

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DES MÉCANISMES PAR LESQUELS LA PKC- α
MODULE L'INFLAMMATION ET LA PRÉSENTATION
ANTIGÉNIQUE CHEZ LE MACROPHAGE MURIN**

Par
Mélanie Giroux

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (PhD)
en Immunologie-Virologie

Jury d'évaluation

Président du Jury et examineur interne	Alain Lamarre, PhD, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Paul Naccache, PhD, Université Laval
Examineur externe	Viktor Steimle, PhD, Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	Albert Descoteaux, PhD, INRS-Institut Armand-Frappier

Table des Matières

Table des Matières	ii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	xi
Sommaire	xv
Préface	xvii
Introduction	1
Revue de littérature	5
1. <u>Le Macrophage</u>	6
1.1 Description.....	6
1.2 Fonctions.....	6
1.2.1 La phagocytose	7
1.2.2 La présentation antigénique	8
1.2.3 La sécrétion de médiateurs solubles	8
1.3 Récepteurs.....	9
1.3.1 Récepteurs de phagocytose	9
1.3.2 Récepteurs d'activation.....	11
1.4 Les lipopolysaccharides (LPS)	11
1.4.1 Structure.....	12
1.4.2 Récepteur	13
1.4.3 Voie de signalisation.....	14
2. <u>Protéine Kinase C (PKC)</u>	15
2.1 Caractéristiques.....	15
2.1.1 Mécanisme d'activation.....	16
2.1.2 Isoenzymes.....	16

2.2 Implication de PKC dans la réponse inflammatoire	18
2.2.1 La cyclooxygénase (COX)-2 et la sécrétion de PGE ₂	19
2.2.2 Expression de diverses cytokines et médiateurs solubles.....	21
3. <u>Interféron (IFN)-γ</u>	23
3.1 Caractéristiques.....	23
3.2 Signalisation.....	24
3.2.1 Récepteur	24
3.2.2 Voie des Jak-Stat.....	27
3.2.2.1 Protéines Jak	27
3.2.2.2 Protéines Stat	28
3.2.2.3 Modèle d'activation de la voie des Jak-Stat en réponse à l'IFN- γ	28
3.2.2.4 Régulation négative	31
3.2.2.5 Implication de PKC dans la signalisation induite par l'IFN- γ	32
3.2.3 Famille des «Interferon Regulatory Factor» (IRF)	33
3.3 Effet cellulaire de l'IFN- γ	34
3.3.1 Impact sur les fonctions du macrophage.....	34
4. <u>Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II)</u>	35
4.1 Fonction	35
4.2 Expression des molécules du CMH II	36
4.2.1 Distribution cellulaire	36
4.2.2 Modulation de l'expression.....	37
4.2.3 Transcription des gènes du CMH II.....	38
4.3 CIITA.....	40
4.3.1 Caractéristiques.....	40
4.3.2 Régulation de l'expression.....	41
4.3.2.1 Expression induite par l'IFN- γ	42
4.4 Rôle de PKC dans l'expression du CMH II.....	43

5. <i>Leishmania</i>	43
5.1 Description.....	43
5.1.1 Leishmaniose	44
5.1.2 Cycle de vie.....	45
5.2 Immunité.....	47
5.3 Interaction avec le macrophage	47
5.3.1 Manipulation de la signalisation intracellulaire.....	48
5.3.2 Manipulation de la présentation antigénique	49
Objectifs	51
<u>Chapitre I</u> L'inflammation chez le macrophage : Étude de l'implication de PKC- α dans la régulation de l'expression de COX-2 et de la sécrétion des PGE ₂	52
Résumé de la première publication	53
Première publication	54
Abstract	55
Introduction.....	56
Materials and Methods.....	58
Results.....	61
Discussion.....	65
References.....	70
Figure legends.....	77
Figures.....	79
<u>Chapitre II</u> La présentation antigénique chez le macrophage : Étude des mécanismes moléculaires qui modulent l'expression du CMH de classe II	86
Résumé de la deuxième publication	87
Deuxième publication	88
Abstract	89
Introduction.....	90

