biophys Res Commun **380**(1): 65-70.

Luo, M., E. A. Fadeev and J. T. Groves (2005). "Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages." Nat Chem Biol **1**(3): 149-153.

Luzio, J. P., P. R. Pryor and N. A. Bright (2007). "Lysosomes: fusion and function." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 622-632.

Macdonald, M. H., C. J. Morrison and W. R. McMaster (1995). "Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63." Biochim Biophys Acta **1253**(2): 199-207.

Mallard, F., B. L. Tang, T. Galli, D. Tenza, A. Saint-Pol, X. Yue, C. Antony, W. Hong, B. Goud and L. Johannes (2002). "Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform." *J Cell Biol* **156**(4): 653-664.

Malmstrom, M., S. Jentoft, T. F. Gregers and K. S. Jakobsen (2013). "Unraveling the evolution of the Atlantic cod's (*Gadus morhua* L.) alternative immune strategy." *PLoS One* **8**(9): e74004.

Malsam, J., S. Kreye and T. H. Sollner (2008). "Membrane fusion: SNAREs and regulation." *Cell Mol Life Sci* **65**(18): 2814-2832.

Mant, A., F. Chinnery, T. Elliott and A. P. Williams (2012). "The pathway of cross-presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen." *Immunology* **136**(2): 163-175.

Mantegazza, A. R., J. G. Magalhaes, S. Amigorena and M. S. Marks (2013). "Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II." *Traffic* **14**(2): 135-152.

Margittai, M., D. Fasshauer, R. Jahn and R. Langen (2003). "The Habc domain and the SNARE core complex are connected by a highly flexible linker." *Biochemistry* **42**(14): 4009-4014.

Marshall, M. R., V. Pattu, M. Halimani, M. Maier-Peusel, M. L. Muller, U. Becherer, W. Hong, M. Hoth, T. Tschenig, Y. T. Bryceson and J. Rettig (2015). "VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity." *J Cell Biol* **210**(1): 135-151.

Martin-Martin, B., S. M. Nabokina, J. Blasi, P. A. Lazo and F. Mollinedo (2000). "Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis." *Blood* **96**(7): 2574-2583.

Martin, S., R. Agarwal, G. Murugaiyan and B. Saha (2010). "CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection." *J Immunol* **185**(1): 551-559.

Martinez-Lopez, M., S. Iborra, R. Conde-Garrosa and D. Sancho (2015). "Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania major* infection in mice." *Eur J Immunol* **45**(1): 119-129.

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

Martiny, A., J. R. Meyer-Fernandes, W. de Souza and M. A. Vannier-Santos (1999). "Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes." *Mol Biochem Parasitol* **102**(1): 1-12.

Matheoud, D., N. Moradin, A. Bellemare-Pelletier, M. T. Shio, W. J. Hong, M. Olivier, E. Gagnon, M. Desjardins and A. Descoteaux (2013). "*Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8." *Cell Host Microbe* **14**(1): 15-25.

Matos, D. C., L. A. Faccioli, L. Cysne-Finkelstein, P. M. Luca, S. Corte-Real, G. R. Armoa, E. M. Lemes, D. Decote-Ricardo and S. C. Mendonca (2010). "Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**(3): 341-347.

Matsumoto, N., M. Sekiya, K. Tohyama, E. Ishiyama-Matsuura, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Futai and M. Nakanishi-Matsui (2018). "Essential Role of the a3 Isoform of V-ATPase in Secretory Lysosome Trafficking via Rab7 Recruitment." Sci Rep **8**(1): 6701.

Matte, C., P. A. Casgrain, O. Seguin, N. Moradin, W. J. Hong and A. Descoteaux (2016). "*Leishmania major* Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63." PLoS Pathog **12**(6): e1005690.

Matte, C. and A. Descoteaux (2016). "Exploitation of the Host Cell Membrane Fusion Machinery by *Leishmania* Is Part of the Infection Process." PLoS Pathog **12**(12): e1005962.

McBride, H. M., V. Rybin, C. Murphy, A. Giner, R. Teasdale and M. Zerial (1999). "Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13." Cell **98**(3): 377-386.

McCann, S. K. and C. L. Roulston (2013). "NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives." Brain Sci **3**(2): 561-598.

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

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

McConville, M. J., J. E. Thomas-Oates, M. A. Ferguson and S. W. Homans (1990). "Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*." J Biol Chem **265**(32): 19611-19623.

McGwire, B. S. and K. P. Chang (1996). "Posttranslational regulation of a *Leishmania* HEXXH metalloprotease (gp63). The effects of site-specific mutagenesis of catalytic, zinc binding, N-glycosylation, and glycosyl phosphatidylinositol addition sites on N-terminal end cleavage, intracellular stability, and extracellular exit." J Biol Chem **271**(14): 7903-7909.

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

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

McNew, J. A., F. Parlati, R. Fukuda, R. J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T. H. Sollner and J. E. Rothman (2000). "Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins." Nature **407**(6801): 153-159.

Medigeshi, G. R. and P. Schu (2003). "Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46." Traffic **4**(11): 802-811.

Melo, E. J. and W. de Souza (1997). "Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*." Cell Struct Funct **22**(3): 317-323.

- Mills, I. G., S. Urbe and M. J. Clague (2001). "Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion." J Cell Sci **114**(Pt 10): 1959-1965.
- Minakami, R. and H. Sumimotoa (2006). "Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family." Int J Hematol **84**(3): 193-198.
- Mogensen, T. H., J. Melchjorsen, L. Malmgaard, A. Casola and S. R. Paludan (2004). "Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1." J Virol **78**(11): 5883-5890.
- Moradin, N. and A. Descoteaux (2012). "*Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages." Front Cell Infect Microbiol **2**: 121.
- Mordue, D. G., N. Desai, M. Dustin and L. D. Sibley (1999). "Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring." J Exp Med **190**(12): 1783-1792.
- Morehead, J., I. Coppens and N. W. Andrews (2002). "Opsonization modulates Rac-1 activation during cell entry by *Leishmania amazonensis*." Infect Immun **70**(8): 4571-4580.
- Morisaki, J. H., J. E. Heuser and L. D. Sibley (1995). "Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell." J Cell Sci **108** (Pt 6): 2457-2464.
- Mosser, D. M. and L. A. Rosenthal (1993). "Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses." Semin Cell Biol **4**(5): 315-322.
- Mott, J., Y. Rikihisa and S. Tsunawaki (2002). "Effects of *Anaplasma phagocytophila* on NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells." Infect Immun **70**(3): 1359-1366.
- Mottram, J. C., A. E. Souza, J. E. Hutchison, R. Carter, M. J. Frame and G. H. Coombs (1996). "Evidence from disruption of the lmcgb gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6008-6013.
- Mukherjee, S., R. N. Ghosh and F. R. Maxfield (1997). "Endocytosis." Physiol Rev **77**(3): 759-803.
- Mukkada, A. J., J. C. Meade, T. A. Glaser and P. F. Bonventre (1985). "Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth." Science **229**(4718): 1099-1101.
- Muller, I., T. Pedrazzini, P. Kropf, J. Louis and G. Milon (1991). "Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells." Int Immunol **3**(6): 587-597.
- Mullock, B. M., C. W. Smith, G. Ihrke, N. A. Bright, M. Lindsay, E. J. Parkinson, D. A. Brooks, R. G. Parton, D. E. James, J. P. Luzio and R. C. Piper (2000). "Syntaxin 7 is localized to late endosome compartments, associates with Vamp 8, and is required for late endosome-lysosome fusion." Mol Biol Cell **11**(9): 3137-3153.

Murase, M., T. Kawasaki, R. Hakozaki, T. Sueyoshi, D. D. P. Putri, Y. Kitai, S. Sato, M. Ikawa and T. Kawai (2018). "Intravesicular Acidification Regulates Lipopolysaccharide Inflammation and Tolerance through TLR4 Trafficking." J Immunol **200**(8): 2798-2808.

Murray, R. Z., J. G. Kay, D. G. Sangermani and J. L. Stow (2005). "A role for the phagosome in cytokine secretion." Science **310**(5753): 1492-1495.

Nair-Gupta, P., A. Baccarini, N. Tung, F. Seyffer, O. Florey, Y. Huang, M. Banerjee, M. Overholtzer, P. A. Roche, R. Tampe, B. D. Brown, D. Amsen, S. W. Whiteheart and J. M. Blander (2014). "TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation." Cell **158**(3): 506-521.

Nakayama, M., K. Kurokawa, K. Nakamura, B. L. Lee, K. Sekimizu, H. Kubagawa, K. Hiramatsu, H. Yagita, K. Okumura, T. Takai, D. M. Underhill, A. Aderem and K. Ogasawara (2012). "Inhibitory receptor paired Ig-like receptor B is exploited by *Staphylococcus aureus* for virulence." J Immunol **189**(12): 5903-5911.

Nakayama, M., D. M. Underhill, T. W. Petersen, B. Li, T. Kitamura, T. Takai and A. Aderem (2007). "Paired Ig-like receptors bind to bacteria and shape TLR-mediated cytokine production." J Immunol **178**(7): 4250-4259.

Ndjamen, B., B. H. Kang, K. Hatsuzawa and P. E. Kima (2010). "Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments." Cell Microbiol **12**(10): 1480-1494.

Neumeister, B., M. Faigle, M. Sommer, U. Zahringer, F. Stelter, R. Menzel, C. Schutt and H. Northoff (1998). "Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14." Infect Immun **66**(9): 4151-4157.

Ng, V. H., J. S. Cox, A. O. Sousa, J. D. MacMicking and J. D. McKinney (2004). "Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst." Mol Microbiol **52**(5): 1291-1302.

Nickel, W., T. Weber, J. A. McNew, F. Parlati, T. H. Sollner and J. E. Rothman (1999). "Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12571-12576.

Nogueira, P. M., R. R. Assis, A. C. Torrecilhas, E. M. Saraiva, N. L. Pessoa, M. A. Campos, E. F. Marialva, C. M. Rios-Velasquez, F. A. Pessoa, N. F. Secundino, J. N. Rugani, E. Nieves, S. J. Turco, M. N. Melo and R. P. Soares (2016). "Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection." PLoS Negl Trop Dis **10**(8): e0004848.

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

Nozawa, T., A. Minowa-Nozawa, C. Aikawa and I. Nakagawa (2017). "The STX6-VTI1B-VAMP3 complex facilitates xenophagy by regulating the fusion between recycling endosomes and autophagosomes." Autophagy **13**(1): 57-69.

Oishi, Y., T. Arakawa, A. Tanimura, M. Itakura, M. Takahashi, Y. Tajima, I. Mizoguchi and T. Takuma (2006). "Role of VAMP-2, VAMP-7, and VAMP-8 in constitutive exocytosis from HSY cells." Histochem Cell Biol **125**(3): 273-281.

Okayama, M., T. Arakawa, A. Tanimura, I. Mizoguchi, Y. Tajima and T. Takuma (2009). "Role of VAMP8/endobrevin in constitutive exocytotic pathway in HeLa cells." Cell Struct Funct **34**(2): 115-125.

Okuda, K., M. Tong, B. Dempsey, K. J. Moore, R. T. Gazzinelli and N. Silverman (2016). "*Leishmania amazonensis* Engages CD36 to Drive Parasitophorous Vacuole Maturation." PLoS Pathog **12**(6): e1005669.

Olias, P., R. D. Etheridge, Y. Zhang, M. J. Holtzman and L. D. Sibley (2016). "*Toxoplasma* Effector Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN-gamma-Dependent Gene Expression." Cell Host Microbe **20**(1): 72-82.

Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani and M. T. Shio (2012). "*Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63." Microbes Infect **14**(15): 1377-1389.

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

Ortega, V., S. Giorgio and E. de Paula (2017). "Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: a review." J Liposome Res **27**(3): 234-248.

Osorio y Fortea, J., E. de La Llave, B. Regnault, J. Y. Coppee, G. Milon, T. Lang and E. Prina (2009). "Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes." BMC Genomics **10**: 119.

Pagan, A. J., N. C. Peters, A. Debrabant, F. Ribeiro-Gomes, M. Pepper, C. L. Karp, M. K. Jenkins and D. L. Sacks (2013). "Tracking antigen-specific CD4+ T cells throughout the course of chronic *Leishmania major* infection in resistant mice." Eur J Immunol **43**(2): 427-438.

Panday, A., M. K. Sahoo, D. Osorio and S. Batra (2015). "NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies." Cell Mol Immunol **12**(1): 5-23.

Pandey, S., P. Chakraborti, R. Sharma, S. Bandyopadhyay, D. Sarkar and S. Adhya (2004). "Involvement of *Leishmania donovani* major surface glycoprotein gp63 in promastigote multiplication." J Biosci **29**(1): 15-22.

Park, Y. K., B. Bearson, S. H. Bang, I. S. Bang and J. W. Foster (1996). "Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*." Mol Microbiol **20**(3): 605-611.

Pelletier, I. and S. Sato (2002). "Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope." J Biol Chem **277**(20): 17663-17670.

Pellizzari, R., O. Rossetto, G. Schiavo and C. Montecucco (1999). "Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**(1381): 259-268.

Perez-Victoria, F. J. and J. S. Bonifacino (2009). "Dual roles of the mammalian GARP complex in tethering and SNARE complex assembly at the trans-golgi network." Mol Cell Biol **29**(19): 5251-5263.

Pernas, L., Y. Adomako-Ankomah, A. J. Shastri, S. E. Ewald, M. Treeck, J. P. Boyle and J. C. Boothroyd (2014). "Toxoplasma effector MAF1 mediates recruitment of host mitochondria and impacts the host response." PLoS Biol **12**(4): e1001845.

Pessoa, C. C., E. R. Ferreira, E. Bayer-Santos, M. Rabinovitch, R. A. Mortara and F. Real (2016). "Trypanosoma cruzi Differentiates and Multiplies within Chimeric Parasitophorous Vacuoles in Macrophages Coinfected with Leishmania amazonensis." Infect Immun **84**(5): 1603-1614.

Pessoa, C. C., L. C. Reis, E. M. Ramos-Sanchez, C. M. Orikaza, C. Cortez, E. V. de Castro Levatti, A. C. B. Badaro, J. Yamamoto, V. D'Almeida, H. Goto, R. A. Mortara and F. Real (2019). "ATP6V0d2 controls Leishmania parasitophorous vacuole biogenesis via cholesterol homeostasis." PLoS Pathog **15**(6): e1007834.

Peters, C., M. J. Bayer, S. Buhler, J. S. Andersen, M. Mann and A. Mayer (2001). "Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion." Nature **409**(6820): 581-588.

Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain and D. Sacks (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." Science **321**(5891): 970-974.

Peters, N. C. and D. L. Sacks (2009). "The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis." Cell Microbiol **11**(9): 1290-1296.

Pieters, J. (2008). "Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance." Cell Host Microbe **3**(6): 399-407.

Pilar, A. V., S. A. Reid-Yu, C. A. Cooper, D. T. Mulder and B. K. Coombes (2013). "Active modification of host inflammation by Salmonella." Gut Microbes **4**(2): 140-145.

Pimenta, P. F., S. J. Turco, M. J. McConville, P. G. Lawyer, P. V. Perkins and D. L. Sacks (1992). "Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sandfly midgut." Science **256**(5065): 1812-1815.

Pinheiro da Silva, F., M. Aloulou, D. Skurnik, M. Benhamou, A. Andremont, I. T. Velasco, M. Chiamolera, J. S. Verbeek, P. Launay and R. C. Monteiro (2007). "CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an FcR gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation." Nat Med **13**(11): 1368-1374.

Pinheiro, R. O., M. P. Nunes, C. S. Pinheiro, H. D'Avila, P. T. Bozza, C. M. Takiya, S. Corte-Real, C. G. Freire-de-Lima and G. A. DosReis (2009). "Induction of autophagy correlates with increased parasite load of Leishmania amazonensis in BALB/c but not C57BL/6 macrophages." Microbes Infect **11**(2): 181-190.

Pobbati, A. V., A. Razeto, M. Boddener, S. Becker and D. Fasshauer (2004). "Structural basis for the inhibitory role of tomosyn in exocytosis." J Biol Chem **279**(45): 47192-47200.

Podinovskaia, M. and A. Descoteaux (2015). "Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction." Future Microbiol **10**(1): 111-129.

Polgar, J., S. H. Chung and G. L. Reed (2002). "Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion." Blood **100**(3): 1081-1083.

Pombo, I., S. Martin-Verdeaux, B. Iannascoli, J. Le Mao, L. Deriano, J. Rivera and U. Blank (2001). "IgE receptor type I-dependent regulation of a Rab3D-associated kinase: a possible link in the calcium-dependent assembly of SNARE complexes." J Biol Chem **276**(46): 42893-42900.

Prekeris, R., J. Klumperman, Y. A. Chen and R. H. Scheller (1998). "Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes." J Cell Biol **143**(4): 957-971.

Prekeris, R., J. Klumperman and R. H. Scheller (2000). "Syntaxin 11 is an atypical SNARE abundant in the immune system." Eur J Cell Biol **79**(11): 771-780.

Prina, E., C. Jouanne, S. de Souza Lao, A. Szabo, J. G. Guillet and J. C. Antoine (1993). "Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes." J Immunol **151**(4): 2050-2061.

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

Proudfoot, L., A. V. Nikolaev, G. J. Feng, W. Q. Wei, M. A. Ferguson, J. S. Brimacombe and F. Y. Liew (1996). "Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10984-10989.

Proux-Gillardeaux, V., J. Gavard, T. Irinopoulou, R. M. Mege and T. Galli (2005). "Tetanus neurotoxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs epithelial cell migration and integrin-dependent cell adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6362-6367.

Pryor, P. R., B. M. Mullock, N. A. Bright, M. R. Lindsay, S. R. Gray, S. C. Richardson, A. Stewart, D. E. James, R. C. Piper and J. P. Luzio (2004). "Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events." EMBO Rep **5**(6): 590-595.

Pungercar, J. R., D. Caglic, M. Sajid, M. Dolinar, O. Vasiljeva, U. Pozgan, D. Turk, M. Bogyo, V. Turk and B. Turk (2009). "Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity." FEBS J **276**(3): 660-668.

Quinn, M. T. and K. A. Gauss (2004). "Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases." J Leukoc Biol **76**(4): 760-781.

Rabhi, I., S. Rabhi, R. Ben-Othman, A. Rasche, A. Daskalaki, B. Trentin, D. Piquemal, B. Regnault, A. Descoteaux, L. Guizani-Tabbane and C. Sysco (2012). "Transcriptomic signature of *Leishmania* infected mice macrophages: a metabolic point of view." PLoS Negl Trop Dis **6**(8): e1763.

Rabhi, S., I. Rabhi, B. Trentin, D. Piquemal, B. Regnault, S. Goyard, T. Lang, A. Descoteaux, J. Enninga and L. Guizani-Tabbane (2016). "Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection." PLoS One **11**(2): e0148640.

Rabinovitch, M. (1995). "Professional and non-professional phagocytes: an introduction." Trends Cell Biol **5**(3): 85-87.

Raffatellu, M., D. Chessa, R. P. Wilson, C. Tukel, M. Akcelik and A. J. Baumler (2006). "Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis." Infect Immun **74**(1): 19-27.

Rasolzadeh, S., M. Haji Fatahaliha, M. Hosseini, R. Jafari, A. Miahipour, A. A. Movassaghpoor, Z. Babalo, S. Rafati and M. Yousefi (2015). "Recombinant LPG3 Stimulates IFN-Gamma and TNF-A Secretion by Human NK Cells." Iran J Parasitol **10**(4): 554-560.

Ravichandran, K. S. (2010). "Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums." J Exp Med **207**(9): 1807-1817.

Real, F. and R. A. Mortara (2012). "The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1518.

Real, F., R. A. Mortara and M. Rabinovitch (2010). "Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* parasitophorous vacuoles: live imaging of coinfecting macrophages." PLoS Negl Trop Dis **4**(12): e905.

Real, F., M. Pouchelet and M. Rabinovitch (2008). "*Leishmania (L.) amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages." Exp Parasitol **119**(1): 15-23.

Reignault, L. C., C. L. Alcantara, E. S. Barrias and W. de Souza (2019). "3D reconstruction of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction shows the recruitment of host cell organelles towards parasitophorous vacuoles during its biogenesis." J Struct Biol **205**(2): 133-146.

Reignault, L. C., E. S. Barrias, L. C. Soares Medeiros, W. de Souza and T. M. de Carvalho (2014). "Structures containing galectin-3 are recruited to the parasitophorous vacuole containing *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages." Parasitol Res **113**(6): 2323-2333.

Remaley, A. T., R. H. Glew, D. B. Kuhns, R. E. Basford, A. S. Waggoner, L. A. Ernst and M. Pope (1985). "*Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production." Exp Parasitol **60**(3): 331-341.

Remaley, A. T., D. B. Kuhns, R. E. Basford, R. H. Glew and S. S. Kaplan (1984). "*Leishmania* phosphatase blocks neutrophil O-2 production." J Biol Chem **259**(18): 11173-11175.

Rezvan, H. and M. Moafi (2015). "An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article." Vet Res Forum **6**(1): 1-7.

Ribeiro-Gomes, F. L., N. C. Peters, A. Debrabant and D. L. Sacks (2012). "Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response." PLoS Pathog **8**(2): e1002536.

Ribeiro-Gomes, F. L., A. Romano, S. Lee, E. Roffe, N. C. Peters, A. Debrabant and D. Sacks (2015). "Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8(+) T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling." Cell Death Dis **6**: e2018.

Riggs, K. A., N. Hasan, D. Humphrey, C. Raleigh, C. Nevitt, D. Corbin and C. Hu (2012). "Regulation of integrin endocytic recycling and chemotactic cell migration by syntaxin 6 and VAMP3 interaction." J Cell Sci **125**(Pt 16): 3827-3839.

- Roberts, C. W., R. McLeod, D. W. Rice, M. Ginger, M. L. Chance and L. J. Goad (2003). "Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 129-142.
- Robey, M. and N. P. Cianciotto (2002). "Legionella pneumophila feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection." Infect Immun **70**(10): 5659-5669.
- Roche, P. A. and P. Cresswell (1990). "Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding." Nature **345**(6276): 615-618.
- Roche, P. A. and P. Cresswell (1991). "Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3150-3154.
- Rodriguez, N. E., U. Gaur Dixit, L. A. Allen and M. E. Wilson (2011). "Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages." PLoS One **6**(4): e19000.
- Rogers, M. E. (2012). "The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host." Front Microbiol **3**: 223.
- Rolan, H. G., E. A. Durand and J. Mecsas (2013). "Identifying Yersinia YopH-targeted signal transduction pathways that impair neutrophil responses during in vivo murine infection." Cell Host Microbe **14**(3): 306-317.
- Rosas-Ballina, M., X. L. Guan, A. Schmidt and D. Bumann (2020). "Classical Activation of Macrophages Leads to Lipid Droplet Formation Without de novo Fatty Acid Synthesis." Front Immunol **11**: 131.
- Sacks, D. L., T. N. Brodin and S. J. Turco (1990). "Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis." Mol Biochem Parasitol **42**(2): 225-233.
- Sacks, D. L., G. Modi, E. Rowton, G. Spath, L. Epstein, S. J. Turco and S. M. Beverley (2000). "The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 406-411.
- Sacks, D. L., P. F. Pimenta, M. J. McConville, P. Schneider and S. J. Turco (1995). "Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan." J Exp Med **181**(2): 685-697.
- Saha, B., G. Das, H. Vohra, N. K. Ganguly and G. C. Mishra (1995). "Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity." Eur J Immunol **25**(9): 2492-2498.
- Sakurai, C., H. Hashimoto, H. Nakanishi, S. Arai, Y. Wada, G. H. Sun-Wada, I. Wada and K. Hatsuzawa (2012). "SNAP-23 regulates phagosome formation and maturation in macrophages." Mol Biol Cell **23**(24): 4849-4863.
- Saric, T., S. C. Chang, A. Hattori, I. A. York, S. Markant, K. L. Rock, M. Tsujimoto and A. L. Goldberg (2002). "An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides." Nat Immunol **3**(12): 1169-1176.

Sassa, T., S. Harada, H. Ogawa, J. B. Rand, I. N. Maruyama and R. Hosono (1999). "Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13." J Neurosci **19**(12): 4772-4777.

Sato, K., S. Shikano, G. Xia, J. Takao, J. S. Chung, P. D. Cruz, Jr., X. S. Xie and K. Ariizumi (2006). "Selective expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit d2 by particular subsets of dendritic cells among leukocytes." Mol Immunol **43**(9): 1443-1453.

Sato, S., P. Bhaumik, G. St-Pierre and I. Pelletier (2014). "Role of galectin-3 in the initial control of *Leishmania* infection." Crit Rev Immunol **34**(2): 147-175.

Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory and C. Haslett (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-975.

Savina, A., C. Jancic, S. Hugues, P. Guermonprez, P. Vargas, I. C. Moura, A. M. Lennon-Dumenil, M. C. Seabra, G. Raposo and S. Amigorena (2006). "NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells." Cell **126**(1): 205-218.

Savina, A., A. Peres, I. Cebrian, N. Carmo, C. Moita, N. Hacohen, L. F. Moita and S. Amigorena (2009). "The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalinization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells." Immunity **30**(4): 544-555.

Scharton, T. M. and P. Scott (1993). "Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice." J Exp Med **178**(2): 567-577.

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

Schmunis, G. A., A. Szarfman, T. Langembach and W. de Souza (1978). "Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by human anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies." Infect Immun **20**(2): 567-569.

Schoch, S., P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M. Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka and T. C. Sudhof (2002). "RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone." Nature **415**(6869): 321-326.

Schulze, M. S. and K. W. Wucherpfennig (2012). "The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway." Curr Opin Immunol **24**(1): 105-111.

Scianimanico, S., M. Desrosiers, J. F. Dermine, S. Meresse, A. Descoteaux and M. Desjardins (1999). "Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes." Cell Microbiol **1**(1): 19-32.

Scott, B. L., J. S. Van Komen, H. Irshad, S. Liu, K. A. Wilson and J. A. McNew (2004). "Sec1p directly stimulates SNARE-mediated membrane fusion in vitro." J Cell Biol **167**(1): 75-85.

Sehgal, P. B. and J. E. Lee (2011). "Protein trafficking dysfunctions: Role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." Pulm Circ **1**(1): 17-32.

Semini, G., D. Paape, A. Paterou, J. Schroeder, M. Barrios-Llerena and T. Aebsicher (2017). "Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *Leishmania* parasites infection." *Microbiologyopen* **6**(4).

Sen, S., K. Roy, S. Mukherjee, R. Mukhopadhyay and S. Roy (2011). "Restoration of IFNgammaR subunit assembly, IFNgamma signaling and parasite clearance in *Leishmania donovani* infected macrophages: role of membrane cholesterol." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002229.

Sengupta, D., M. Graham, X. Liu and P. Cresswell (2019). "Proteasomal degradation within endocytic organelles mediates antigen cross-presentation." *EMBO J* **38**(16): e99266.

Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob and N. Shastri (2002). "ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum." *Nature* **419**(6906): 480-483.

Shapira, S., O. S. Harb, J. Margarit, M. Matrajt, J. Han, A. Hoffmann, B. Freedman, M. J. May, D. S. Roos and C. A. Hunter (2005). "Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." *J Cell Sci* **118**(Pt 15): 3501-3508.

Shen, J., D. C. Tareste, F. Paumet, J. E. Rothman and T. J. Melia (2007). "Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins." *Cell* **128**(1): 183-195.

Shepherd, V. L. (1986). "The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense." *Semin Respir Infect* **1**(2): 99-106.

Shweash, M., H. Adrienne McGachy, J. Schroeder, T. Neamatallah, C. E. Bryant, O. Millington, J. C. Mottram, J. Alexander and R. Plevin (2011). "*Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression." *Mol Immunol* **48**(15-16): 1800-1808.

Silverman, J. M., J. Clos, C. C. de'Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster and N. E. Reiner (2010). "An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages." *J Cell Sci* **123**(Pt 6): 842-852.

Sing, A., D. Rost, N. Tvardovskaia, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, C. J. Kirschning, M. Aepfelbacher and J. Heesemann (2002). "*Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression." *J Exp Med* **196**(8): 1017-1024.

Singh, R. and P. Cresswell (2010). "Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice." *Science* **328**(5984): 1394-1398.

Singh, R. K., A. Srivastava and N. Singh (2012). "Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis." *Microbiol Res* **167**(8): 445-451.

Slevogt, H., S. Zabel, B. Opitz, A. Hocke, J. Eitel, D. N'Guessan P, L. Lucka, K. Riesbeck, W. Zimmermann, J. Zweigner, B. Temmesfeld-Wollbrueck, N. Suttorp and B. B. Singer (2008). "CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells." *Nat Immunol* **9**(11): 1270-1278.

Slocum, C., S. R. Coats, N. Hua, C. Kramer, G. Papadopoulos, E. O. Weinberg, C. V. Gudino, J. A. Hamilton, R. P. Darveau and C. A. Genco (2014). "Distinct lipid a

moieties contribute to pathogen-induced site-specific vascular inflammation." PLoS Pathog **10**(7): e1004215.

Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**(6418): 318-324.

Sopwith, W. F., A. Debrabant, M. Yamage, D. M. Dwyer and P. A. Bates (2002). "Developmentally regulated expression of a cell surface class I nuclease in *Leishmania mexicana*." Int J Parasitol **32**(4): 449-459.

Spath, G. F., L. A. Garraway, S. J. Turco and S. M. Beverley (2003). "The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9536-9541.

St John, G., N. Brot, J. Ruan, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, H. Weissbach and C. Nathan (2001). "Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9901-9906.

Stack, J., I. R. Haga, M. Schroder, N. W. Bartlett, G. Maloney, P. C. Reading, K. A. Fitzgerald, G. L. Smith and A. G. Bowie (2005). "Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence." J Exp Med **201**(6): 1007-1018.

Stager, S. and S. Rafati (2012). "CD8(+) T cells in *Leishmania* infections: friends or foes?" Front Immunol **3**: 5.

Stempin, C., L. Giordanengo, S. Gea and F. Cerban (2002). "Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen." J Leukoc Biol **72**(4): 727-734.

Stow, J. L., A. P. Manderson and R. Z. Murray (2006). "SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system." Nat Rev Immunol **6**(12): 919-929.

Stuehr, D. J. (1999). "Mammalian nitric oxide synthases." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 217-230.

Sumner, J. P., J. A. Dow, F. G. Earley, U. Klein, D. Jager and H. Wieczorek (1995). "Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits." J Biol Chem **270**(10): 5649-5653.

Sun-Wada, G. H., T. Toyomura, Y. Murata, A. Yamamoto, M. Futai and Y. Wada (2006). "The a3 isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic beta-cells." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4531-4540.

Suss-Toby, E., J. Zimmerberg and G. E. Ward (1996). "*Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8413-8418.

Sweet, C. R., J. Conlon, D. T. Golenbock, J. Goguen and N. Silverman (2007). "YopJ targets TRAF proteins to inhibit TLR-mediated NF-kappaB, MAPK and IRF3 signal transduction." Cell Microbiol **9**(11): 2700-2715.

Tabke, K., A. Albertmelcher, O. Vitavska, M. Huss, H. P. Schmitz and H. Wieczorek (2014). "Reversible disassembly of the yeast V-ATPase revisited under in vivo conditions." Biochem J **462**(1): 185-197.

- Tacchini-Cottier, F., C. Zweifel, Y. Belkaid, C. Mukankundiye, M. Vasei, P. Launois, G. Milon and J. A. Louis (2000). "An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*." J Immunol **165**(5): 2628-2636.
- Tayeb, M. A., M. Skalski, M. C. Cha, M. J. Kean, M. Scaife and M. G. Coppolino (2005). "Inhibition of SNARE-mediated membrane traffic impairs cell migration." Exp Cell Res **305**(1): 63-73.
- Tiwari, N., C. C. Wang, C. Brochetta, G. Ke, F. Vita, Z. Qi, J. Rivera, M. R. Soranzo, G. Zabucchi, W. Hong and U. Blank (2008). "VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways." Blood **111**(7): 3665-3674.
- Tiwari, N., C. C. Wang, C. Brochetta, L. Scandiuzzi, W. Hong and U. Blank (2009). "Increased formation of VAMP-3-containing SNARE complexes in mast cells from VAMP-8 deficient cells. appetite." Inflamm Res **58 Suppl 1**: 13-14.
- Tolson, D. L., S. J. Turco and T. W. Pearson (1990). "Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*." Infect Immun **58**(11): 3500-3507.
- Tomlinson, S., F. Vandekerckhove, U. Frevert and V. Nussenzweig (1995). "The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH." Parasitology **110 (Pt 5)**: 547-554.
- Toonen, R. F. and M. Verhage (2007). "Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control." Trends Neurosci **30**(11): 564-572.
- Toyomura, T., Y. Murata, A. Yamamoto, T. Oka, G. H. Sun-Wada, Y. Wada and M. Futai (2003). "From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺-ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation." J Biol Chem **278**(24): 22023-22030.
- Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert and I. Mellman (2003). "Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation." Science **299**(5611): 1400-1403.
- Turco, S. J. and D. L. Sacks (2003). "Control of *Leishmania*-sand fly interactions by polymorphisms in lipophosphoglycan structure." Methods Enzymol **363**: 377-381.
- Tzinia, A. K. and K. P. Soteriadou (1991). "Substrate-dependent pH optima of gp63 purified from seven strains of *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **47**(1): 83-89.
- Ueno, N. and M. E. Wilson (2012). "Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival." Trends Parasitol **28**(8): 335-344.
- Uzonna, J. E., K. L. Joyce and P. Scott (2004). "Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells." J Exp Med **199**(11): 1559-1566.
- Valtorta, F., M. Pennuto, D. Bonanomi and F. Benfenati (2004). "Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis?" Bioessays **26**(4): 445-453.
- Van Avondt, K., N. M. van Sorge and L. Meygaard (2015). "Bacterial immune evasion through manipulation of host inhibitory immune signaling." PLoS Pathog **11**(3): e1004644.

van Zandbergen, G., A. Bollinger, A. Wenzel, S. Kamhawi, R. Voll, M. Klinger, A. Muller, C. Holscher, M. Herrmann, D. Sacks, W. Solbach and T. Laskay (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.

Vandal, O. H., L. M. Pierini, D. Schnappinger, C. F. Nathan and S. Ehrt (2008). "A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*." Nat Med **14**(8): 849-854.

Varlamov, O., A. Volchuk, V. Rahimian, C. A. Doege, F. Paumet, W. S. Eng, N. Arango, F. Parlati, M. Ravazzola, L. Orci, T. H. Sollner and J. E. Rothman (2004). "i-SNAREs: inhibitory SNAREs that fine-tune the specificity of membrane fusion." J Cell Biol **164**(1): 79-88.

Vasconcelos, C. O., Z. C. Coelho, S. Chaves Cde, C. R. Teixeira, M. M. Pompeu and M. J. Teixeira (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.

Veale, K. J., C. Offenhauser, N. Lei, A. C. Stanley, J. L. Stow and R. Z. Murray (2011). "VAMP3 regulates podosome organisation in macrophages and together with Stx4/SNAP23 mediates adhesion, cell spreading and persistent migration." Exp Cell Res **317**(13): 1817-1829.

Veit, M., T. H. Sollner and J. E. Rothman (1996). "Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25." FEBS Lett **385**(1-2): 119-123.

Velayudhan, J., M. Castor, A. Richardson, K. L. Main-Hester and F. C. Fang (2007). "The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence." Mol Microbiol **63**(5): 1495-1507.

Veras, P. S., A. Topilko, N. Gouhier, M. F. Moreau, M. Rabinovitch and M. Pouchelet (1996). "Fusion of *Leishmania amazonensis* parasitophorous vacuoles with phagosomes containing zymosan particles: cinemicrographic and ultrastructural observations." Braz J Med Biol Res **29**(8): 1009-1018.

Vicogne, J. and J. E. Pessin (2008). "SNARE-mediated fusion of liposomes." Methods Mol Biol **457**: 241-251.

Vieira, O. V., R. J. Botelho and S. Grinstein (2002). "Phagosome maturation: aging gracefully." Biochem J **366**(Pt 3): 689-704.

Vieira, O. V., R. J. Botelho, L. Rameh, S. M. Brachmann, T. Matsuo, H. W. Davidson, A. Schreiber, J. M. Backer, L. C. Cantley and S. Grinstein (2001). "Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation." J Cell Biol **155**(1): 19-25.

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

Walter, A. M., J. Kurps, H. de Wit, S. Schoning, T. L. Toft-Bertelsen, J. Lauks, I. Ziolkiewicz, A. N. Weiss, A. Schulz, G. Fischer von Mollard, M. Verhage and J. B. Sorensen (2014). "The SNARE protein vti1a functions in dense-core vesicle biogenesis." EMBO J **33**(15): 1681-1697.

Wanderley, J. L., M. E. Moreira, A. Benjamin, A. C. Bonomo and M. A. Barcinski (2006). "Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts." J Immunol **176**(3): 1834-1839.

Wanderley, J. L. M., P. E. Thorpe, M. A. Barcinski and L. Soong (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.

Wang, C. C., C. P. Ng, L. Lu, V. Atlashkin, W. Zhang, L. F. Seet and W. Hong (2004). "A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells." Dev Cell **7**(3): 359-371.

Wang, C. C., H. Shi, K. Guo, C. P. Ng, J. Li, B. Q. Gan, H. Chien Liew, J. Leinonen, H. Rajaniemi, Z. H. Zhou, Q. Zeng and W. Hong (2007). "VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system." Mol Biol Cell **18**(3): 1056-1063.

Wearsch, P. A. and P. Cresswell (2007). "Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer." Nat Immunol **8**(8): 873-881.

Webb, J. L., M. W. Harvey, D. W. Holden and T. J. Evans (2001). "Macrophage nitric oxide synthase associates with cortical actin but is not recruited to phagosomes." Infect Immun **69**(10): 6391-6400.

Weinstein, S. L., A. J. Finn, S. H. Dave, F. Meng, C. A. Lowell, J. S. Sanghera and A. L. DeFranco (2000). "Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon-beta." J Leukoc Biol **67**(3): 405-414.

Weng, N., D. D. Thomas and G. E. Groblewski (2007). "Pancreatic acinar cells express vesicle-associated membrane protein 2- and 8-specific populations of zymogen granules with distinct and overlapping roles in secretion." J Biol Chem **282**(13): 9635-9645.

Wesolowski, J. and F. Paumet (2010). "SNARE motif: a common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion." Virulence **1**(4): 319-324.

Whitley, P., B. J. Reaves, M. Hashimoto, A. M. Riley, B. V. Potter and G. D. Holman (2003). "Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization." J Biol Chem **278**(40): 38786-38795.

Wieczorek, M., E. T. Abualrous, J. Sticht, M. Alvaro-Benito, S. Stolzenberg, F. Noe and C. Freund (2017). "Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation." Front Immunol **8**: 292.

Wilson, J., C. Huynh, K. A. Kennedy, D. M. Ward, J. Kaplan, A. Aderem and N. W. Andrews (2008). "Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*." PLoS Pathog **4**(10): e1000179.

Wilson, M. E., S. M. Jeronimo and R. D. Pearson (2005). "Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species." Microb Pathog **38**(4): 147-160.

Winberg, M. E., A. Holm, E. Sarndahl, A. F. Vinet, A. Descoteaux, K. E. Magnusson, B. Rasmusson and M. Lerm (2009). "Leishmania donovani lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts." Microbes Infect **11**(2): 215-222.

Winberg, M. E., B. Rasmusson and T. Sundqvist (2007). "Leishmania donovani: inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages." Exp Parasitol **117**(2): 165-170.

Wink, D. A., K. S. Kasprzak, C. M. Maragos, R. K. Elespuru, M. Misra, T. M. Dunams, T. A. Cebula, W. H. Koch, A. W. Andrews, J. S. Allen and et al. (1991). "DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors." Science **254**(5034): 1001-1003.

Wu, H., G. Xu and Y. P. Li (2009). "Atp6v0d2 is an essential component of the osteoclast-specific proton pump that mediates extracellular acidification in bone resorption." J Bone Miner Res **24**(5): 871-885.

Xia, Y., N. Liu, X. Xie, G. Bi, H. Ba, L. Li, J. Zhang, X. Deng, Y. Yao, Z. Tang, B. Yin, J. Wang, K. Jiang, Z. Li, Y. Choi, F. Gong, X. Cheng, J. J. O'Shea, J. J. Chae, A. Laurence and X. P. Yang (2019). "The macrophage-specific V-ATPase subunit ATP6V0D2 restricts inflammasome activation and bacterial infection by facilitating autophagosome-lysosome fusion." Autophagy **15**(6): 960-975.

Xu, T. and M. Forgac (2001). "Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar [H⁺]-ATPase in vivo." J Biol Chem **276**(27): 24855-24861.

Yan, D., H. Quan, L. Wang, F. Liu, H. Liu, J. Chen, X. Cao and B. Ge (2013). "Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir recruits cellular SHP-2 through ITIM motifs to suppress host immune response." Cell Signal **25**(9): 1887-1894.

Yan, D., X. Wang, L. Luo, X. Cao and B. Ge (2012). "Inhibition of TLR signaling by a bacterial protein containing immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs." Nat Immunol **13**(11): 1063-1071.

Yang, C., S. Mora, J. W. Ryder, K. J. Coker, P. Hansen, L. A. Allen and J. E. Pessin (2001). "VAMP3 null mice display normal constitutive, insulin- and exercise-regulated vesicle trafficking." Mol Cell Biol **21**(5): 1573-1580.

Yao, C., J. E. Donelson and M. E. Wilson (2003). "The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function." Mol Biochem Parasitol **132**(1): 1-16.

Yao, C., J. E. Donelson and M. E. Wilson (2007). "Internal and surface-localized major surface proteases of *Leishmania* spp. and their differential release from promastigotes." Eukaryot Cell **6**(10): 1905-1912.

Yao, C., K. G. Leidal, A. Brittingham, D. E. Tarr, J. E. Donelson and M. E. Wilson (2002). "Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*." Mol Biochem Parasitol **121**(1): 119-128.

Yoon, T. Y. and M. Munson (2018). "SNARE complex assembly and disassembly." Curr Biol **28**(8): R397-R401.

Young, J. and P. E. Kima (2019). "The *Leishmania* Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface." Yale J Biol Med **92**(3): 511-521.

Yu, M., H. Du, B. Wang, J. Chen, F. Lu, S. Peng, Y. Sun, N. Liu, X. Sun, D. Shiyun, Y. Zhao, Y. Wang, D. Zhao, F. Lu and W. Zhang (2020). "Exogenous H₂S Induces Hrd1 S-sulfhydration and Prevents CD36 Translocation via VAMP3 Ubiquitylation in Diabetic Hearts." *Aging Dis* **11**(2): 286-300.

Zakai, H. A., M. L. Chance and P. A. Bates (1998). "In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*." *Parasitology* **116** (Pt 4): 305-309.

Zhang, D., L. Lin, B. Yang, Z. Meng and B. Zhang (2020). "Knockdown of Tcigr1 inhibits large-osteoclast generation by down-regulating NFATc1 and IP3R2 expression." *PLoS One* **15**(8): e0237354.

Zhang, H., L. M. Wu and J. Wu (2011). "Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines." *Mediators Inflamm* **2011**: 949072.

Zhang, J. G., P. E. Czabotar, A. N. Policheni, I. Caminschi, S. S. Wan, S. Kitsoulis, K. M. Tullett, A. Y. Robin, R. Brammananth, M. F. van Delft, J. Lu, L. A. O'Reilly, E. C. Josefsson, B. T. Kile, W. J. Chin, J. D. Mintern, M. A. Olshina, W. Wong, J. Baum, M. D. Wright, D. C. Huang, N. Mohandas, R. L. Coppel, P. M. Colman, N. A. Nicola, K. Shortman and M. H. Lahoud (2012). "The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments." *Immunity* **36**(4): 646-657.

Zhang, W., D. Wang, E. Volk, H. J. Bellen, P. R. Hiesinger and F. A. Quirocho (2008). "V-ATPase V0 sector subunit a1 in neurons is a target of calmodulin." *J Biol Chem* **283**(1): 294-300.

Zhao, X., K. A. Carnevale and M. K. Cathcart (2003). "Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex." *J Biol Chem* **278**(42): 40788-40792.

Zhu, D., Y. Zhang, P. P. Lam, S. Dolai, Y. Liu, E. P. Cai, D. Choi, S. A. Schroer, Y. Kang, E. M. Allister, T. Qin, M. B. Wheeler, C. C. Wang, W. J. Hong, M. Woo and H. Y. Gaisano (2012). "Dual role of VAMP8 in regulating insulin exocytosis and islet beta cell growth." *Cell Metab* **16**(2): 238-249.

Zilberstein, D. and M. Shapira (1994). "The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites." *Annu Rev Microbiol* **48**: 449-470.

Zwilling, D., A. Cypionka, W. H. Pohl, D. Fasshauer, P. J. Walla, M. C. Wahl and R. Jahn (2007). "Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies." *EMBO J* **26**(1): 9-18.

ANNEXE I - Résultats non publiés

1 Matériels et méthodes non publiées

1. 1 Marquage des membranes du parasite et bodipy

Après l'opsonisation et avant l'infection, les parasites ont été lavés au PBS (3000rpm 10min). Les parasites ont été marqués aux PKH488 (dilution de 1/500 en solution C (Sigma Aldrich)) à raison de 100µL par 1×10^8 parasites pour une durée de 5 minutes. Le marquage a été arrêté en ajoutant un volume équivalent de SVF et les parasites ont été lavés une fois de plus au PBS avant l'infection. La distribution de la membrane des parasites a été analysée par microscopie confocale sur une période de 2 à 72h. Le marquage des gouttelettes lipidiques au Bodipy 493/503 (Molecular Probes) a été effectué similairement au marquage pour les SNAREs (immunofluorescence). Le recrutement des gouttelettes lipidiques a été évalué par microscopie confocale suite à des infections par *L. amazonensis* LV79 et *L. amazonensis* PH8 sur une période de 2 à 72h.

1. 2 Zymosan recouvert de LPG

25µL de LPG de *L. donovani* ont été ajoutés à 475µL de HBS pour 50×10^6 zymosan. Ces particules ont été incubées pendant 2h à 37°C puis lavées 3 fois au HBSS avant d'être ajoutées aux infections pour un ratio final de 3:1. L'expansion des PV a été mesurée sur une période de 24 à 72h.