Materials and methods	92
Results.....	98
Discussion.....	103
References.....	106
Figure legends.....	112
Figures.....	115
Résumé de la troisième publication.....	121
Troisième publication	122
Abstract.....	123
Introduction.....	124
Materials and methods	126
Results.....	130
Discussion.....	132
References.....	135
Figure legends.....	141
Figures.....	143
Discussion.....	147
1. <u>Rôle de PKC-α dans la régulation de l'expression de COX-2 et dans la synthèse des PGE₂</u>	150
1.1 Expression de COX-2 en réponse au LPS	151
1.1.1 Transcription du gène COX-2 induite par le LPS.....	151
1.2 Expression de COX-2 en réponse à l'IFN- γ	153
1.2.1 Stabilité de l'ARNm de COX-2 en réponse à l'IFN- γ	153
1.2.2 Transcription du gène COX-2 induite par l'IFN- γ	154
1.3 Sécrétion des PGE ₂ en réponse au LPS et à l'IFN- γ	156
2. <u>Localisation intracellulaire de PKC-α en réponse à l'IFN-γ</u>	157
2.1 Expression de différents gènes en réponse à l'IFN- γ	158

3. <u>Modulation de l'expression du CMH II</u>	159
3.1 Mécanismes moléculaires par lesquels PKC- α module l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ	159
3.1.1 Transcription de CIITA.....	159
3.1.1.1 Rôle de la voie des JAK-STAT	160
3.1.1.2 Rôle de IRF-1.....	161
3.2 Régulation de l'expression du CMH II par <i>L. donovani</i>	163
3.2.1 Inhibition de PKC	165
3.3 Signification biologique de la diminution de l'expression du CMH II	166
Conclusion	168
Remerciements	171
Bibliographie	174
Annexe I: Figures complémentaires	231
Annexe II: Tirés à part des Articles I et II	236

Liste des Tableaux

Revue de littérature

Tableau 1:	Phénotypes observés chez des souris déficientes pour diverses protéines Jak et Stat	29
Tableau 2:	Activation des protéines Jak et Stat en réponse à diverses cytokines	29
Tableau 3:	Distribution géographique des espèces majeures de <i>Leishmania</i> responsables de diverses maladies humaines	44

Première publication

Table I:	Effect of COX and iNOS inhibitors on LPS-induced PGE ₂ secretion in RAW 264.7 macrophages	85
----------	--	----

Liste des Figures

Revue de littérature

Figure 1:	Structure du LPS	13
Figure 2:	Cascade de signalisation médiée par TLR4 en réponse au LPS	14
Figure 3:	Isoenzymes de la famille des PKC	18
Figure 4:	Structure du récepteur de l'IFN- γ	25
Figure 5:	Modèle d'activation de la voie des JAK-STAT en réponse à l'IFN- γ	31
Figure 6:	Cascade de signalisation menant à l'expression des molécules du CMH de classe II	39
Figure 7:	Cycle de vie de <i>Leishmania</i>	46

Première publication

Figure 1:	Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced COX-2 expression	79
Figure 2:	Overexpression of PKC- α increases LPS-induced COX-2 promoter activity in RAW 264.7 macrophages	80
Figure 3:	Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression induced by LPS and IFN- γ	81
Figure 4:	Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression induced by <i>L. donovani</i> promastigotes	82
Figure 5:	COX-2 expression in BMM	83
Figure 6:	Effect of DN PKC- α overexpression on PGE ₂ secretion	84

Deuxième publication

Figure 1:	Effect of DN-PKC- α overexpression on IFN- γ -induced MHC-II mRNA accumulation	115
Figure 2:	PKC- α modulates IFN- γ -induced CIITA transcriptional activity	116
Figure 3:	Effect of DN PKC- α overexpression on IFN- γ -induced activation of the JAK-STAT pathway	117
Figure 4:	Expression and DNA binding activity of IRF-1/2 are normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells	118
Figure 5:	Overexpression of PKC- α increases IFN- γ -induced transactivation activity of IRF-1 but not IRF-2	119
Figure 6:	Role of PKC- α in the modulation of IFN- γ -induced IRF-1 posttranslational modifications	120

Troisième publication

Figure 1:	Selective inhibition of IFN- γ -induced gene expression in <i>Leishmania donovani</i> amastigotes-infected macrophages.	143
Figure 2:	IFN- γ -induced IRF-1 protein expression is normal in cells infected with <i>L. donovani</i> amastigotes	144
Figure 3:	Effect of <i>L. donovani</i> amastigotes on IFN- γ -induced activation of JAK-STAT pathway	145
Figure 4:	Effect of <i>L. donovani</i> amastigotes on PKC- α nuclear translocation induced by IFN- γ	146