1. 3 Production d'oxyde nitrique

Des BMMs infectés pendant 6h ou non infectés ont été stimulés à l'IFN- pendant 18h et au LPS (10µg/mL ou 100µg/mL) pendant 24h. Le surnageant des infections (100µL) a été récolté et la production de NO a été quantifiée par test de Griess (ajout de 100µL d'une solution 1:1 des solutions 1 (1% sulfanilamide et 2.5% acide phosphorique) et 2 (0.1% N-(1-naphtyl)ethyleneotiamine) et incubation pendant 30min à température pièce suivie d'une lecture de densité optique à 550nm). La survie a été quantifiée par Giemsa.

1. 4 Infection In vivo

Les oreilles de souris 129B6 WT ou *Vamp3^{-/-}* ont été infectées avec 10000 promastigotes métacycliques isolés par gradient de Ficoll au niveau sous-cutané et les infections ont été suivies sur une durée de 9 semaines. La mesure des oreilles a été effectuée à l'aide d'un pied à coulisse.

1. 5 Parasitémie et recrutement cellulaire

Aux semaines 3, 6 et 9 les oreilles infectées ont été récupérées et homogénéisées dans un volume final de 10mL. 1mL fut centrifugé à 4000rpm pendant 15min pour des dilutions 1:2 en séries en plaques de 96 puits contenant 100uL de milieu M199. 9mL ont été centrifugés à 1500 rpm pendant 10min. Les analyses par FACS (LSRFortessa cell analyser (Becton Dickinson)) ont été complétées avec des anticorps conjugués à des fluorochromes contre CD11 et Lyc6 (BD) et analysées par le logiciel Flowjo.

1. 6 Anticorps

Les anticorps contre STX5, SytV et SytXI ont été achetés chez Synaptic System (SySy), contre GP91^{phox} (clone 53) chez BD Transduction Laboratories, contre TCIRG1 chez Sigma-Aldrich, contre iNOS chez Abcam et les anticorps couplés à des fluorochromes contre CD11 et Ly6 chez BD.

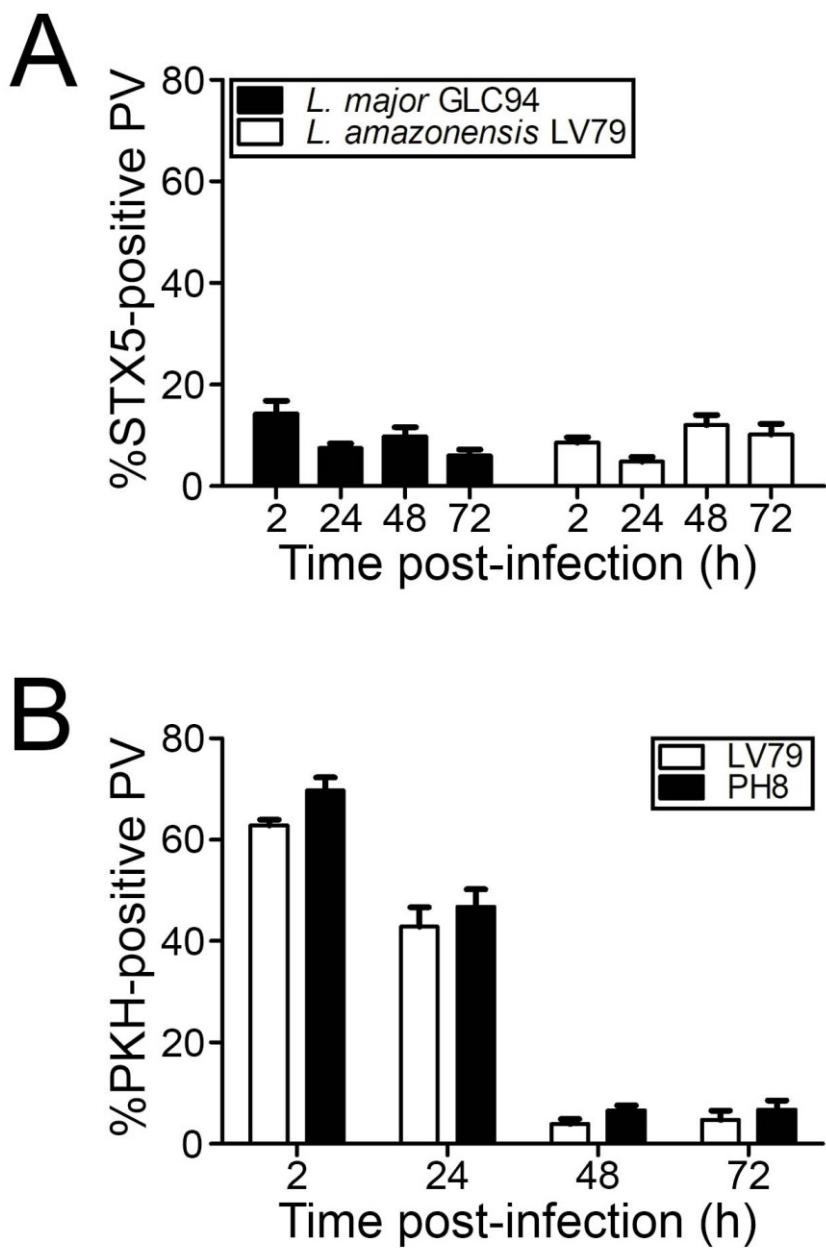


Figure A1.1 Recrutement de Stx5 et de la membrane du parasite

A. Des BMMs de souris C57BL/6 x 129 ont été infectés par des promastigotes opsonisés de *L. major* GLC94 ou *L. amazonensis* LV79. Le recrutement de Stx5 a été quantifié par microscopie confocale 2, 24, 48 et 72h après l'infection. Les données sont présentées comme la moyenne ± SEM des valeurs de trois expériences indépendantes. B. Des BMMs de souris C57BL/6 ont été infectés par des promastigotes opsonisés de *L. amazonensis* LV79 ou *L. amazonensis* PH8 marqués au PKH. Le recrutement du PKH à la membrane des PVs a été quantifié par microscopie confocale 2, 24, 48 et 72h après l'infection. Les données sont présentées comme la moyenne ± SEM des valeurs de trois expériences indépendantes.

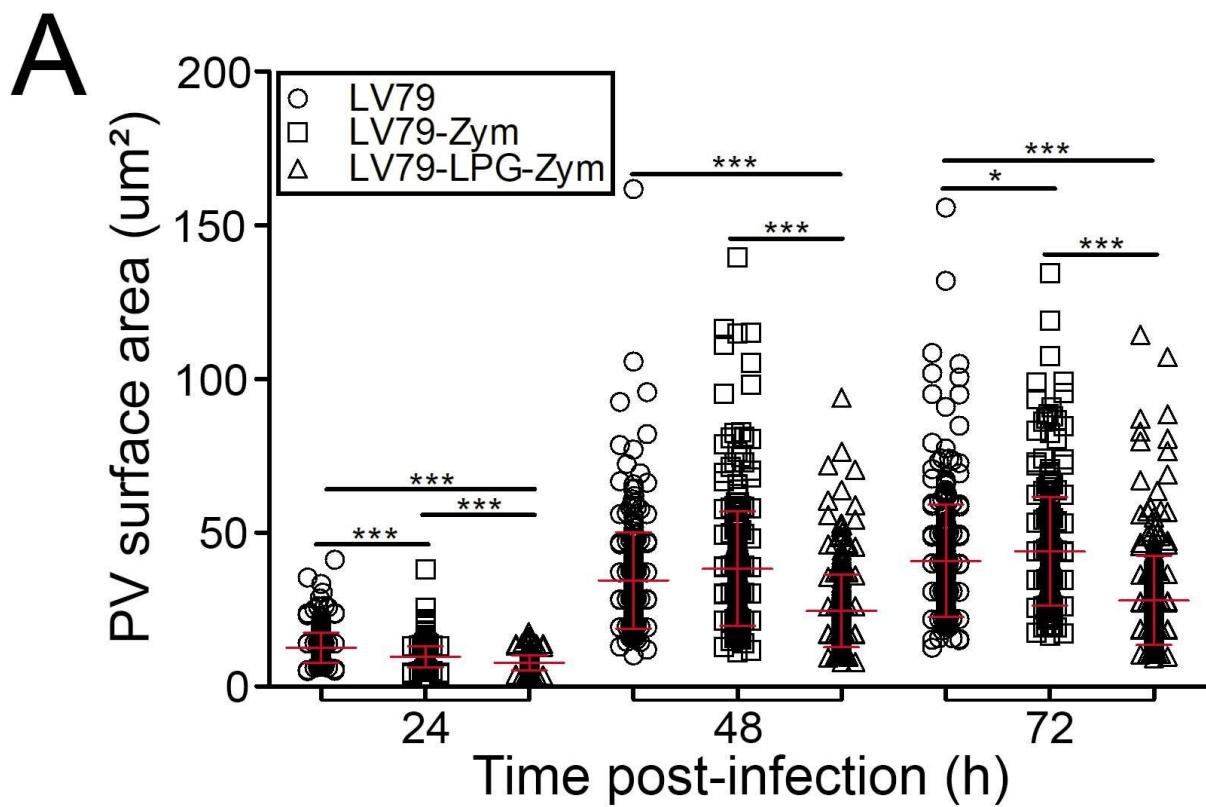


Figure A1.2 LPG limite l'expansion de la PV de *L. amazonensis*

A. Des particules de zymosan opsonisées ou de zymosan opsonisées recouvertes de LPG ont été cophagocytées par des BMMs C57BL/6 x 129 infectés par des promastigotes opsonisés de *L. amazonensis* LV79. L'expansion des PVs a été mesurée par l'outil Bezier de Zen 2012 par microscopie confocale 24, 48 et 72h après l'infection. Les données sont présentées sous forme de nuage avec la moyenne \pm SD des valeurs de deux expériences indépendantes d'un total de 300 PV. *p \leq 0.05, ***p \leq 0.001.

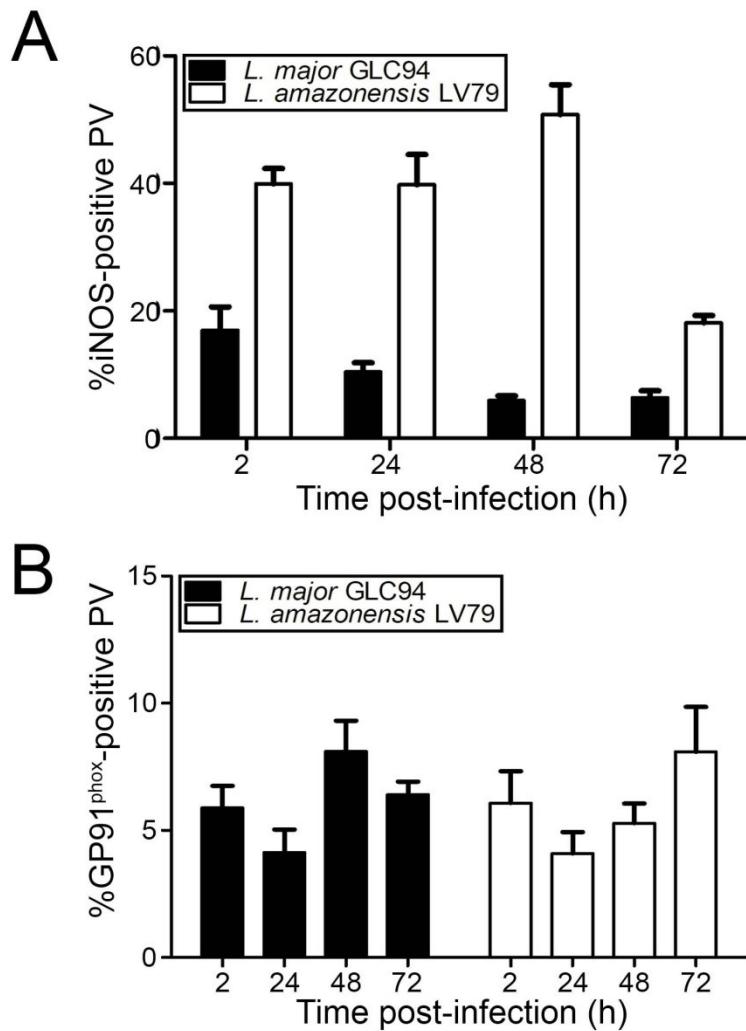


Figure A1.3 Recrutement des agents microbicides aux PVs

Des BMMs C57BL/6 ont été infectés par des promastigotes opsonisés de *L. major* GLC95 ou *L. amazonensis* LV79. A. Le recrutement de iNOS a été quantifié 2, 24, 48 et 72 après l'infection. Les données sont présentées comme la moyenne ± SEM des valeurs de trois expériences indépendantes. B. Le recrutement de GP91^{phox} a été quantifié 2, 24, 48 et 72 après l'infection. Les données sont présentées comme la moyenne ± SEM des valeurs de trois expériences indépendantes.

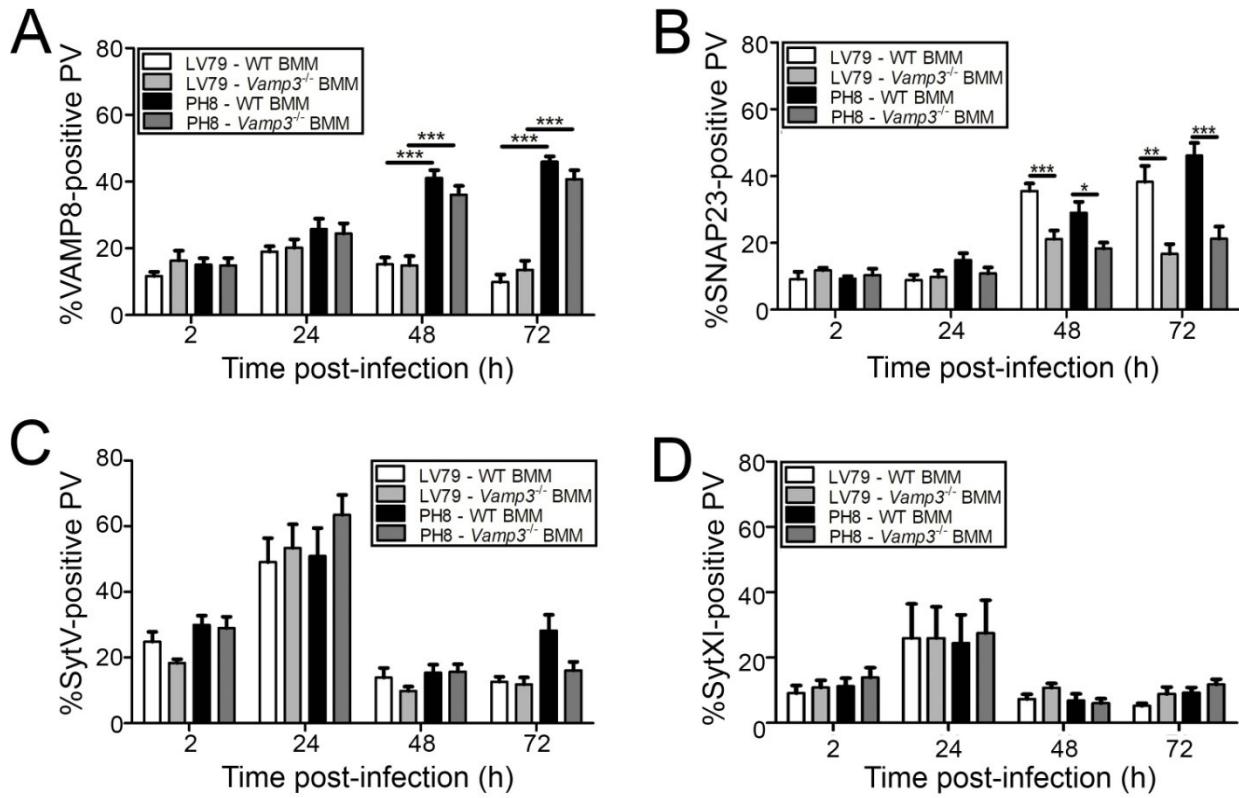


Figure A1. 4 La fusion membranaire en absence de VAMP3

Des BMMs C57BL/6 WT et *Vamp3^{-/-}* ont été infectés par des promastigotes opsonisés de *L. amazonensis* LV79 ou *L. amazonensis* PH8. Le recrutement de VAMP8 (A), SNAP23 (B), SytV (C) et SytXI (D) a été quantifié par microscopie confocale 2, 24, 48 et 72h après l'infection. Les données sont présentées comme moyenne ± SEM des valeurs de trois expériences indépendantes. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001

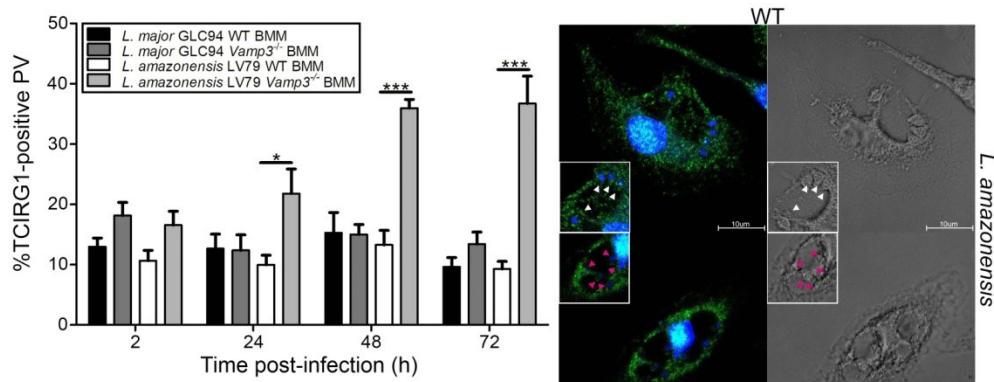
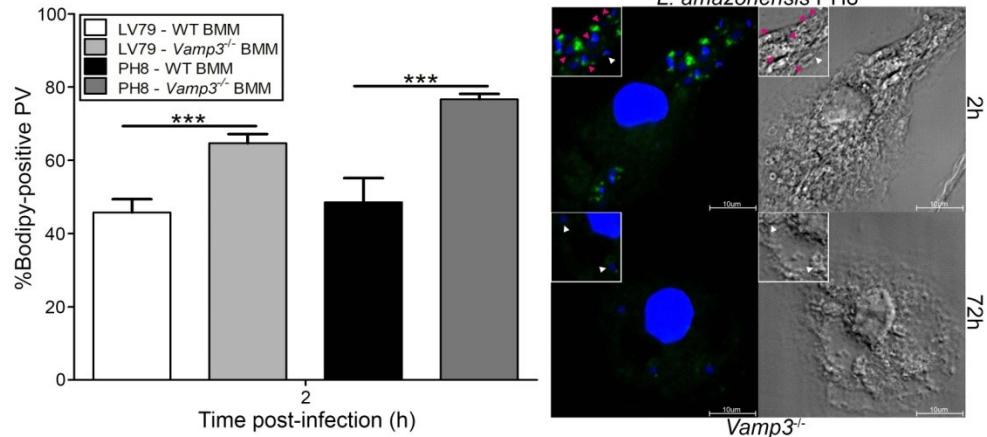
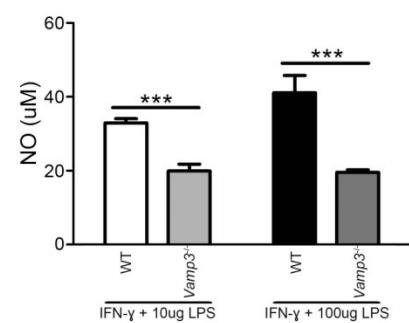
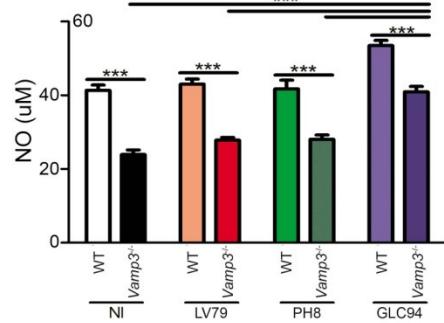
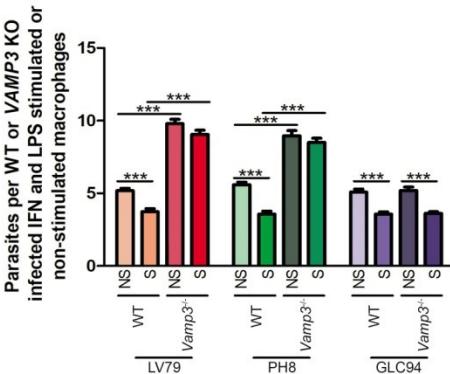
A**B****C****D****E**

Figure A1. 5 VAMP3 régule la V-ATPase et la sécrétion du NO

A et B. Des BMMs C57BL/6 ont été infectés par des promastigotes opsonisés de *L. major* GLC94 ou *L. amazonensis* LV79. Le recrutement de TCIRG1 (A) et de Bodipy (B) a été quantifié par microscopie confocale 2, 24, 48 et 72h après l'infection. TCIRG1 et Bodipy sont montrés en vert et l'ADN en bleu. Les données sont présentées comme moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes. Des images représentatives de ces trois expériences sont montrées. Les encarts montrent la PV. Les têtes de flèches roses indiquent un recrutement positif et les têtes de flèches blanches un recrutement négatif. La barre représente 10µm. C. Des BMMs C57BL/6 x 129 ont été simulés pendant 18h avec l'IFN- γ suivi par une stimulation de 24h avec 10µg/mL ou 100µg/mL de LPS. La sécrétion de NO a été quantifiée par test de Griess. Les données sont présentées comme moyenne ± SEM des valeurs de trois expériences indépendantes. ***p ≤ 0.001. D-E. Des BMMs C57BL/6 x 129 infectés pendant 6h par des promastigotes opsonisés de *L. amazonensis* LV79, *L. amazonensis* PH8 ou *L. major* GLC94 ont été simulés pendant 18h avec l'IFN- γ suivi par une stimulation de 24h avec 10µg/mL ou 100µg/mL de LPS. La sécrétion de NO a été quantifiée par test de Griess (D). La survie des parasites a été quantifiée par Giemsa (E). Les données sont présentées comme moyenne ± SEM des valeurs de trois expériences indépendantes. ***p ≤ 0.001.

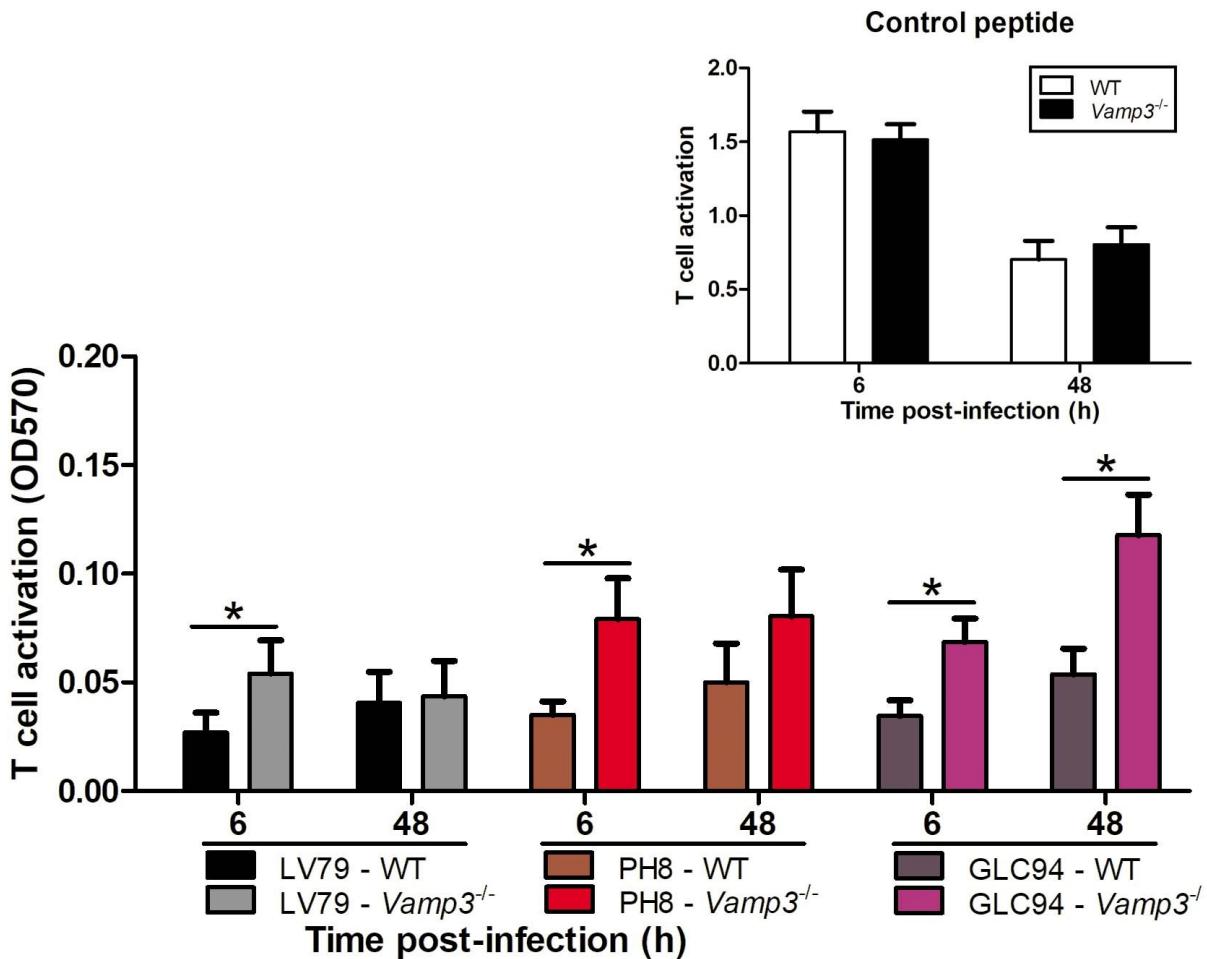


Figure A1.6 VAMP3 régule négativement la présentation antigénique croisée des BMDCs infectés par *Leishmania*

A. Des billes recouvertes d'OVA ont été cophagocytées par des BMDCs C57BL/6 x 129 WT et *Vamp3*^{-/-} infectés par *L. amazonensis* LV79, *L. amazonensis* PH8 ou *L. major* GLC94. La présentation antigénique croisée a été évalué en utilisant l'hybridome des cellules T B3Z après 5h d'incubation à 37°C (570nm). Le peptide SIINFEKL a été ajouté aux BMDCs C57BL/6 x 129 non-infectés à titre de contrôle de l'expression du CMH-I à la surface cellulaire. Les données sont présentées comme moyenne ± SEM des valeurs de trois expériences indépendantes. p ≤ 0.05

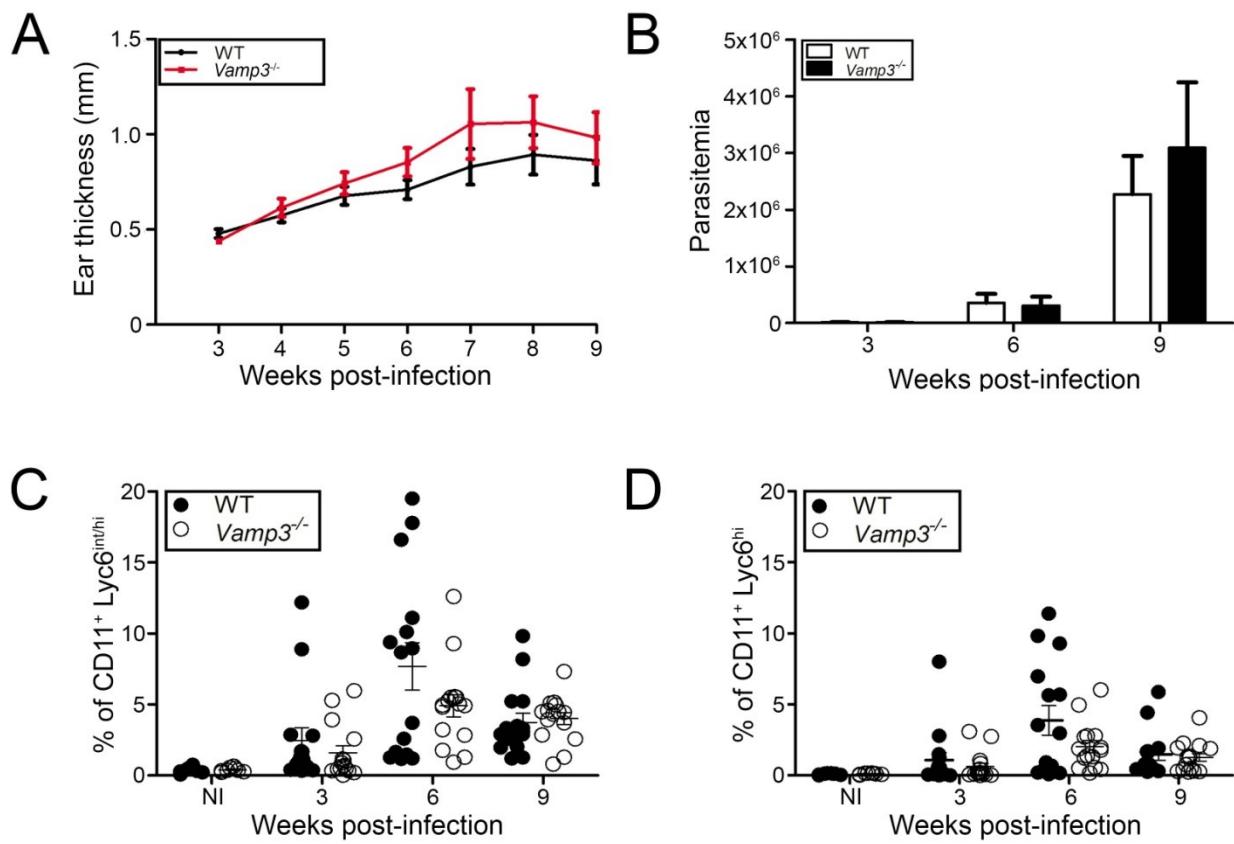


Figure A1.7 VAMP3 est un potentiel régulateur d'infection *in vivo*

Des souris C57BL/6 x 129 WT et *Vamp3*^{-/-} ont été infectées par injection intradermique au niveau de l'oreille par 10 000 promastigotes métacycliques de *L. amazonensis* LV79. L'évolution des plaies a été suivie de façon hebdomadaire en mesurant l'épaisseur des oreilles infectées pendant 3 à 9 semaines. N = 15 B. La parasitémie a été mesurée par dilutions un dans deux en séries d'homogénats d'oreilles infectées 3, 6 et 9 semaines après l'infection. N = 15. C et D. Les populations de monocytes totaux (C) et de monocytes pro-inflammatoires (D) retrouvés aux oreilles infectées ont été mesurées par cytométrie en flux 3, 6 et 9 semaines après l'infection.

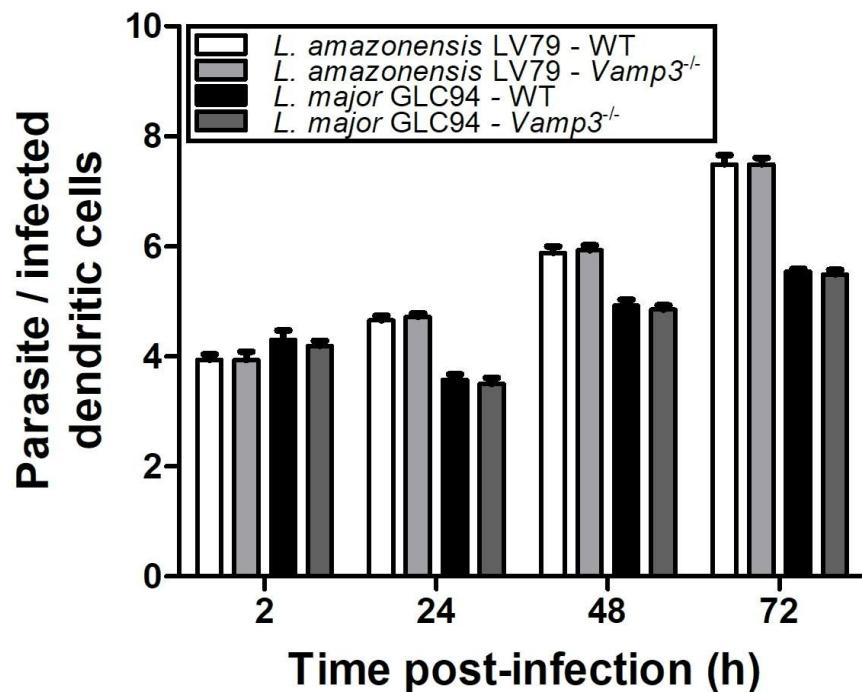


Figure A1. 8 VAMP3 n'influence pas la survie intracellulaire dans les cellules dendritique

Des BMDCs de souris C57BL/6 x 129 WT et Vamp3^{-/-} ont été infectés avec des promastigotes de *L. amazonensis* LV79 ou *L. major* GLC94. La survie des parasites a été quantifiée par GIEMSA 2, 24, 48 et 72h après l'infection. L'histogramme représente deux infections en triplicatas.

ANNEXE II - Revue de littérature

1 *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite

Leishmania, le phagosome, et la réponse immunitaire de l'hôte: Le périple d'un parasite

Auteurs:

Olivier Séguin¹, Albert Descoteaux¹

Institut National de la Recherche Scientifique - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Qc, Canada H7V 1B7

Titre de la revue:

Cellular Immunology

Publié le 8 août 2016

DOI: [10.1016/j.cellimm.2016.08.004](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.08.004)

Contribution des auteurs:

Cette revue de littérature a été effectuée principalement par Olivier Séguin et rédigée par Olivier Séguin et Albert Descoteaux.

1. 1 Abstract

Leishmania is the eukaryotic parasite responsible for *Leishmaniases*, a spectrum of diseases that puts at risk roughly 350 millions of people in 98 countries according to the Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). This parasite has a complex life cycle composed of two distinct stages, the promastigote form found in the female sand-fly vector and the amastigote form that replicates in the mammalian host [1]. To survive, the parasite interacts with its host immune system at multiple levels. In this review, we discuss the nature of those interactions, how they affect the host immune system, and how they affect parasite survival from the very beginning of the life cycle in the vector to its dissemination within the mammalian host

1. 2 Introduction

1. 2. 0 Within the fly

The journey of *Leishmania* into its mammalian host begins in the midgut of female hematophagous sand flies, where *Leishmania* promastigotes proliferate and mature into infectious metacyclic forms. These infectious promastigotes migrate through the invertebrate vector oesophagus, causing its blockade, where they are finally ready to be inoculated into their mammalian host. Upon the following blood meal, sand flies regurgitate the parasites into the host bite wound. There, the parasites are rapidly taken up by various phagocytes populations recruited at the site of inoculation, including neutrophils, monocytes and macrophages [2, 3].

1 .3. 0 A necessary sacrifice

During the establishment of infection within their mammalian hosts, not all *Leishmania* promastigotes are successful. Indeed, death of a sub-population of *L. major* is crucial for the infection process since injection of live parasite only leads to parasite clearance and to the development of host immunity [4]. This parasite mortality occurs naturally within the gut of infected sand flies and generates apoptotic-like *L. amazonensis* promastigotes that display phosphatidylserine (PS) at their surface, a lipid found on apoptotic cells, which are recognized by phagocytes [5]. Recognition of PS on apoptotic host cells is a mechanism that leads to a non-aggressive activation of phagocytes where inflammatory cytokines secretion is inhibited to avoid unnecessary immune reaction and where proinflammatory molecules such as TGF- β , PGE2 and PAF are produced [6, 7]. Presence of apoptotic-like *L. major* promastigotes represents a crucial step that enables survival of the inoculated parasites, as they inhibit the immune response triggered by the 4 recognition of live parasites. Interestingly, this inhibition has been linked to an alternative internalization process, known as LC3-associated phagocytosis (LAP), and not to the parasite itself. Internalisation through LAP indeed causes an augmentation of IL-10 and TGF β , two important players of the tolerogenic pathway, and a reduction of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 secretion [8].

The importance for *L. amazonensis* to hijack the autophagic machinery has been highlighted through the use of PS targeting antibodies [5]. When PS are efficiently targeted, lesion size and parasite load are greatly diminished [5].

1. 3 Before phagocytosis

1. 3. 1 Complement and galectin

The zinc-metalloprotease GP63, or leishmaniolysine, is among the various pathogenicity factors expressed by *Leishmania* promastigotes [9, 10]. This major surface antigen exerts several functions before and after internalisation by phagocytic cells. It has been shown to degrade the extracellular matrix at a sub-cutaneous level, which is believed to facilitate the parasite movement under the skin following inoculation of promastigotes into the dermis [11]. GP63 is also able to inhibit complement activity by binding C3b and to increase the conversion of C3b into C3bi, an inactive form of C3, through direct cleavage, and thereby reducing fixation of the terminal C5-C9 membrane attack complex [12]. Under normal circumstances, complement-driven lysis is an important component of the host innate response that contributes to the elimination of pathogens. Inactivation of this host defense mechanism by *Leishmania* promastigotes thus represents an important step towards survival in mammals, and to entry inside 5 macrophages as it leads to enhanced phagocytosis through the complement receptors 3 and 1 [13, 14]. Consistent with the ability of GP63 to cleave C3, GP63-deficient *L. major* promastigotes were shown to be susceptible to complement-mediated lysis [15]. In addition to complement, Galectin-3, a mammalian soluble β -galactoside-binding lectin involved in host defense against *Leishmania* [16, 17], was shown to bind to the surface of *L. major* promastigotes through LPG [18]. Interestingly, bound Galectin-3 is cleaved by GP63 which prevents the formation of high orders of Galectin-3 lattices and may influence the immune response against *Leishmania* [18, 19].

1. 3. 2 Natural Killer cells

GP63 also counteracts various innate immune response actors such as natural killer (NK) cells through direct inactivation. This metalloprotease is indeed able to suppress the proliferation of IL-2-activated NK cells and affects expression of receptors at their surface [20, 21]. NK cells play an important role in the response to *L. major* through the production of IFN- γ which assists in driving an effective Th1 response [22]. In an experimental model of Leishmaniasis, IL-12 was shown to drive a Th1 effective response associated with IFN- γ , IL-2 and TNF- α production while the Th2 susceptible response was associated to IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 and TGF- β production [23, 24]. But even in resistant mice that establish a Th1 response with IFN- γ production throughout the infection, IL-10 production and accumulation in the entry wound after 2 weeks of infection was observed. This suggests that the recruitment of a higher amount of IFN- γ producing CD4+ T cells to the site of inoculation would be an effective way to obtain sterile cure [25].

1. 3. 3 Phagocytes

Upon inoculation, species such as *L. chagasi* cause host cells migration to the wound in an attempt to repair damaged tissues. The first cells to arrive to the bite wound site are neutrophils followed by macrophages/monocytes/dendritic cells. This migration is favored by the saliva of the sand fly vector which was shown to enhance cell migration up to three-fold. An important diversity of cells is recruited to the inflammatory exudate but most of them surprisingly remain in the lining tissue surrounding the wound. *L. chagasi* also causes the influx of more neutrophils than macrophages which suggests a strategy to minimise the initial inflammatory response. An augmented flux of neutrophils to the wound is therefore quickly established to control the infection [26]. Neutrophils quickly undergo apoptosis and are taken up by macrophages and dendritic cells [27, 28]. Parasites taken up by neutrophils induce the expression of high levels of apoptotic markers. *Leishmania*-harboring apoptotic neutrophils are in turn internalized by dendritic cells, triggering an immunosuppressive response, which delays the development of acquired resistance [28]. This uptake of apoptotic neutrophils has been shown to allow *L. major* survival in the early infection steps, highlighting a mechanism by which *L. major* exploits the macrophage/dendritic cells-neutrophils interaction [29, 30].

Clearance of the infected apoptotic neutrophils by dendritic cells was also shown to lead to the inhibition of CD8+ T cells priming in vitro [31]. Consistent with this finding, depletion of neutrophils in susceptible BALB/c mice drove resistance to infection by inhibiting the Th2 response [32].

1. 3. 4 Neutrophil Extracellular Traps

In addition to being internalized by neutrophils, promastigotes of various species including *L. amazonensis*, *L. donovani*, and *L. major*, can induce the rapid release of their DNA and a subset of their granule content, forming filamentous structures that capture and kill microorganisms named neutrophil extracellular traps (NETs) [33, 34]. Depending of the species, *Leishmania* are either killed or survive NETs [34]. Hence, *L. amazonensis* is killed by NETs, whereas in the case of *L. donovani*, NETs were proposed to immobilize promastigotes and facilitate their internalization by phagocytic cells such as monocytes. The ability to survive NETs is conferred by either LPG or the 3'-Nucleotidase/Nuclease, as parasites defective in LPG expression and parasites with diminished 3'- Nucleotidase/Nuclease activity were more susceptible to NETs killing [34, 35]. The 3'- Nucleotidase/Nuclease is a membrane anchored enzyme that was previously associated with nutrition since its activity is able to generate nucleotides and phosphate from nucleic acids [36-38].

1. 4 After phagocytosis

1. 4. 1 Parasitophorous vacuole formation

Following internalisation via phagocytosis, promastigotes freshly established within newly formed phagosomes proceed to modify this compartment into a parasitophorous vacuole (PV), which can be either spacious and communal or tight and individual [39, 40]. These modifications are enabled by pathogenicity factors such as lipophosphoglycan (LPG) [41]. To influence PV formation and to promote parasite survival, LPG acts by disrupting phagosomal lipid microdomains. This disruption leads to the impairment of the NADPH oxidase assembly at the PV membrane and to the exclusion of the vesicular proton-ATPase, thereby impairing vacuolar acidification [42-44]. One consequence of disrupting the integrity of the phagosomal lipid microdomains is a reduced phagosome fusogenicity towards endosomes and lysosomes [45].

This may be related to the fact that intact lipid microdomains are required for the phagosomal recruitment of synaptotagmin V, a regulator of membrane fusion [44]. LPG also induces the accumulation of periphagosomal F-actin, which may form a physical barrier that potentially prevents vesicular trafficking to the phagosome [46]. The role of LPG in the parasite survival is however restricted to the promastigote stage as this molecule is highly down-modulated in amastigotes [47]. Another pathogenicity factor, the cysteine proteinase B (CPB), contributes to *L. mexicana* virulence as knock-out parasite induced a protective Th1 response and poor lesion growth in BALB/c mice [48]. *L. mexicana* CPB was also shown to alter macrophages signaling and functions through the alteration of NF- κ B, STAT-1 α , and AP-1 which inhibits IFN- γ responses, production of nitric oxide, and lipopolysaccharide-induced macrophages IL-12 production [49, 50]. Recently, our group reported that *L. mexicana* CPB regulates virulence through the control of GP63 expression. Interestingly, expression of an exogenous GP63 into CPB knock-out parasites was sufficient to restore virulence in *L. mexicana* [51].

1. 4. 2 Cytokines modulation

1. 4. 2. 1 By the promastigote

Once inside the macrophage, *L. major* proceeds to modulate the phagocytic cell cytokines secretion pattern to promote its phagocytosis and its survival. To accomplish this feat, the parasite uses a variety of mechanisms. Studies from the group of Olivier 9 revealed that GP63 causes the activation of protein tyrosine phosphatases such as SHP1, PTP1B, and TCPTP that act along the JAK, MAPK and IRAK-1 kinase pathways [52- 55]. GP63 also selectively downregulates host cell protein synthesis through alterations of the mTORC1-dependent signaling [56]. GP63 inactivates various transcription factors such as AP-1 and NF- κ B through specific cleavage and degradation of different subunits [57, 58]. More recently, GP63 was shown to target the nuclear envelop, where it degrades nucleoporins of the nuclear pore complexes [59]. These signaling and transcription modifications were proposed to inhibit host responses associated to the control of infection, such as the release of TNF, IL-12, and NO, which will contribute to the survival of the parasite and facilitate its replication [50, 55, 60].

In contrast, our group recently described a role for GP63 in inducing cytokine release, whereby GP63 cleaves synaptotagmin XI, a SNARE present on recycling endosomes and lysosomes and that negatively regulates the secretion of preformed stored TNF and IL-6 [61]. We showed that both of these pro-inflammatory cytokines are responsible for the augmentation of neutrophils and inflammatory monocytes influx to the parasite inoculation site. This augmented influx then indirectly contributes to the spread and maintenance of infection [62].

1. 4. 2. 2 By the amastigote

Between 24 to 48 h post-internalization, promastigotes transform into the nonflagellated amastigote forms. The signals that trigger the differentiation process are not fully understood and are believed to involve a temperature shift and acidification of the parasitophorous vacuole [63]. The effective differentiation into amastigotes has been shown to significantly up-regulate the Th2-associated cytokines while avirulent parasites failed to differentiate into amastigotes and to induce such an immune response [64]. Another *Leishmania* pathogenicity factor, the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP11), whose expression is increased during metacyclogenesis and in *L. amazonensis* amastigote stage, was shown to exacerbate BALB/c mice peritoneal macrophages infection by increasing IL-10 secretion [65, 66]. KMP-11 was also shown to increase the macrophage arginase activity while reducing the nitric oxide production, thus promoting parasite survival [65]. KMP-11 is currently regarded as a potential vaccine target [67]. *Leishmania* amastigotes mimic apoptotic cells by exposing PS on their surface, and this contributes to the ability of *Leishmania* to evade the immune response. The levels of PS exposed at the parasite surface were positively linked to parasite infectivity, since parasites recovered from infected susceptible BALB/c exposed more PS than parasites isolated from resistant C57/BL6 mice, and were found to be more infectious [68].

1. 5 Modulation of immune responses

1. 5. 1 Antigen presentation

Once established within its host cell, the parasite begins to modulate the host adaptive immune response. Hence, in addition to the suppressive effects of GP63 in macrophages, this protease targets specific proteins in other cell types [20, 52, 69, 70]. Indeed, GP63 alters the expression of surface receptors in NK cells and thereby inhibits their proliferation [20]. In T lymphocytes, GP63 cleaves the surface co-receptor CD4 [69]. Since CD4 is required for T lymphocyte activation, its cleavage by GP63 is likely to reduce T lymphocyte responses to antigen presenting cells. In line with these observations, *L. donovani* and *L. major* inhibits cross-presentation (i.e. presentation of exogenous microbial antigens in the context of MHC class I to CD8+ T lymphocytes) by dendritic cells and macrophages, an event that is dependent on the cleavage of VAMP8 by GP63. As a result, activation of CD8+ T lymphocytes is reduced [70]. The importance of crosspresentation in *L. major* immunity was demonstrated in Balf3 null mice lacking the IL-12 producing and cross-presenting CD8a+ and CD103 DC subset [71]. These mice developed larger lesions with higher parasite burden linked to an impaired IFN- γ production and increased Th2 and Th17 cytokines with *Leishmania* specific immunoglobulin 1 (IgG1). IFN- γ was also shown to be mainly produced by the crosspresenting DC subset compared to the CD103 DC subset. Furthermore, Balf3 deletion and cross-presenting DC depletion during infection led to the similar increases in wound size and parasite load [72].