Conclusion

Figure 12:	Schéma illustrant l'ensemble des résultats présentés dans cette thèse. Voir texte pour plus de détails.	170
------------	---	-----

Annexe I

Figure 8:	La surexpression d'un mutant DN PKC- α n'affecte pas les temps de demi-vies de l'ARNm de COX-2 en réponse à l'IFN- γ	232
Figure 9:	PKC- α n'est pas impliquée dans la stabilité de l'ARNm de COX-2 en réponse à l'IFN- γ	233
Figure 10:	PKC- α module la transcription de COX-2 induite par l'IFN- γ	234
Figure 11:	La surexpression d'un mutant DN PKC- α n'affecte pas la translocation nucléaire ni la liaison à l'ADN du facteur de transcription ICSBP en réponse à l'IFN- γ	235

Liste des Abréviations

AA	Acide arachidonique
AD	Actinomycine D
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Activated protein-1
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BLS	Bare lymphocyte syndrome
BMM	Bone marrow-derived macrophages
CA (PKC- α)	Constitutivement active
CD	Cluster of designation
CIITA	MHC class II transactivator
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CR	Complement receptor
CREB	Cyclic AMP Response Element Binding protein
CSF-1	Colony stimulating factor-1
DAG	Diacylglycérol
DEX	Dexaméthasone
DN	Dominant négatif
ERK	Extracellular regulated kinase
Fc	Fragment cristallisable
Fc γ R	Récepteur pour la portion Fc des IgG
GAS	γ -Activated sequence
GATE	γ -Interferon-Activation Transcriptional Element
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor
GP	Glycoprotéine

GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HLA	Human leukocyte antigen
HHV-8	Human herpesvirus-8
IAD	IRF association domain
ICAM-1	Intercellular-adhesion molecule-1
ICSBP	Interferon consensus sequence binding protein
IFN	Interféron
IFNAR	IFN- α receptor
IFNGR	IFN- γ receptor
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IP-10	Inducible protein-10
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
ISRE	Interferon sequence response element
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JAK	Janus tyrosine kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LBP	LPS-binding protein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharide
Mal	MyD88-adaptor-like
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MIP-2	Macrophage inflammatory protein-2
MR	Mannose receptor
MyD88	Myeloid differentiation protein

NF-	Nuclear factor
NK	Natural killer
NO	Oxyde nitrique
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PA	Acide phosphatidique
PCAF	p300/CBP-Associated Factor
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PG(E ₂)	Prostaglandine (E ₂)
PI	Phosphatidyl inositol
PIP ₂	Phosphatidyl inositol-4,5-biphosphate
PIP ₃	Phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate
PKC	Protéine kinase C
PL	Phospholipase
PMA	Phorbol myristoyl acétate
PRR	Pattern recognition receptor
PS	Phosphatidylsérine
PTK	Protéine tyrosine kinase
PU.1	Putative factor 1
PyK-2	Proline-rich tyrosine kinase-2
SH2	Src homology domain-2
SHP	SH2-containing tyrosine phosphatase
SOCS	Suppressors of cytokine signaling
SR	Scavenger receptor
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAB	TAK1 binding protein
TAK	TGF- β activatred kinase-1
TCR	T cell receptor
TGF	Tumor growth factor
Th	T helper
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein

TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Tollip	Toll-interacting protein
TPA	12-O-tétradecanoyl phorbol-13-acétate
TRAF-6	TNF-receptor associated factor
TX	Thromboxane
UTR	Untranslated region
X2BP	X2 binding protein
YB-1	Y Box binding protein-1

SOMMAIRE

En participant à plusieurs fonctions immunitaires, le macrophage occupe une place centrale aussi bien dans l'immunité innée que dans l'immunité acquise. La plupart des fonctions du macrophage sont inductibles et son exposition à divers stimuli déclenche une série d'évènements intracellulaires complexes, incluant l'activation des protéines kinases C (PKCs), qui ultimement mèneront à l'expression de différents gènes impliqués dans la modulation des fonctions du macrophage.