1. 5. 2 T cells activation

Inhibition of cross-presentation is only one of the many ways devised by *Leishmania* to evade the adaptive immune response. Hence, *L. donovani* possesses the capacity to downregulate CD80 and ICAM-1 expression in infected cells which leads to the failure to optimally activate T cells while other species such as *L. major* efficiently modulate the expression of CD40, anergising Tcells and favoring the development of Treg in the context of a lower expression of CD40. These Treg will in turn counteract the proinflammatory Th and exacerbate the infection [73-76].

The importance of CD40 in *L. major* infection has been shown through the use of CD40 knockout mice where a 12 significantly lower amount of IL-12 was produced leading to an ineffective Th2-response [74, 75].

1. 5. 3 Dissemination

Subversion of the host immune response may represent an important step to allow dissemination of the parasites. Depending on the *Leishmania* species, dissemination may or may not occur. Species such as *L. donovani* will develop in the spleen and liver causing potentially fatal visceral Leishmaniasis, whereas other species such as *L. major* will remain cutaneous and other such as *L. braziliensis* may disseminate and become mucosal [77- 79].

1. 5. 3. 1 Matrix metalloproteinases (MMP)

The inflammation marker matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) plays various roles including immune cell migration, macrophage recruitment, and effective granuloma formation. It has been shown to be associated with the dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* and to have an augmented secretion and activation during *L. braziliensis* infection in vitro [79]. MMP-9 and MMP-2 contribute to cell migration through the degradation of the type IV collagen in the basal lamina [80]. Furthermore, macrophages from treated mucosal Leishmaniasis, which results from *L. braziliensis* dissemination, displayed increased MMP-9 activity compared to macrophages from treated cutaneous Leishmaniasis [80]. Recently, the soluble secretory serine protease (pSP) of *L. donovani* has been used as a new vaccine target adjuvanted with IL-12 to drive a protective Th1 response. The presence of antibodies against pSP led to reduced parasite internalization 13 by macrophages and to protection against the parasite. Groups receiving this vaccine had an increased Th1 associated cytokines such as IFN- γ and TNF while their Th2 associated cytokines such as IL-4 and IL-10 were decreased. More specifically, this protection is linked to the modification of the cytokine-mediated MMP-9 expression through TNF-induced MMP-9 expression down regulation by IFN- γ [81, 82]. Release of MMP-9 was increased by over 40% and an augmented secretion in co-culture of hepatocytes and infected macrophages leading to hepatocyte damage [83].

A similar phenomenon was observed in dogs suffering from visceral Leishmaniasis where the level of active MMP-9 was much higher than in control dogs. Higher levels of proMMP-9 and proMMP-2 were also noted although no augmentation of active MMP-2 was found [84]. In cutaneous Leishmaniasis patients receiving antimonial treatments, an important gelatinase activity was detected in the wounds of poorly responding patients, linked with an augmented presence of IFN- γ , TGF- β and IL-10 producing cells with a prevalence of IFN- γ while an augmentation of MMP-2 was detected in the wound of good responding patients with a prevalence of IL-10 [85]. MMP-2 was previously shown to be important for skin re-epithelialization [86].

1. 5. 3. 2 Effective cure markers

Although the increase in MMP-9 could be used by the parasite to migrate through the host body, its drastic augmentation combined with an augmentation of the soluble CD40L during antimonial treatment of visceral Leishmaniasis was negatively correlated with parasite load and spleen size, identifying MMP-9 and CD40L as potential markers for an effective cure [87].

1. 6 Conclusions and perspectives

Leishmania is a very complex and specialised parasite that possesses the ability to survive and thrive within its human host. To survive, *Leishmania* uses an arsenal of pathogenicity factors that includes LPG and GP63 to modify the phagosome into a parasitophorous vacuole, modulate the expression and secretion of cytokines, modulate the immune cells flux to the infection site and modulate the antigen presentation favoring a Th2 inefficient response. A lot is still unknown as to how *Leishmania* modifies the phagosome to ensure its survival, modulates the immune response, and migrates throughout the host body. A better understanding of this complex parasitic relationship will also require to take into consideration host genetic factors as well as the diversity of parasite species and strains.

1. 7 Acknowledgments

Work in our laboratory is supported by the Canadian Institutes of Health Research grant MOP-125990. The Center for host-parasite interaction is supported by the Fonds de recherche Québec - Nature et Technologies (Programme Regroupements Stratégiques). OS is the recipient of the Armand-Frappier doctoral studentship from the Fondation Universitaire Armand-Frappier INRS.

2 References

- [1] D.E. Teixeira, M. Benchimol, J.C. Rodrigues, P.H. Crepaldi, P.F. Pimenta, W. de Souza, The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations, PLoS pathogens, 9 (2013) e1003594.
- [2] D. Sacks, S. Kamhawi, Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis, Annual review of microbiology, 55 (2001) 453-483.
- [3] M.E. Rogers, The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host, Frontiers in microbiology, 3 (2012) 223.
- [4] G. van Zandbergen, A. Bollinger, A. Wenzel, S. Kamhawi, R. Voll, M. Klinger, A. Muller, C. Holscher, M. Herrmann, D. Sacks, W. Solbach, T. Laskay, *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (2006) 13837-13842.
- [5] J.L. Wanderley, P.E. Thorpe, M.A. Barcinski, L. Soong, Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function, Parasite immunology, 35 (2013) 109-119.
- [6] V.A. Fadok, D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, P.M. Henson, Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF, The Journal of clinical investigation, 101 (1998) 890-898.
- [7] K.S. Ravichandran, Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums, The Journal of experimental medicine, 207 (2010) 1807-1817.
- [8] P. Crauwels, R. Bohn, M. Thomas, S. Gottwalt, F. Jackel, S. Kramer, E. Bank, S. Tenzer, P. Walther, M. Bastian, G. van Zandbergen, Apoptotic-like *Leishmania* exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination, Autophagy, 11 (2015) 285-297.
- [9] J. Bouvier, C. Bordier, H. Vogel, R. Reichelt, R. Etges, Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase, Molecular and biochemical parasitology, 37 (1989) 235-245.
- [10] G. Chaudhuri, M. Chaudhuri, A. Pan, K.P. Chang, Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposomeencapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages, The Journal of biological chemistry, 264 (1989) 7483-7489.
- [11] B.S. McGwire, K.P. Chang, D.M. Engman, Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63, Infection and immunity, 71 (2003) 1008-1010.
- [12] A. Brittingham, C.J. Morrison, W.R. McMaster, B.S. McGwire, K.P. Chang, D.M. Mosser, Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis, J Immunol, 155 (1995) 3102-3111.

- [13] J.R. Dunkelberger, W.C. Song, Complement and its role in innate and adaptive immune responses, *Cell research*, 20 (2010) 34-50.
- [14] R.P. Da Silva, B.F. Hall, K.A. Joiner, D.L. Sacks, CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages, *J Immunol*, 143 (1989) 617-622.
- [15] P.B. Joshi, B.L. Kelly, S. Kamhawi, D.L. Sacks, W.R. McMaster, Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor, *Molecular and biochemical parasitology*, 120 (2002) 33-40.
- [16] P. Bhaumik, G. St-Pierre, V. Milot, C. St-Pierre, S. Sato, Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection, *J Immunol*, 190 (2013) 630-640.
- [17] M.L. Fermino, F.C. Dias, C.D. Lopes, M.A. Souza, A.K. Cruz, F.T. Liu, R. Chammas, M.C. Roque-Barreira, G.A. Rabinovich, E.S. Bernardes, Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells and influences the course of *Leishmania major* infection, *European journal of immunology*, 43 (2013) 1806-1817.
- [18] I. Pelletier, S. Sato, Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 17663-17670.
- [19] S. Sato, P. Bhaumik, G. St-Pierre, I. Pelletier, Role of galectin-3 in the initial control of *Leishmania* infection, *Critical reviews in immunology*, 34 (2014) 147-175.
- [20] T. Lieke, S. Nylen, L. Eidsmo, W.R. McMaster, A.M. Mohammadi, A. Khamesipour, L. Berg, H. Akuffo, *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation, *Clinical and experimental immunology*, 153 (2008) 221-230.
- [21] S. Rasolzadeh, M. Haji Fatahaliha, M. Hosseini, R. Jafari, A. Miahipour, A.A. Movassaghpoor, Z. Babalo, S. Rafati, M. Yousefi, Recombinant LPG3 Stimulates IFNGamma and TNF-A Secretion by Human NK Cells, *Iranian journal of parasitology*, 10 (2015) 554-560.
- [22] T.M. Scharton, P. Scott, Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice, *The Journal of experimental medicine*, 178 (1993) 567-577.
- [23] M.E. Wilson, S.M. Jeronimo, R.D. Pearson, Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species, *Microbial pathogenesis*, 38 (2005) 147-160.
- [24] F.P. Heinzel, M.D. Sadick, S.S. Mutha, R.M. Locksley, Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine Leishmaniasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (1991) 7011-7015.
- [25] A.J. Pagan, N.C. Peters, A. Debrabant, F. Ribeiro-Gomes, M. Pepper, C.L. Karp, M.K. Jenkins, D.L. Sacks, Tracking antigen-specific CD4+ T cells throughout the course of chronic *Leishmania major* infection in resistant mice, *European journal of immunology*, 43 (2013) 427-438.
- [26] C.O. Vasconcelos, Z.C. Coelho, S. Chaves Cde, C.R. Teixeira, M.M. Pompeu, M.J. Teixeira, Distinct cellular migration induced by *Leishmania infantum chagasi* and

saliva from *Lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model, Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 56 (2014) 21-27. 17

[27] J. Savill, I. Dransfield, C. Gregory, C. Haslett, A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses, Nature reviews. Immunology, 2 (2002) 965-975.

[28] F.L. Ribeiro-Gomes, N.C. Peters, A. Debrabant, D.L. Sacks, Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response, PLoS pathogens, 8 (2012) e1002536.

[29] N.C. Peters, D.L. Sacks, The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous Leishmaniasis, Cellular microbiology, 11 (2009) 1290-1296.

[30] N.C. Peters, J.G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M.P. Fay, R.N. Germain, D. Sacks, In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies, Science, 321 (2008) 970-974.

[31] F.L. Ribeiro-Gomes, A. Romano, S. Lee, E. Roffe, N.C. Peters, A. Debrabant, D. Sacks, Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8(+) T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling, Cell death & disease, 6 (2015) e2018.

[32] F. Tacchini-Cottier, C. Zweifel, Y. Belkaid, C. Mukankundiye, M. Vasei, P. Launois, G. Milon, J.A. Louis, An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*, J Immunol, 165 (2000) 2628-2636.

[33] A.B. Guimaraes-Costa, M.T. Nascimento, G.S. Froment, R.P. Soares, F.N. Morgado, F. Conceicao-Silva, E.M. Saraiva, *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106 (2009) 6748-6753.

[34] C. Gabriel, W.R. McMaster, D. Girard, A. Descoteaux, *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps, J Immunol, 185 (2010) 4319-4327.

[35] A.B. Guimaraes-Costa, T.S. DeSouza-Vieira, R. Paletta-Silva, A.L. FreitasMesquita, J.R. Meyer-Fernandes, E.M. Saraiva, 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps, Infection and immunity, 82 (2014) 1732-1740.

[36] D.M. Dwyer, M. Gottlieb, Surface membrane localization of 3'- and 5'-nucleotidase activities in *Leishmania donovani* promastigotes, Molecular and biochemical parasitology, 10 (1984) 139-150.

[37] W.F. Sopwith, A. Debrabant, M. Yamage, D.M. Dwyer, P.A. Bates, Developmentally regulated expression of a cell surface class I nuclease in *Leishmania mexicana*, International journal for parasitology, 32 (2002) 449-459.

[38] D.J. Hammond, W.E. Gutteridge, Purine and pyrimidine metabolism in the *Trypanosomatidae*, Molecular and biochemical parasitology, 13 (1984) 243-261.

[39] N. Courret, C. Frehel, N. Gouhier, M. Pouchelet, E. Prina, P. Roux, J.C. Antoine, Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites, Journal of cell science, 115 (2002) 2303-2316.

- [40] J.C. Antoine, E. Prina, T. Lang, N. Courret, The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages, Trends in microbiology, 6 (1998) 392-401. 18
- [41] N. Moradin, A. Descoteaux, *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages, Frontiers in cellular and infection microbiology, 2 (2012) 121.
- [42] D.L. Tolson, S.J. Turco, T.W. Pearson, Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*, Infection and immunity, 58 (1990) 3500-3507.
- [43] R. Lodge, T.O. Diallo, A. Descoteaux, *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane, Cellular microbiology, 8 (2006) 1922-1931.
- [44] A.F. Vinet, M. Fukuda, S.J. Turco, A. Descoteaux, The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V, PLoS pathogens, 5 (2009) e1000628.
- [45] M. Desjardins, A. Descoteaux, Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan, The Journal of experimental medicine, 185 (1997) 2061-2068.
- [46] A. Holm, K. Tejle, K.E. Magnusson, A. Descoteaux, B. Rasmusson, *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation, Cellular microbiology, 3 (2001) 439-447.
- [47] V. Bahr, Y.D. Stierhof, T. Ilg, M. Quinten, P. Overath, Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*, Molecular and biochemical parasitology, 58 (1993) 107-121.
- [48] H. Denise, K. McNeil, D.R. Brooks, J. Alexander, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo, Infection and immunity, 71 (2003) 3190-3195.
- [49] I. Abu-Dayyeh, K. Hassani, E.R. Westra, J.C. Mottram, M. Olivier, Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions, Infection and immunity, 78 (2010) 2438-2445.
- [50] P. Cameron, A. McGachy, M. Anderson, A. Paul, G.H. Coombs, J.C. Mottram, J. Alexander, R. Plevin, Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF- κ B signaling pathway, J Immunol, 173 (2004) 3297-3304.
- [51] P.A. Casgrain, C. Martel, W.R. McMaster, J.C. Mottram, M. Olivier, A. Descoteaux, Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression, PLoS pathogens, 12 (2016) e1005658.
- [52] M.A. Gomez, I. Contreras, M. Halle, M.L. Tremblay, R.W. McMaster, M. Olivier, *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases, Science signaling, 2 (2009) ra58.
- [53] J. Blanchette, N. Racette, R. Faure, K.A. Siminovitch, M. Olivier, *Leishmania* induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are

associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation, European journal of immunology, 29 (1999) 3737-3744.

[54] A. Martiny, J.R. Meyer-Fernandes, W. de Souza, M.A. Vannier-Santos, Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes, Molecular and biochemical parasitology, 102 (1999) 1-12. 19

[55] I. Abu-Dayyeh, M.T. Shio, S. Sato, S. Akira, B. Cousineau, M. Olivier, *Leishmania* induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif, PLoS neglected tropical diseases, 2 (2008) e305.

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

[57] M. Olivier, D.J. Gregory, G. Forget, Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view, Clinical microbiology reviews, 18 (2005) 293-305.

[58] D.J. Gregory, M. Godbout, I. Contreras, G. Forget, M. Olivier, A novel form of NFkappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression, European journal of immunology, 38 (2008) 1071-1081.

[59] A. Isnard, J.G. Christian, M. Kodiha, U. Stochaj, W.R. McMaster, M. Olivier, Impact of *Leishmania* infection on host macrophage nuclear physiology and nucleopore complex integrity, PLoS pathogens, 11 (2015) e1004776.

[60] G. Forget, D.J. Gregory, L.A. Whitcombe, M. Olivier, Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production, Infection and immunity, 74 (2006) 6272-6279.

[61] G. Arango Duque, M. Fukuda, A. Descoteaux, Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages, J Immunol, 190 (2013) 1737-1745.

[62] G. Arango Duque, M. Fukuda, S.J. Turco, S. Stager, A. Descoteaux, *Leishmania* promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI, J Immunol, 193 (2014) 2363-2372.

[63] D. Zilberstein, M. Shapira, The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites, Annual review of microbiology, 48 (1994) 449-470.

[64] K.S. Ali, R.C. Rees, C. Terrell-Nield, S.A. Ali, Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to *Leishmania mexicana*, Parasite immunology, 35 (2013) 441-456.

[65] D.I. Lacerda, L. Cysne-Finkelstein, M.P. Nunes, P.M. De-Luca, S. Genestra Mda, L.L. Leon, M. Berredo-Pinho, L. Mendonca-Lima, D.C. Matos, M.A. Medeiros, S.C. Mendonca, Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 107 (2012) 238-245.

[66] D.C. Matos, L.A. Faccioli, L. Cysne-Finkelstein, P.M. Luca, S. Corte-Real, G.R. Armoa, E.M. Lemes, D. Decote-Ricardo, S.C. Mendonca, Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis*

and its surface expression increases during metacyclogenesis, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105 (2010) 341-347.

[67] S.C. de Mendonca, L. Cysne-Finkelstein, D.C. Matos, Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*, *Frontiers in immunology*, 6 (2015) 524.

[68] J.L. Wanderley, M.E. Moreira, A. Benjamin, A.C. Bonomo, M.A. Barcinski, Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of 20 amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts, *J Immunol*, 176 (2006) 1834-1839.

[69] A.S. Hey, T.G. Theander, L. Hviid, S.M. Hazrati, M. Kemp, A. Kharazmi, The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells, *J Immunol*, 152 (1994) 4542-4548.

[70] D. Matheoud, N. Moradin, A. Bellemare-Pelletier, M.T. Shio, W.J. Hong, M. Olivier, E. Gagnon, M. Desjardins, A. Descoteaux, *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8, *Cell host & microbe*, 14 (2013) 15-25.

[71] M. Martinez-Lopez, S. Iborra, R. Conde-Garrosa, D. Sancho, Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania major* infection in mice, *European journal of immunology*, 45 (2015) 119-129.

[72] D. Ashok, S. Schuster, C. Ronet, M. Rosa, V. Mack, C. Lavanchy, S.F. Marraco, N. Fasel, K.M. Murphy, F. Tacchini-Cottier, H. Acha-Orbea, Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection, *European journal of immunology*, 44 (2014) 1422-1432.

[73] P.M. Kaye, N.J. Rogers, A.J. Curry, J.C. Scott, Deficient expression of costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages, *Eur J Immunol*, 24 (1994) 2850-2854.

[74] K.A. Campbell, P.J. Ovendale, M.K. Kennedy, W.C. Fanslow, S.G. Reed, C.R. Maliszewski, CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*, *Immunity*, 4 (1996) 283-289.

[75] S. Martin, R. Agarwal, G. Murugaiyan, B. Saha, CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection, *J Immunol*, 185 (2010) 551-559.

[76] B. Saha, G. Das, H. Vohra, N.K. Ganguly, G.C. Mishra, Macrophage-T cell interaction in experimental visceral Leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity, *European journal of immunology*, 25 (1995) 2492-2498.

[77] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R.W. Peeling, J. Alvar, M. Boelaert, Visceral Leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?, *Nature reviews. Microbiology*, 5 (2007) 873-882.

[78] K. Aoun, A. Bourabtine, Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review, *Parasite*, 21 (2014) 14.

[79] A.C. Marette-Mira, K.M. de Pinho Rodrigues, M.P. de Oliveira-Neto, C. Pirmez, N. Craft, MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal Leishmaniasis, *Acta tropica*, 119 (2011) 160-164.

- [80] G.D. Melo, N.R. Marangoni, M. Marcondes, V.M. Lima, G.F. Machado, High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: a preliminary report, *Vet J*, 188 (2011) 243-245.
- [81] R. Choudhury, P. Das, T. De, T. Chakraborti, 115 kDa serine protease confers sustained protection to visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* via IFNgamma induced down-regulation of TNF-alpha mediated MMP-9 activity, *Immunobiology*, 218 (2013) 114-126.
- [82] R. Choudhury, P. Das, S.K. Bhaumik, T. De, T. Chakraborti, In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in 21 *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate, *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 17 (2010) 660-667.
- [83] J.D. Costa, A.C. Nogueira de Melo, A.B. Vermelho, N. Meirelles Mde, R. Porrozzi, In vitro evidence for metallopeptidase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages, *Acta tropica*, 106 (2008) 175-183.
- [84] G.F. Machado, G.D. Melo, O.C. Moraes, M.S. Souza, M. Marcondes, S.H. Perri, R.O. Vasconcelos, Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral Leishmaniasis, *Veterinary immunology and immunopathology*, 136 (2010) 340-345.
- [85] A.C. Maretti-Mira, M.P. de Oliveira-Neto, A.M. Da-Cruz, M.P. de Oliveira, N. Craft, C. Pirmez, Therapeutic failure in American cutaneous Leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression, *Clinical and experimental immunology*, 163 (2011) 207-214.
- [86] M.S. Agren, U. Mirastschijski, T. Karlsmark, U.K. Saarialho-Kere, Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds, *Experimental dermatology*, 10 (2001) 337-348.
- [87] F.A. de Oliveira, C. Vanessa Oliveira Silva, N.P. Damascena, R.O. Passos, M.S. Duthie, J.A. Guderian, A. Bhatia, T.R. de Moura, S.G. Reed, R.P. de Almeida, A.R. de Jesus, High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral Leishmaniasis, *BMC infectious diseases*, 13 (2013) 331.

ANNEXE III - Co-auteur

1 *Leishmania major* Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63

Le promastigote de *Leishmania major* évite la phagocytose associée à LC3 par l'activité de GP63

Auteurs:

Christine Matte¹, Pierre-André Casgrain¹, Olivier Séguin¹, Neda Moradin¹, Wan Jin Hong², Albert Descoteaux¹

1. Institut National de la Recherche Scientifique - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Qc, Canada H7V 1B7

2. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian, People's Republic of China, Institute of Molecular Cell Biology, Singapore, Singapore

Titre du journal:

PLoS Pathogens

Publié le 9 juin 2016

DOI: [10.1371/journal.ppat.1005690](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005690)

Contribution des auteurs:

Les expériences ont été conçues par CM, OS, PAC, AD et faite par CM, OS, PAC et NM. Les résultats ont été analysés par CM, OS, PAC et NM. WJH a contribué des réactifs/matériaux/outils d'analyse. L'article a été écrit par CM et AD.

Responsable de la figure démontrant la survie de *Leishmania major* GLC94 en absence de VAMP8.

1. 1 Abstract

The protozoan *Leishmania* parasitizes macrophages and evades the microbicidal consequences of phagocytosis through the inhibition of phagolysosome biogenesis. In this study, we investigated the impact of this parasite on LC3-associated phagocytosis, a non-canonical autophagic process that enhances phagosome maturation and functions. We show that whereas internalization of *L. major* promastigotes by macrophages promoted LC3 lipidation, recruitment of LC3 to phagosomes was inhibited through the action of the parasite surface metalloprotease GP63. Reactive oxygen species generated by the NOX2 NADPH oxidase are necessary for LC3-associated phagocytosis. We found that *L. major* promastigotes prevented, in a GP63-dependent manner, the recruitment of NOX2 to phagosomes through a mechanism that does not involve NOX2 cleavage. Moreover, we found that the SNARE protein VAMP8, which regulates phagosomal assembly of the NADPH oxidase NOX2, was down-modulated by GP63. In the absence of VAMP8, recruitment of LC3 to phagosomes containing GP63-deficient parasites was inhibited, indicating that VAMP8 is involved in the phagosomal recruitment of LC3. These findings reveal a role for VAMP8 in LC3-associated phagocytosis and highlight a novel mechanism exploited by *L. major* promastigotes to interfere with the host antimicrobial machinery.

1. 1. 1 Author Summary

The early events surrounding and following the phagocytosis of pathogens largely determine whether internalization will lead to efficient killing of the microbe or successful establishment of an intracellular infection. Growing evidence supports the notion that the autophagy machinery lends a hand to phagocytosis in eliminating intracellular pathogens, in a process known as LC3-associated phagocytosis (LAP). Protozoan parasites of the *Leishmania* genus use surface virulence factors such as lipophosphoglycan and the metalloprotease GP63 to interfere with phagolysosome biogenesis and sabotage macrophage antimicrobial functions. Here, we provide the first evidence that *L. major* promastigotes evade LAP in a GP63-dependent manner and uncover a novel role for the membrane fusion mediator VAMP8 in LAP. Our findings offer a better understanding of *Leishmania* pathogenesis and of the mechanism behind LAP.

1. 2. Introduction

Phagocytosis plays a central role in linking innate and adaptive immunity [1, 2]. During this process, pathogens are internalized in a vacuole, the phagosome, which engages in a maturation program involving sequential interactions with various cellular compartments [1]. These interactions lead to the acidification of the phagosome and the acquisition of an array of hydrolases, culminating in the generation of a microbicidal phagolysosome. Peptides generated through the degradation of microbial antigens are processed in the phagolysosome, loaded on MHC molecules, and transported to the cell surface to initiate an adaptive immune response [1, 3, 4]. Phagolysosome biogenesis thus represents an important means of controlling infections, but several pathogenic microorganisms have evolved mechanisms to subvert this process and cause disease [5]. Upon their internalization by host phagocytes, promastigote forms of the protozoan parasite *Leishmania* turn off key antimicrobial and immune functions through the inhibition of phagolysosome biogenesis [6, 7]. The promastigote surface glycolipid lipophosphoglycan (LPG) plays a major role in this inhibition by disrupting phagosomal lipid microdomains [8– 10]. Recent evidence indicates that the glycophosphatidylinositol (GPI)-anchored zinc-dependent metalloprotease GP63 also contributes to the *Leishmania*-induced phagosomal remodeling [7, 11]. Hence, during phagocytosis, GP63 is released from the parasite and rapidly gains access to various intracellular compartments where it cleaves a number of regulators of macrophage function [7, 11–16], including regulators of membrane fusion [7, 15]. One such molecule is the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor (SNARE) Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8), which we recently showed to control the early recruitment of the NADPH oxidase (NOX2) to phagosomes [7]. Targeting of VAMP8 through GP63 enables *Leishmania* promastigotes to inhibit assembly of the NOX2 complex on phagosomes, thereby impairing the ability of infected cells to process antigens for cross-presentation and to activate T cells [7, 17]. A non-canonical autophagic pathway termed LC3-associated phagocytosis (LAP) was recently shown to enhance the antimicrobial activity of macrophages by linking the autophagy pathway to phagocytosis [18–22]. This process, which is characterized by the recruitment of the autophagy-related protein LC3 to phagosomes, occurs during the internalization of particles that engage various receptors, including TLRs, FcR, TIM4, and Dectin-1 [18, 23–25].

Although the impact of LC3 recruitment on phagosomal functions remains to be fully elucidated, previous studies revealed that LAP enhances phagosome maturation and microbial killing [18, 23], as well as MHC class II-mediated antigen presentation [25]. One of the hallmarks of LAP is the requirement for reactive oxygen species (ROS) generated by NOX2 for LC3 recruitment to phagosomes [23]. Given the ability of *Leishmania* to interfere with assembly of the NOX2 complex during phagocytosis [7, 26], we sought to investigate the impact of *Leishmania* infection on LAP. Here, we provide evidence that *Leishmania* promastigotes evade LAP through a mechanism involving GP63-mediated cleavage of VAMP8 and exclusion of NOX2 from phagosomes.

1. 3. Results

1. 3. 1 *L. major* promastigotes impair the recruitment of LC3 to phagosomes in a GP63-dependent manner

Growing evidence suggests that LAP contributes to augmenting the microbicidal and immune functions of phagosomes [18, 21–23, 25]. Given the ability of *Leishmania* promastigotes to interfere with phagolysosomal biogenesis, we sought to investigate the impact of *Leishmania* promastigotes on LAP during their internalization by macrophages. Because the GPI-anchored zinc-metalloprotease GP63 interferes with phagolysosomal biogenesis and function [7, 11], it was of interest to determine the potential impact of this molecule on LAP. To this end, we included a *L. major* GP63-deficient mutant (Δ gp63) and its complemented counterpart (Δ gp63 +gp63) in our study. Recruitment of LC3 to membranes requires the lipidation of cytosolic LC3-I to form membrane-bound LC3-II [27]. We first assessed by Western blot whether internalization of *L. major* promastigotes led to the lipidation of LC3 in bone marrow-derived macrophages (BMM). We observed that WT parasites induced a rapid and transient conversion of LC3-I to LC3-II (Fig A3. 1A). Furthermore, GP63-expressing (WT and Δ gp63+gp63) and Δ gp63 parasites promoted conversion of LC3-I to LC3-II to a similar extent (Fig A3. 1B), indicating that GP63 is not responsible for this conversion. In addition, expression of the autophagic cargo receptor sequestosome (p62/SQSTM1) increased with time upon infection independently of GP63 (Fig A3. 1C) and was sensitive to cycloheximide. We next determined whether internalization of *L. major* promastigotes was accompanied by the recruitment of LC3 to phagosomes.

To this end, we incubated macrophages with WT, Δ gp63, or Δ gp63+gp63 promastigotes and we examined the intracellular distribution of LC3 by confocal immunofluorescence microscopy. We detected LC3 on less than 10% of phagosomes containing WT promastigotes (Fig A3. 2A and A3. 2B). By contrast, we detected LC3 on a significantly higher percentage (~20%) of phagosomes containing Δ gp63 parasites (Fig 2A and 2B). As expected, phagosomes containing the Δ gp63 +gp63 parasites were similar to WT phagosomes with respect to the presence of LC3. In all cases, the optimal time point for the recruitment of LC3 to phagosomes containing *Leishmania* promastigotes was 1 hour after the initiation of phagocytosis. Recruitment of LC3 to phagosomes was previously shown to be preceded by recruitment of Beclin-1 [18] and was shown to be involved in LAP of *Burkholderia pseudomallei* [28]. In the case of *L. major*, we did not detect recruitment of Beclin-1 to phagosomes (Fig A3. 2C). Collectively, these results suggest that *L. major* promastigotes interfere with recruitment of LC3 to phagosomes through a GP63-dependent mechanism.

1. 3. 2 *Leishmania major* promastigotes block the recruitment of NOX2 to phagosomes in a GP63-dependent manner

During LAP, LC3 is recruited to phagosomes in a NOX2-dependent manner [23, 25]. To elucidate the mechanism by which GP63 contributes to the impairment of this process, we first assessed the ability of WT, Δ gp63, and Δ gp63+gp63 promastigotes to activate the production of intracellular ROS in BMM. All three lines activated ROS production, although Δ gp63 induced lower levels than GP63-expressing parasites (Fig A3. 3A and A3. 3B). We next determined whether conversion of LC3-I to LC3-II induced by *L. major* promastigotes was mediated by ROS generated by NOX2. Fig A3. 3C shows that treatment of BMM with the NOX2 inhibitor diphenylene iodonium (DPI) inhibited conversion of LC3-I to LC3-II by WT parasites. Together, these data indicate that *L. major* promastigotes activate conversion of LC3-I to LC3-II through the activation of NOX2, independently of the presence of GP63. Importantly, inhibition of NOX2 activity with DPI reduced the recruitment of LC3 to phagosomes containing Δ gp63 promastigotes to the levels observed for phagosomes containing WT parasites (Fig A3. 3D).

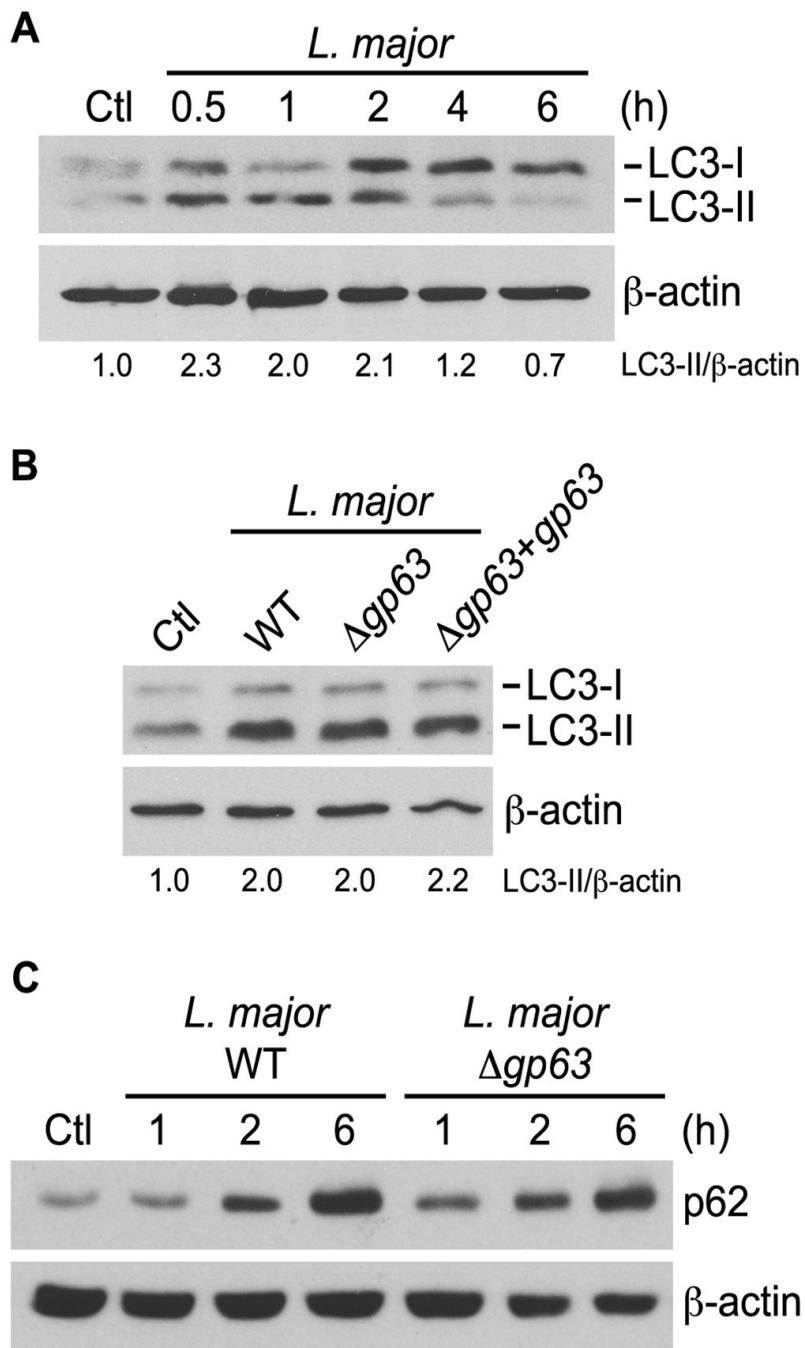


Figure A3. 1 Infection with *L. major* promotes LC3 conversion and p62 expression.

(A) Kinetics of LC3-I to LC3-II conversion induced by opsonized *L. major* NIH S promastigotes in BALB/c BMM was assessed by immunoblot analysis. (B) LC3-I and LC3-II levels in BALB/c BMM infected for 1 h with opsonized WT, Δ gp63 or Δ gp63+gp63 *L. major* NIH S promastigotes was assessed by immunoblot analysis. (A, B) LC3-II band intensities were measured by spot densitometry, normalized to the β -actin loading control and compared to the uninfected control (Ctl) cells. (C) Kinetics of p62 accumulation in BALB/c BMM infected with opsonized WT or Δ gp63 *L. major* NIH S promastigotes was assessed by immunoblot analysis.

These results are consistent with the role of NOX2 in the recruitment of LC3 to phagosomes during LAP [23, 25]. We next determined whether the inhibition of LC3 recruitment to phagosomes containing *Leishmania* promastigotes was associated to a defective phagosomal recruitment of NOX2 ($gp91^{phox}$). We infected macrophages with WT, $\Delta gp63$, or $\Delta gp63+gp63$ promastigotes and assessed the phagosomal association of $gp91^{phox}$ by confocal immunofluorescence microscopy. Zymosan was used as a positive control for the recruitment of $gp91^{phox}$. As shown in Fig A3. 4A and A3. 4B, we detected $gp91^{phox}$ on nearly 40% of phagosomes containing zymosan and 35% of phagosomes containing $\Delta gp63$ parasites. In contrast, $gp91^{phox}$ was present on approximately 15% of phagosomes containing WT or $\Delta gp63+gp63$ parasites. Given that GP63 cleaves a number of macrophage proteins [29], we next verified whether $gp91^{phox}$ was targeted by GP63.

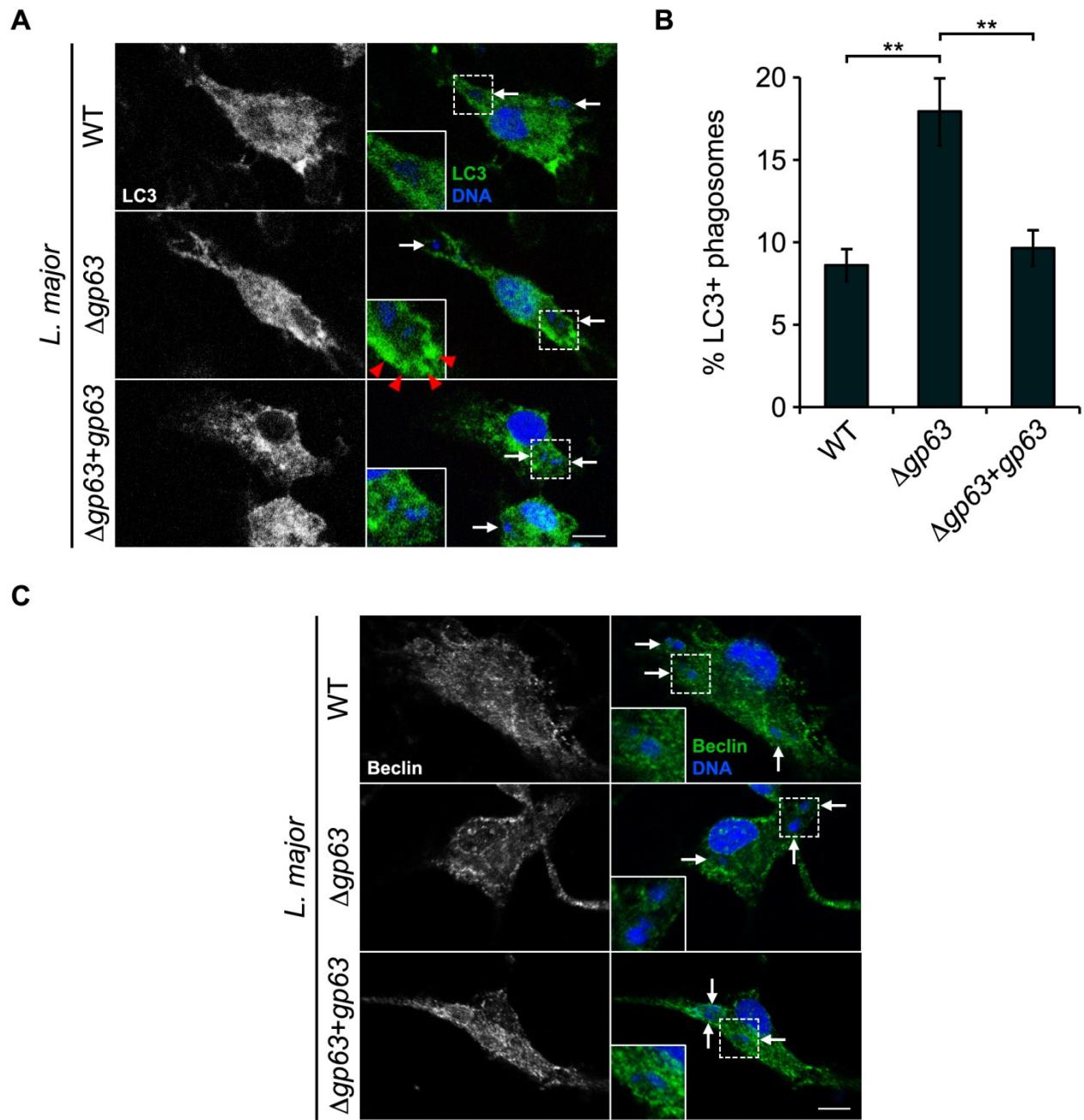


Figure A3. 2 *L. major* GP63 prevents LC3 recruitment to phagosomes

(A, C) Confocal microscopy images of BALB/c BMM infected for 1 h with opsonized WT, Δgp63 , or $\Delta\text{gp63+gp63}$ *L. major* NIH S promastigotes. LC3 (A) and Beclin (C) are in green; nuclei are in blue. White arrows indicate parasite nuclei; red-filled arrowheads point to LC3 recruitment (A). Scale bar, 5 μM . (B) Quantification of LC3-positive phagosomes at 1 h after infection. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of values from three independent experiments. ** $p<0.01$.

Western blot analyses on lysates from macrophages infected with WT, Δ gp63, or Δ gp63+gp63 promastigotes showed that gp91^{phox} remained intact in infected cells (Fig A3. 4C). Collectively, these results indicate that GP63 enables *L. major* promastigotes to prevent recruitment of NOX2 to phagosomes through a mechanism that does not involve its cleavage.

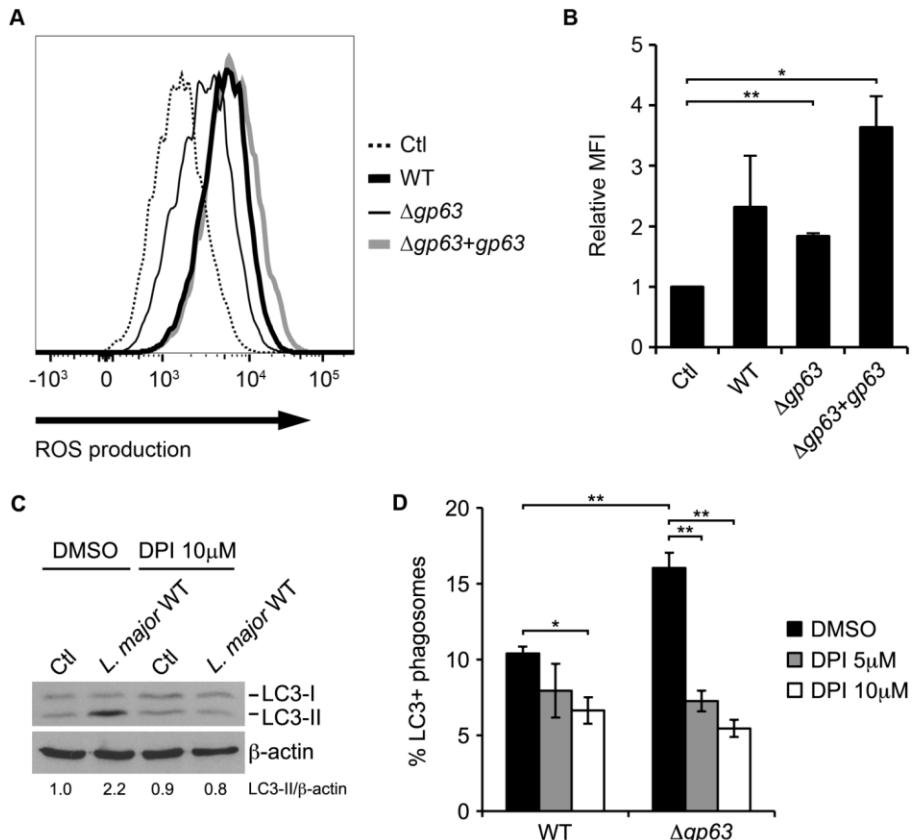


Figure A3. 3 *L. major* promastigote induced ROS production is required for LC3 recruitment to the phagosome

(A, B) Total ROS levels in C57BL/6 x 129 BMM infected for 30 min with opsonized WT, Δ gp63, or Δ gp63+gp63 *L. major* NIH S promastigotes were measured by flow cytometry using CellROX Deep Red Reagent. (A) Representative histograms are shown. (B) Quantification of the mean fluorescence intensity (MFI) of each condition relative to the uninfected control is shown. Data are presented as the mean \pm SEM of values from two independent experiments. (C) LC3-I and LC3-II levels in C57BL/6 x 129 BMM infected for 1 h with opsonized WT *L. major* NIH S promastigotes, in the presence of 10 μ M DPI or of vehicle drug (0.1% DMSO), were assessed by immunoblot analysis. LC3-II band intensities were measured by spot densitometry, normalized to the β -actin loading control and compared to the uninfected control (Ctl) cells cultured in the presence of DMSO. (D) Quantification of LC3-positive phagosomes in BALB/c BMM infected with opsonized *L. major* promastigotes NIH S (WT or Δ gp63) for 1 h, in the presence of 5 or 10 μ M DPI or of vehicle drug (0.1% DMSO). Data are presented as the mean \pm SEM of values from triplicate samples. *p<0.05, **p<0.01.

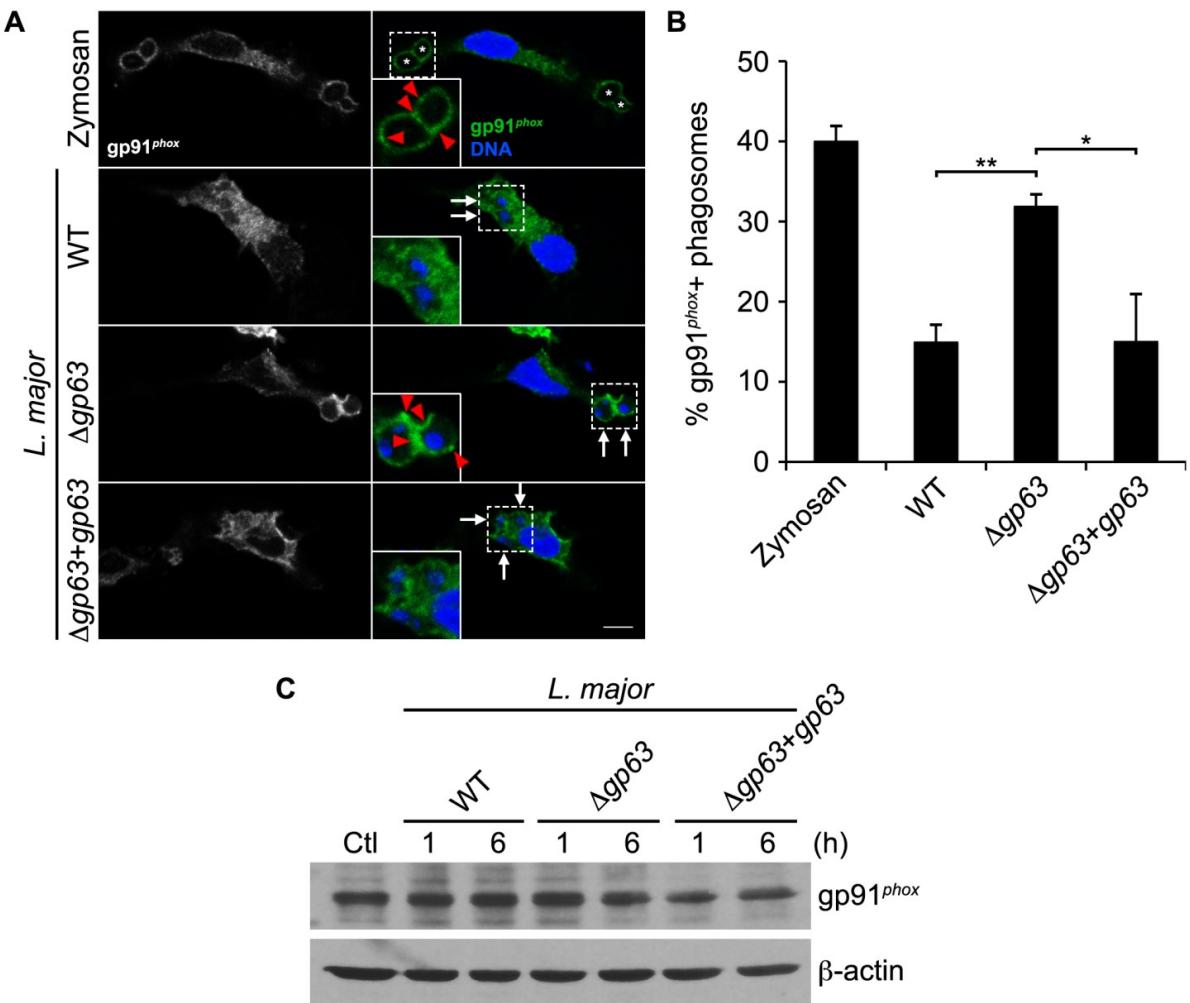


Figure A3. 4 *L. major* GP63 inhibits gp91^{phox} recruitment to the phagosome

(A) Confocal microscopy images of C57BL/6 peritoneal exudate macrophages (PEM) fed zymosan particles or infected with opsonized WT, Δgp63, or Δgp63+gp63 *L. major* NIH S promastigotes for 15 min. gp91^{phox} is in green; nuclei are in blue. Asterisks indicate phagosomes containing zymosan particles, white arrows indicate parasite nuclei, and red-filled arrowheads point to gp91^{phox} recruitment. Scale bar, 5 μM. (B) Quantification of gp91^{phox}-positive phagosomes at 15 min after infection. Data are presented as the mean ± SEM of values from three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01. (C) gp91^{phox} levels in lysates from BALB/c BMM infected with opsonized WT, Δgp63 or Δgp63+gp63 *L. major* NIH S promastigotes.

1. 3. 3 VAMP8 contributes to the recruitment of LC3 to phagosomes containing *L. major*

We recently showed that VAMP8 regulates the phagosomal recruitment of NOX2 and that *Leishmania* promastigotes cleave and exclude VAMP8 from phagosomes in a GP63-dependent manner [7]. These observations suggested that the GP63-dependent cleavage and exclusion of VAMP8 from phagosomes containing *L. major* promastigotes (Figs A3. 5A–5C, A3S. 1) may be responsible for the impairment of LAP. To test this hypothesis, we used BMM from VAMP8 null mice. We first assessed the impact of VAMP8 on the recruitment of LC3 to phagosomes. In WT BMM, we observed a two-fold decrease in the recruitment of LC3 to phagosomes containing WT or Δgp63+gp63 promastigotes compared to phagosomes containing Δgp63 parasites (Fig A3. 6A and A3. 6B).

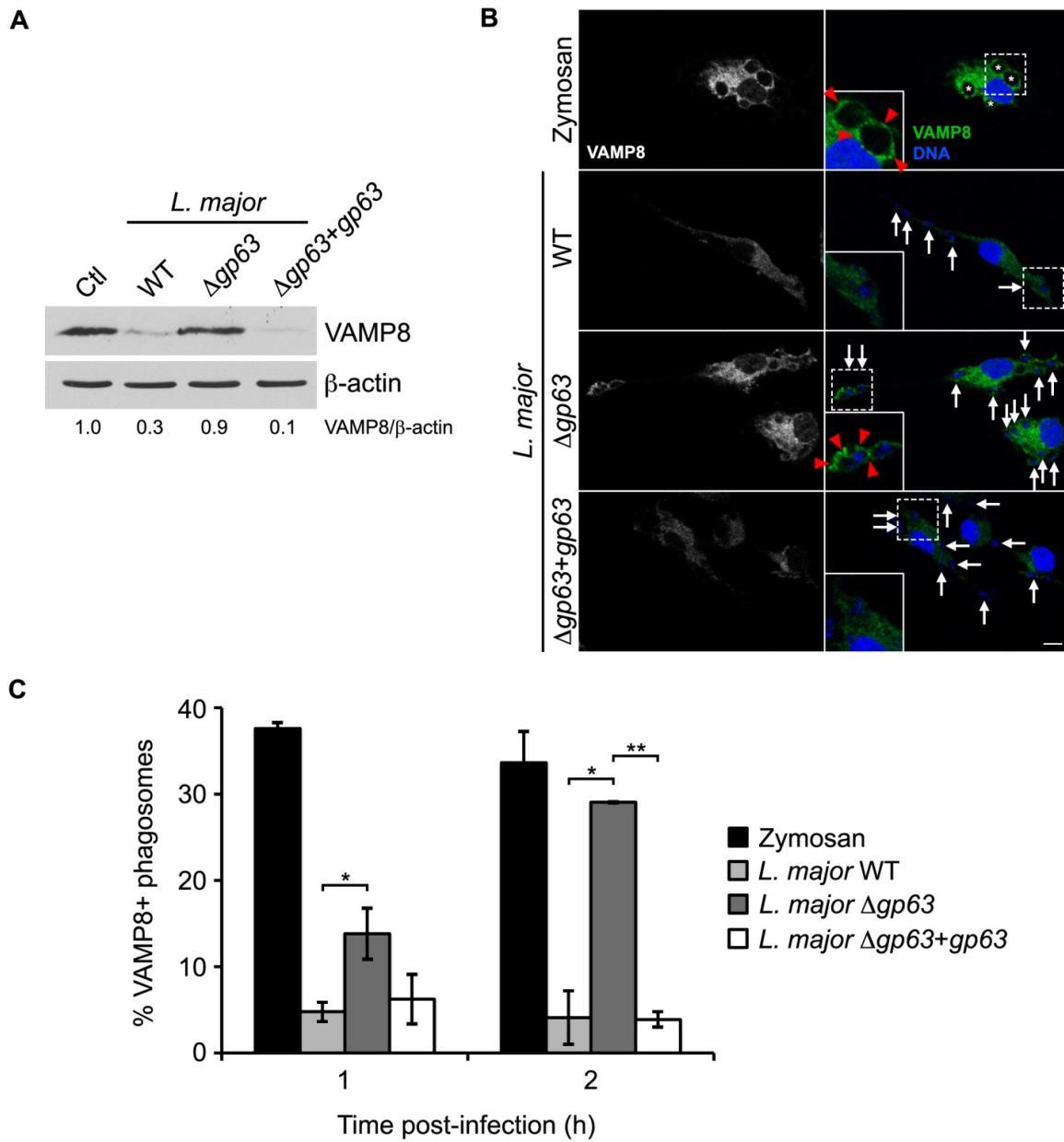


Figure A3. 5 *L. major* GP63 cleaves VAMP8 and prevents its recruitment to phagosomes

(A) VAMP8 cleavage in C57BL/6 x 129 BMM infected for 2 h with opsonized WT, Δgp63 or Δgp63+gp63 *L. major* NIH S promastigotes was assessed by immunoblot analysis. VAMP8 band intensities were measured by spot densitometry, normalized to the β-actin loading control and compared to the uninfected control (Ctl) cells. (B) Confocal microscopy images of C57BL/6 x 129 BMM fed zymosan particles or infected with opsonized WT, Δgp63, or Δgp63+gp63 *L. major* NIH S promastigotes for 1 h. VAMP8 is in green; nuclei are in blue. Asterisks indicate phagosomes containing zymosan particles, white arrows indicate parasite nuclei, and red-filled arrowheads point to VAMP8 recruitment. Scale bar, 5 μM. (C) Quantification of VAMP8-positive phagosomes at 1 and 2 h after infection. Data are presented as the mean ± SEM of values from triplicate samples of an experiment representative of more than three others. *p<0.05, **p<0.01

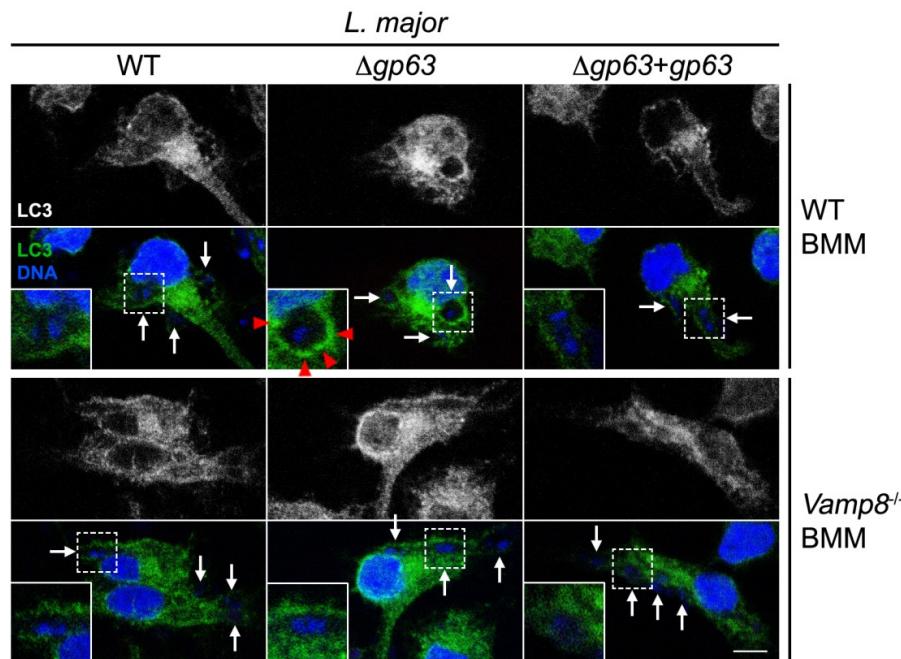
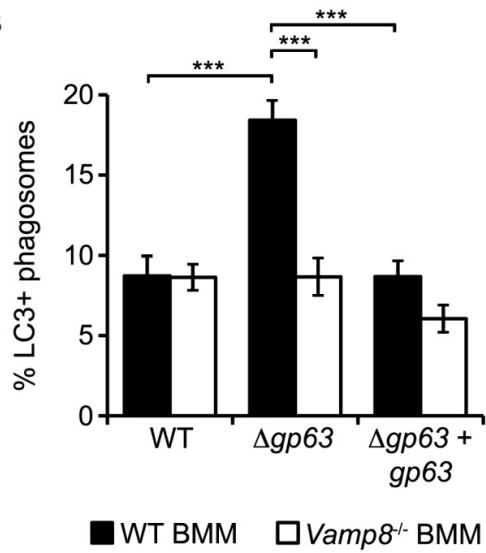
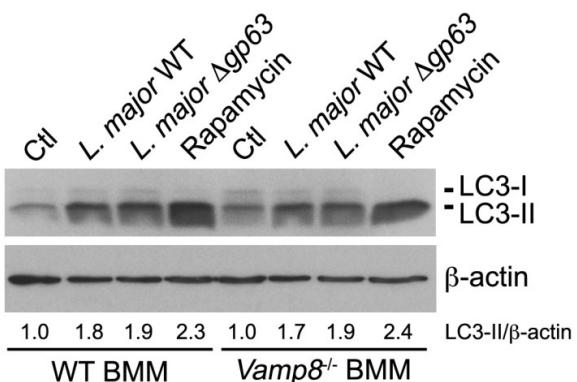
In contrast, in Vamp8^{-/-} BMM, the recruitment of LC3 to phagosomes containing Δgp63 was similar to that observed for phagosomes containing either WT or Δgp63+gp63 promastigotes and was comparable to the levels observed in WT BMM infected with WT parasites (Fig A3. 6A and A3. 6B). We ensured that VAMP8 was not required for *L. major*- or rapamycin-induced conversion of LC3-I to LC3-II (Fig A3. 6C). The non-pathogenic *L. tarentolae* species, which does not express a functional GP63 [30] and does not cleave VAMP8 [7], induced LC3 recruitment to the same extent as *L. major* Δgp63, further corroborating these results (Fig A3S. 2). Altogether, these results indicate that VAMP8 plays a role in LAP and suggest that *L. major* interferes with LAP through GP63-mediated targeting of VAMP8.

1. 3. 4 Absence of VAMP8 does not affect intracellular survival of *L. major* in macrophages

LAP was shown to restrict or contribute to the establishment of pathogens such as *Salmonella Typhimurium*, *Burkholderia pseudomallei*, *Aspergillus fumigatus*, and *Listeria monocytogenes* within their host cells [23, 31–33]. Given the involvement of VAMP8 in LAP, we evaluated the impact of VAMP8 on the control of *Leishmania* infection in macrophages. To this end, we infected WT and Vamp8^{-/-} BMM with *L. major* promastigotes and assessed parasite survival and replication over 96 h. As shown in Fig A3. 7A, *L. major* promastigotes were internalized to the same extent by WT and Vamp8^{-/-} BMM. Furthermore, we observed no differences in the survival and replication of *L. major* promastigotes in the absence of VAMP8 over 96 h, with the exception of a small but significant increase in parasite survival in Vamp8^{-/-} BMM at 24 h postinfection (Fig A3. 7A). Moreover, we observed no obvious differences in parasitophorous vacuole size and appearance in the absence of VAMP8 (Fig A3. 7B). These results are consistent with the ability of *L. major* to efficiently neutralize VAMP8 and prevent its recruitment to phagosomes through the action of GP63.

1. 4. Discussion

Establishment of an intracellular infection by *Leishmania* promastigotes is characterized by an inhibition of phagosome maturation and function [7, 8, 34, 35]. Whilst phagosome remodeling is mostly achieved through LPG-mediated disruption of lipid rafts [10, 36], recent evidence indicates that the *Leishmania* metalloprotease GP63 contributes to this process through cleavage of membrane fusion regulators [7, 11, 15]. In the present study, we provide evidence that *L. major* promastigotes evade LC3-associated phagocytosis, a non-canonical autophagic process normally involved in the elimination of pathogens through the enhancement of phagosome maturation [18, 23]. We showed that recruitment of the autophagy protein LC3 to phagosomes containing *L. major* promastigotes is impaired through GP63-mediated cleavage of VAMP8. These findings are consistent with the notion that targeting components of the host cell membrane fusion machinery contributes to the ability of *Leishmania* promastigotes to alter phagosomal properties and modulate host immune responses during the establishment of infection [7, 15]. ROS play a central role in the biology of phagocytes [32]. In addition to their key roles in microbial killing and antigen cross-presentation, ROS generated by NOX2 are necessary for LAP [23, 25]. Recruitment and activation of the NOX2 complex to phagosomes during LAP is a highly regulated process that is starting to be understood. The protein Rubicon was recently shown to be required for the recruitment of LC3 to phagosomes [33]. This protein facilitates sustained levels of phosphatidylinositol-3 phosphate on phagosomes and stabilizes the NOX2 complex for production of ROS [33]. The FYCO1 protein, which is involved in autophagosome trafficking, was shown to limit ROS production by phagosomes during Dectin-1-mediated phagocytosis and to facilitate the maturation of early p40^{phox}-positive phagosomes into LAMP1-positive phagosomes [37].

A**B****C****Figure A3.6 VAMP8 is essential for LC3 recruitment to *L. major* parasitophorous vacuoles**

(A) Confocal microscopy images of WT or *Vamp8^{-/-}* C57BL/6 x 129 BMM infected for 1 h with opsonized WT, $\Delta gp63$, or $\Delta gp63+gp63$ *L. major* NIH S promastigotes. VAMP8 is in green; nuclei are in blue. White arrows indicate parasite nuclei, and red-filled arrowheads point to VAMP8 recruitment. Scale bar, 5 μ M. (B) Quantificationn of LC3-positive phagosomes at 1 h after infection. Data are presented as the mean \pm SEM of values from three independent experiments. ***p<0.001. (C) LC3-I and LC3-II levels in WT and *Vamp8^{-/-}* BMM infected for 1 h with opsonized WT or $\Delta gp63$ *L. major* NIH S promastigotes or treated with 10 μ M rapamycin were assessed by immunoblot analysis. LC3-II band intensities were measured by spot densitometry, normalized to the β -actin loading control and compared to the uninfected, untreated control (Ctl) cells

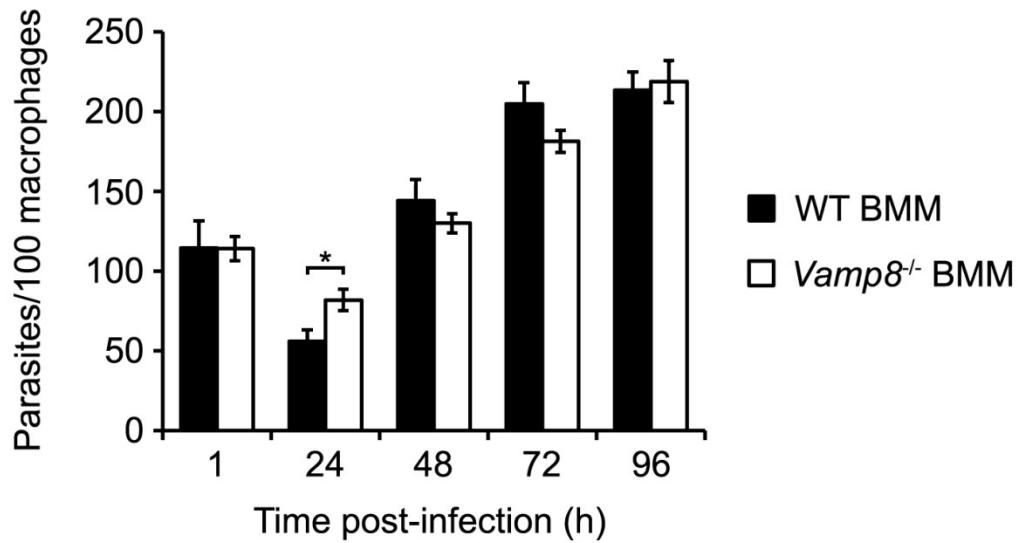
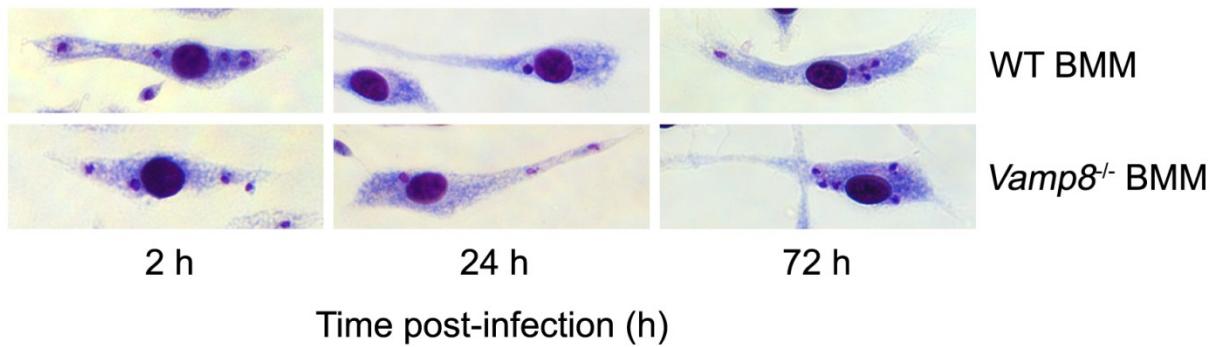
A**B**

Figure A3. 7 Absence of VAMP8 does not affect intracellular survival of *L. major* in macrophages

(A) Quantification of opsonized *L. major* GLC94 promastigotes internalization and replication in WT or *Vamp8*^{-/-} C57BL/6 x 129 BMM, assessed by Giemsa staining at 1, 24, 48, 72, and 96 h after infection. Data are presented as the mean ± SEM of values from three independent experiments. *p<0.05 (B) Images of Giemsa-stained WT or *Vamp8*^{-/-} BMM infected with opsonized *L. major* GLC94 for 2, 24, and 72h.

Here, we identified VAMP8 as a regulator of LC3 recruitment to phagosomes, consistent with the role of this SNARE in the phagosomal recruitment of NOX2 [7]. We found that activation of ROS production by *L. major* promastigotes is required for LC3 lipidation and, consistent with previous studies, we also found that inhibition of NOX2 impaired the recruitment of LC3 to phagosomes harboring *L. major*. Furthermore, *L. major* promastigotes efficiently excluded NOX2 from formed phagosomes in a GP63-dependent mechanism. However, this GP63-mediated exclusion of NOX2 from phagosomes did not involve its proteolytic cleavage. Rather, through the action of GP63 on VAMP8, the NOX2 complex is not assembled on phagosomes, precluding LC3 recruitment. It is interesting to note that the intracellular bacterium Legionella interferes with host autophagy by directly targeting LC3 through the action of the effector protein RavZ, a cysteine protease injected into the host cell cytosol via a type IV secretion system [38]. In the case of GP63, determining how this protease exits phagosomes is an important issue to resolve in order to understand how it cleaves its substrates, including VAMP8, within infected cells. Indeed, despite the absence of known secretion system in *Leishmania*, GP63 redistributes within infected cells in vesicular structures throughout the cytoplasm [7, 15], where it may come in close proximity of VAMP8 present on late endosomes and lysosomes. This issue is currently under investigation. The possible consequences of preventing phagosomal LC3 recruitment may be inferred from a recent study aimed at investigating the role of LC3 during Dectin-1-mediated phagocytosis in bone marrow-derived dendritic cells [25]. Hence, Dectin-1-triggered phagocytosis, ROS, microbial killing, and cytokine production in response to β -glucan particles were normal in the absence of LC3. On the other hand, absence of LC3 reduced the ability of dendritic cells to present antigen in the context of MHCII and to activate CD4 T cells. This was the consequence of a reduced ability of phagosomes to acquire MHCII molecules in the absence of LC3. Interestingly, the defect in antigen presentation observed in LC3-deficient dendritic cells is specific to MHC class II [25]. How LC3 influences MHC class II recruitment to maturing phagosomes is not yet known. Given that *Leishmania* alters the antigen-presenting and immunomodulatory functions of dendritic cells through multiple mechanisms [7, 39, 40], it may be complicated to assess to which extent the exclusion of LC3 from *L. major*-harboring PV contributes to the ability of these parasites to evade MHC class II-dependent antigen presentation.

Indeed, we recently showed that the *L. major* inhibits MHC class II antigen presentation in a GP63-dependent manner. This inhibition was not due to the cleavage of VAMP8 by GP63, since MHC class II presentation was not altered in Vamp8^{-/-} cells [7]. Of note, Crauwels and colleagues [41] investigated the fate of apoptotic *Leishmania* promastigotes in human macrophages. They observed that in contrast to viable parasites, the majority of apoptotic promastigotes were internalized in LC3-positive phagosomes. In our study, we detected less than 1% apoptotic parasites in the stationary phase promastigote populations we used to infect macrophages. Thus, in our experimental system, the absence of GP63 rather than a difference in the proportion of apoptotic promastigotes among WT, Δgp63, or Δgp63+gp63 parasites cultures is responsible for the increased proportion of LC3-positive phagosomes observed during the phagocytosis of *L. major* Δgp63 parasites. Whether the apoptotic *L. major* parasites populations used by Crauwels et al. contain less GP63 than the viable parasites is not known. The contribution of VAMP8 in LAP is consistent with its role in the recruitment of NOX2 to phagosomes [7]. However, our data do not exclude the possibility that VAMP8 could also be involved in the fusion between LC3-positive autophagosomes and phagosomes. Indeed, a role for VAMP8 in xenophagy has been described during the invasion of HeLa cells by group A Streptococcus (GAS) [42]. In that study, VAMP8 was shown to act in concert with another SNARE, Vti1b, to mediate the fusion of xenophagosomes with lysosomes and the recruitment of LC3 to the resulting compartments. Consistently, the bactericidal efficiency of HeLa cells was reduced in the absence of VAMP8 [42]. In the case of *Leishmania* promastigotes, we found that the absence of VAMP8 had no significant impact on the survival and replication of the parasite inside macrophages. Thus, as shown for *Candida albicans* [25], LAP may not play a significant role during the establishment of *L. major* infection within macrophages. This may be related to the fact that *Leishmania* promastigotes can efficiently target VAMP8 during the infection process. In sum, we discovered that *L. major* promastigotes evade LAP through the action of a metalloprotease, GP63, by excluding NOX2 from phagosomes, thereby highlighting a novel strategy exploited by an intracellular pathogen to interfere with the host antimicrobial machinery.

1. 5. Materials and Methods

1. 5. 1 Ethic statements

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the Canadian Council on Animal Care, and all animal work was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux of the Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier (protocol 1302-03). This protocol respects procedures on good animal practice provided by the Canadian Council on Animal Care (CCAC).

1. 5. 2 Macrophage culture

BMM were obtained from the femurs and tibias of 6- to 8-week-old female BALB/c (Charles River), C57BL/6 or Vamp8-/- mice and their wild type (WT) counterpart (on a mixed C57BL/6 x 129 genetic background) described elsewhere [43] and differentiated as previously described [44] in complete medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with glutamine (Thermo Fisher Scientific), containing 10% heat-inactivated, fetal bovine serum (FBS) (PAA laboratories Inc.), 10 mM HEPES pH 7.4 and penicillin-streptomycin), supplemented with 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium as a source of colony-stimulating factor-1 (CSF-1), in a 37°C incubator with 5% CO₂. BMM were made quiescent by culturing them in the absence of CSF-1 for 18 h prior to infection. Where indicated, BMM were treated for the indicated times with 10 µM rapamycin (Cayman Chemical Co.) as a positive control for autophagy induction or with 5 to 10 µM of the NADPH oxidase inhibitor DPI (Sigma-Aldrich). PEM were obtained from female C57BL/6 mice by peritoneal lavage 3 days after peritoneal injection of 3% (w/v) proteose-peptone and were maintained in complete medium. These macrophages were used to assess gp91^{phox} recruitment to phagosomes, as the detection of this molecule by confocal immunofluorescence microscopy was superior than in BMM.

1. 5. 3 Parasites and infections

Promastigotes of *L. major* NIH S (MHOM/SN/74/Seidman) clone A2 and *L. major* GLC94 (MHOM/TN/95/GLC94 zymodeme MON25) were cultured at 26°C in *Leishmania* medium (M199 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 µM hypoxanthine, 10 mM HEPES, 5 µM hemin, 3 µM biopterin, 1 µM biotin, and penicillin-streptomycin). The *L. major* NIH clone A2 isogenic Δgp63 mutant and its complemented counterpart Δgp63+gp63 have been previously described [45]. Cultures of Δgp63+gp63 promastigotes were supplemented with 50 µg/ml G418. For BMM infections, promastigotes were used at the late stationary phase of growth. Complement opsonization of promastigotes and zymosan particles was performed prior to phagocytosis by incubating the particles in phosphate-buffered saline (PBS) containing 10% mouse serum for 30 min at 37°C. BMM were then incubated at 37°C with promastigotes (parasite-to-macrophage ratio of 15:1) or zymosan particles (ratio of 5:1) for the indicated times. Infection levels were assessed by microscopic examination of infected cells after Giemsa staining with the Hema 3 system (Fisher Scientific).

1. 5. 4 Western blotting

Adherent BMM were washed with ice-cold PBS containing 1 mM Na3VO4 and lysed in 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40, containing complete protease inhibitors (Roche Applied Science) and phosphatase inhibitors (1 mM Na3VO4, 50 mM NaF, 1.5 mM EGTA and 10 mM Na4P2O7). When assessing GP63-mediated cleavage of host proteins, the zinc chelator 1,10-phenanthroline (Sigma-Aldrich) [46] was added to the lysis buffer, at a concentration of 10 mM, to ensure that the observed proteolytic cleavage occurs during the infection process rather than during sample preparation. Insoluble material was removed by centrifugation for 10 min at 4°C and protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay kit (Pierce). For LC3 conversion analysis, cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Na deoxycholate and 1% NP-40) containing protease and phosphatase inhibitors and whole cell extracts were briefly sonicated before insoluble material was removed by centrifugation for 10 min at 4°C.

Samples were separated by SDS-PAGE on 6 to 15% polyacrylamide gels and then transferred to Hybond-LFP PVDF membranes (LC3) or Hybond-ECL nitrocellulose membranes (GE Healthcare Life Sciences) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell apparatus (BioRad). Membranes were blocked with 5% BSA and incubated with the relevant antibodies. For immunodetection, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG and the enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagents from GE Healthcare Life Sciences were used. The rabbit polyclonal antibody against LC3B was purchased from Novus Biologicals. Rabbit polyclonal antiserum against VAMP8 was from Synaptic Systems. Mouse monoclonal antibodies against p62 (2C11), gp91^{phox} (clone 53), and β-actin (A5316) were purchased from Abnova Corporation, BD Transduction Laboratories, and Sigma-Aldrich, respectively. When indicated, radiographic films were scanned with the AlphaImager 3400 imaging system (Alpha Innotech Corporation), which is equipped with a 12-bit CCD camera and generates high-resolution, 16-bit files. All images were free of pixel saturation. Band intensities in each condition were quantified by spot densitometry, normalized to their respective β-actin loading control and compared to the uninfected, untreated control.

1. 5. 5 Confocal immunofluorescence microscopy

BMM were seeded in 24-well plates containing microscope coverslips (Fisher Scientific) and infected with *L. major* promastigotes or fed zymosan particles for the indicated times. Assessment of the phagosomal recruitment of gp91^{phox} was performed with PEM, as the signal was superior to the signal obtained with BMM. Cells were washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 10 min and then simultaneously blocked and permeabilized in 0.1% Triton X-100, 1% bovine serum albumin, 20% normal goat serum, 6% non-fat dry milk and 50% FBS for 20 min. Cells were incubated for 1h to 2h with antibodies against LC3B (1:200), Beclin1 (rabbit polyclonal, Abcam; 1:300), gp91^{phox} (1:70), or VAMP8 (1:100). AlexaFluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (1:500, Thermo Fisher Scientific) was used for 30 min, during which time macrophage and promastigote nuclei were stained with DRAQ5 (1:400, BioStatus Ltd.). Coverslips were washed three times with PBS between incubations and all steps were performed at room temperature.

Coverslips were then mounted on Fluoromount-G (SouthernBiotech) and sealed with nail polish. Analyses of LC3 distribution were performed with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad Laboratories) installed on an Eclipse E800 microscope, using an argon/krypton laser at 488 nm with a Plan Apo Nikon 60X (NA 1.4) oil immersion lens for LC3 fluorescence and a 638 nm diode laser at 650 nm long-pass with a Plan Apo Nikon 60x (NA 1.4) oil immersion lens for DRAQ5 fluorescence. Images were acquired in the normal scanning mode with a Kalman filter of 3 to 6 using the LaserSharp software. Analyses for Beclin, gp91^{phox} and VAMP8 were performed with a Plan APOCHROMAT 63x oil-immersion DIC 1.4NA objective on a Zeiss LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss Microimaging) equipped with 30 mW 405 nm diode laser, 25mW 458/ 488/514 argon multiline laser, 20mW DPSS 561 nm laser and 5mW HeNe 633 nm laser and mounted on a Zeiss Axio Observer Z1. Images were acquired in plane scanning mode and were minimally and equally processed using Carl Zeiss ZEN 2012 software. For all experiments, a minimum of 100 phagosomes per coverslip were examined for every experimental condition, each performed in duplicates or triplicates, as indicated. Experiments were repeated the indicated number of times prior to statistical analysis

1. 5. 6 ROS measurement

Adherent BMM were infected with *L. major* NIH S promastigotes for 30 min at 37°C in the presence of 5 µM CellROX Deep Red Reagent (Thermo Fisher Scientific). Subsequently, after two washes with PBS, cells were collected by scraping in PBS, fixed for 10 min in 4% PFA and washed twice with PBS. Samples were acquired in the APC channel on an LSRII Fortessa SORP cytometer with the BD FACSDiva6.2 software (BD Biosciences). Fluorescence intensity values were analyzed using the FlowJo software (version 10; TreeStar).

1. 5. 7 Statistical analysis

The two-tailed, unpaired Student's t test was performed to evaluate the significance of the differences observed. *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

1. 6. Supporting Information

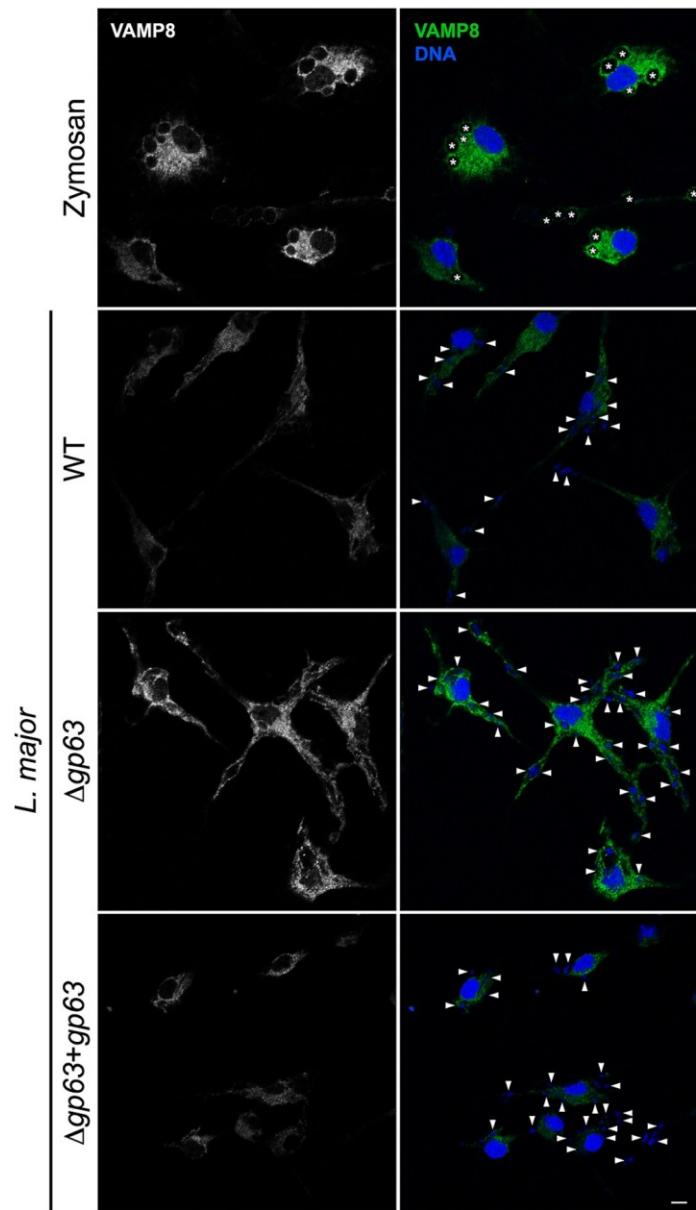


Figure A3S. 1 *L. major* GP63 down modulates VAMP8

Confocal microscopy images of C57BL/6 x 129 BMM from wild type or Vamp8^{-/-} mice infected for 1 h with opsonized WT, $\Delta gp63$, or $\Delta gp63+gp63$ *L. major* promastigotes. VAMP8 is in green; nuclei are in blue. Fields containing several cells are shown to display the decrease in VAMP8 intensity upon infection with GP63-expressing parasites. Asterisks indicate phagosomes containing zymosan particles and white arrowheads point to parasite nuclei. Scale bar, 5 μ M. (JPG)

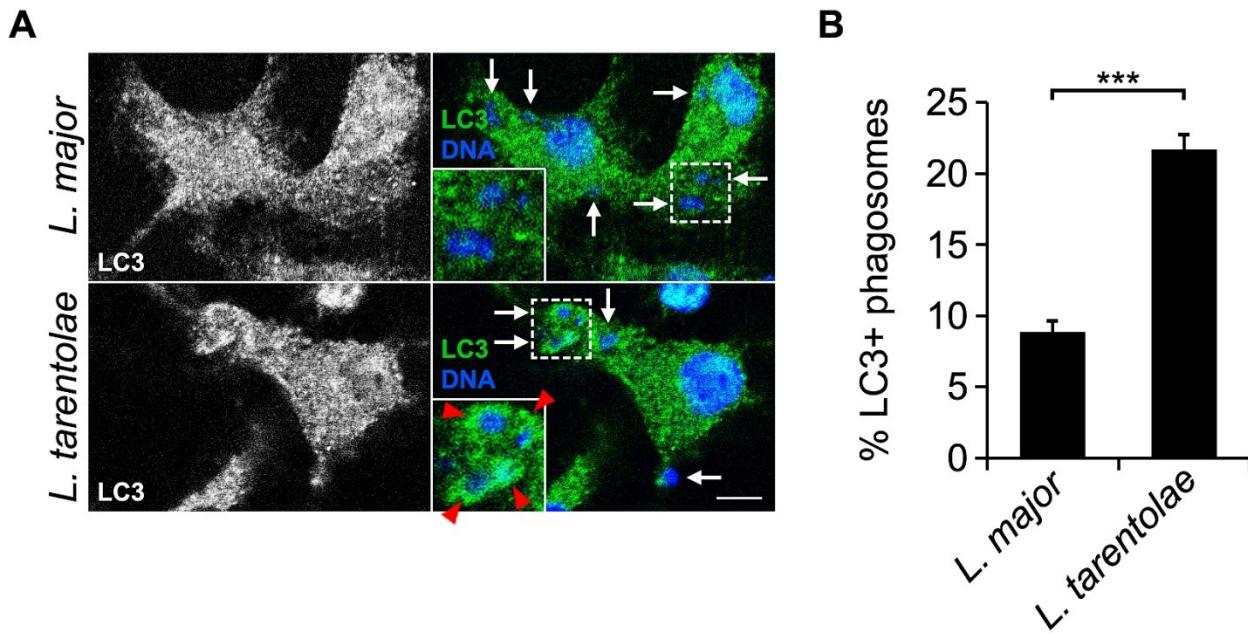


Figure A3S. 2 *L. tarentolae* does not prevent LC3 recruitment to the phagosome

(A) Confocal microscopy images of BALB/c BMM infected for 1 h with opsonized *L. major* or *L. tarentolae* promastigotes. LC3 is in green; nuclei are in blue. White arrows indicate parasite nuclei; redfilled arrowheads point to LC3 recruitment. Scale bar, 5 μ M. (B) Quantification of LC3-positive phagosomes at 1 h after infection. Data are presented as the mean \pm SEM of values from two independent experiments. ***
p < 0.001 (JPG)

1. 7. Acknowledgments

We are grateful to Dr. W. Robert McMaster for the WT, Δ gp63 and Δ gp63+gp63 *L. major* parasites, Marcel Desrosiers and Jessy Tremblay for expert assistance with confocal microscopy, and Guillermo Arango Duque and Dr. Simona Stäger for critical comments.

1. 8. Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CM OS PAC AD. Performed the experiments: CM OS PAC NM. Analyzed the data: CM OS PAC NM. Contributed reagents/materials/analysis tools: WJH. Wrote the paper: CM AD.

2 References

1. Jutras I, Desjardins M. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21: 511–527. PMID: 16212505
2. Botelho RJ, Grinstein S. Phagocytosis. *Curr Biol.* 2011; 21: R533–538. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.053 PMID: 21783028
3. Ramachandra L, Song R, Harding CV. Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide:class II MHC complexes. *J Immunol.* 1999; 162: 3263–3272. PMID: 10092778
4. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature.* 2003; 425: 402–406. PMID: 14508490
5. Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol.* 2012; 7: 61–98. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445 PMID: 21910624
6. Moradin N, Descoteaux A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 121. doi: 10.3389/fcimb.2012.00121 PMID: 23050244
7. Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, et al. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe.* 2013; 14: 15–25. doi: 10.1016/j.chom.2013.06.003 PMID: 23870310
8. Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 1997; 185: 2061–2068. PMID: 9182677
9. Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ, Desjardins M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol.* 2005; 7: 1263–1270. PMID: 16098214
10. Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ, Descoteaux A. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000628. doi: 10.1371/journal.ppat.1000628 PMID: 19834555
11. Alvarez de Celis H, Gomez CP, Descoteaux A, Duplay P. Dok proteins are recruited to the phagosome and degraded in a GP63-dependent manner during *Leishmania major* infection. *Microbes Infect.* 2015; 17: 285–294. doi: 10.1016/j.micinf.2014.12.011 PMID: 25554486
12. Gomez MA, Contreras I, Halle M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal.* 2009; 2: ra58. doi: 10.1126/scisignal.2000213 PMID: 19797268
13. Contreras I, Gomez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1001148. doi: 10.1371/journal.ppat.1001148 PMID: 20976196

14. Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, et al. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe.* 2011; 9: 331–341. doi: 10.1016/j.chom.2011.03.008 PMID: 21501832
15. Arango Duque G, Fukuda M, Turco SJ, Stager S, Descoteaux A. *Leishmania* promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI. *J Immunol.* 2014; 193: 2363–2372. doi: 10.4049/jimmunol.1303043 PMID: 25063865
16. Isnard A, Christian JG, Kodiha M, Stochaj U, McMaster WR, Olivier M. Impact of *Leishmania* infection on host macrophage nuclear physiology and nucleopore complex integrity. *PLoS Pathog.* 2015; 11: e1004776. doi: 10.1371/journal.ppat.1004776 PMID: 25826301
17. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell.* 2006; 126: 205– 218. PMID: 16839887
18. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moschiach S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature.* 2007; 450: 1253–1257. PMID: 18097414
19. Lai SC, Devenish RJ. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells.* 2012; 1: 396–408. doi: 10.3390/cells1030396 PMID: 24710482
20. Huang J, Brumell JH. Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12: 101–114. doi: 10.1038/nrmicro3160 PMID: 24384599
21. Mehta P, Henault J, Kolbeck R, Sanjuan MA. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity. *Curr Opin Immunol.* 2014; 26: 69–75. doi: 10.1016/j.coи.2013.10.012 PMID: 24556403
22. Romao S, Munz C. LC3-associated phagocytosis. *Autophagy.* 2014; 10: 526–528. doi: 10.4161/auto.27606 PMID: 24413059
23. Huang J, Canadien V, Lam GY, Steinberg BE, Dinauer MC, Magalhaes MA, et al. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 6226–6231. doi: 10.1073/pnas.0811045106 PMID: 19339495
24. Martinez J, Almendinger J, Oberst A, Ness R, Dillon CP, Fitzgerald P, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 17396–17401. doi: 10.1073/pnas.1113421108 PMID: 21969579
25. Ma J, Becker C, Lowell CA, Underhill DM. Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. *J Biol Chem.* 2012; 287: 34149–34156. doi: 10.1074/jbc.M112.382812 PMID: 22902620
26. Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 1922–1931. PMID: 16848789
27. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000; 19: 5720–5728. PMID: 11060023

28. Li X, Prescott M, Adler B, Boyce JD, Devenish RJ. Beclin 1 is required for starvation-enhanced, but not rapamycin-enhanced, LC3-associated phagocytosis of *Burkholderia pseudomallei* in RAW 264.7 cells. *Infect Immun.* 2013; 81: 271–277. doi: 10.1128/IAI.00834-12 PMID: 23115045
29. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* 2012; 14: 1377–1389. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.014 PMID: 22683718
30. Campbell DA, Kurath U, Fleischmann J. Identification of a gp63 surface glycoprotein in *Leishmania tarentolae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 75: 89–92. PMID: 1526469
31. Gong L, Cullinane M, Treerat P, Ramm G, Prescott M, Adler B, et al. The *Burkholderia pseudomallei* type III secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis. *PLoS One.* 2011; 6: e17852. doi: 10.1371/journal.pone.0017852 PMID: 21412437
32. Lam GY, Cemma M, Muise AM, Higgins DE, Brumell JH. Host and bacterial factors that regulate LC3 recruitment to *Listeria monocytogenes* during the early stages of macrophage infection. *Autophagy.* 2013; 9: 985–995. doi: 10.4161/auto.24406 PMID: 23584039
33. Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol.* 2015; 17: 893–906. doi: 10.1038/ncb3192 PMID: 26098576
34. Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 9536–9541. PMID: 12869694
35. Rodriguez NE, Gaur Dixit U, Allen LA, Wilson ME. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages. *PLoS One.* 2011; 6: e19000. doi: 10.1371/journal.pone.0019000 PMID: 21552562
36. Winberg ME, Holm A, Sarndahl E, Vinet AF, Descoteaux A, Magnusson KE, et al. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. *Microbes Infect.* 2009; 11: 215–222. doi: 10.1016/j.micinf.2008.11.007 PMID: 19070677
37. Ma J, Becker C, Reyes C, Underhill DM. Cutting edge: FYCO1 recruitment to dectin-1 phagosomes is accelerated by light chain 3 protein and regulates phagosome maturation and reactive oxygen production. *J Immunol.* 2014; 192: 1356–1360. doi: 10.4049/jimmunol.1302835 PMID: 24442442
38. Choy A, Dancourt J, Mugo B, O'Connor TJ, Isberg RR, Melia TJ, Roy CR. The *Legionella* effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science.* 2012; 338: 1072–1076. doi: 10.1126/science.1227026 PMID: 23112293
39. Soong L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol.* 2008; 180: 4355–4360. PMID: 18354154

40. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 83. doi: 10.3389/fcimb. 2012.00083 PMID: 22919674
41. Crauwels P, Bohn R, Thomas M, Gottwalt S, Jackel F, Kramer S, et al. Apoptotic-like *Leishmania* exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination. *Autophagy.* 2015; 11: 285–297. doi: 10.1080/15548627.2014.998904 PMID: 25801301
42. Furuta N, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Amano A. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol Biol Cell.* 2010; 21: 1001–1010. doi: 10.1091/mbc.E09-08-0693 PMID: 20089838
43. Wang CC, Ng CP, Lu L, Atlashkin V, Zhang W, Seet LF, et al. A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Dev Cell.* 2004; 7: 359–371. PMID: 15363411
44. Descoteaux A, Matlashewski G. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol Cell Biol.* 1989; 9: 5223–5227. PMID: 2513483
45. Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 120: 33–40. PMID: 11849703
46. Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A, Chang KP. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J Biol Chem.* 1989; 264: 7483–7489. PMID: 2708373