Les résultats obtenus tout au long de ces travaux nous ont conduit à préciser les mécanismes moléculaires qui mènent à l'expression de la cyclooxygénase (COX)-2 et du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, nous permettant ainsi d'atteindre l'objectif général de cette étude qui consistait à mieux comprendre l'activation des fonctions du macrophage, respectivement dans l'inflammation et la présentation antigénique. Des clones de la lignée de macrophages murins RAW 264.7 surexprimant un mutant dominant-négatif (DN) de l'isoenzyme α de PKC se sont avérés des outils indispensables afin de mettre en évidence, dans un premier temps, le rôle de cet isoenzyme dans la régulation de l'expression de la cyclooxygénase (COX)-2 en réponse au LPS et à l'IFN- γ . Plus précisément, en réponse au LPS, la surexpression du mutant DN de PKC- α engendre une diminution de l'expression de COX-2 sans pour autant diminuer la sécrétion des PGE₂, tandis qu'en réponse à l'IFN- γ , on observe plutôt une augmentation de l'expression de COX-2 ainsi que de la sécrétion des PGE₂. Dans un deuxième temps, nos résultats indiquent qu'en agissant sur la transcription du gène CIITA dépendante de l'activation du facteur de transcription IRF-1, PKC- α contribue également à moduler l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ .

Afin d'échapper à la reconnaissance par les cellules T et ainsi promouvoir leur survie à l'intérieur de l'hôte, plusieurs microorganismes inhibent l'expression du CMH II par des mécanismes qui restent encore mal connus. Par conséquent, les expériences proposées dans la dernière partie de cette étude avaient pour but de mieux comprendre la stratégie qu'utilise le parasite intracellulaire obligatoire *Leishmania donovani* pour mener à l'inhibition de l'expression du CMH II.

PRÉFACE

Les travaux présentés dans cette thèse sont regroupés sous forme de 3 publications. L'implication de chacun des auteurs est présentée ici dans le but de bien dégager la contribution personnelle de l'auteure principale de cette thèse. Deux de ces articles sont déjà publiés dans *Journal of Immunology* :

Article I : Giroux, M. et Descoteaux, A. **Cyclooxygenase-2 expression in macrophages : modulation by Protein Kinase C- α** . *J. Immunol.* 2000. 165 (7). 3985-3991.

Article II : Giroux, M. Schmidt, M. et Descoteaux, A. **IFN- γ -induced MHC class II expression : transactivation of CIITA promoter IV by IRF-1 is regulated by Protein Kinase C- α** . *J. Immunol.* 2003. 171 (8) 4187-4194.

Le troisième article (Giroux, M. et Descoteaux A. **The inhibition of IFN- γ -induced Class II transactivator expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages correlates with the inhibition of protein kinase C- α nuclear translocation**) est présentement sous forme de manuscrit.

Ces travaux ont été effectués sous la direction du Dr. Albert Descoteaux, celui-ci ayant fourni l'encadrement scientifique nécessaire à l'accomplissement global de ce projet de doctorat. À noter que les clones des macrophages murins RAW 264.7 surexprimant le mutant dominant-négatif (DN) de PKC- α qui ont été utilisés pour effectuer la majorité des travaux présentés dans les 2 premières publications ont été préalablement générés par Anik St-Denis (St-Denis et al., 1998). De plus, Marcel Desrosiers a fourni une aide précieuse et considérable pour les expériences de microscopie confocale présentées dans les publications II et III.

Les résultats présentés dans la publication I ont permis de mieux comprendre le rôle de PKC- α dans l'expression de la cyclooxygénase (COX)-2 (Giroux and Descoteaux, 2000). L'ensemble des expériences ainsi que la rédaction de cet article ont été effectués par l'auteure de cette thèse sous la supervision du Dr. Albert Descoteaux.

La publication II avait pour but de décrire l'implication de PKC- α dans l'expression du CMH de classe II en réponse à l'IFN- γ (Giroux et al., 2003). L'auteure de cette thèse a contribué à la totalité des expériences présentées dans cette publication, de même qu'à la rédaction, sous la supervision du Dr. Albert Descoteaux. Par contre, il est à noter que le vecteur rapporteur contenant le promoteur IV du gène CIITA ainsi que les différents plasmides d'expression utilisés pour les expériences de transfections transitoires nous ont été fournis par un collaborateur, le Dr. Manuel Schmidt, qui a d'ailleurs contribué en partie à la rédaction et la correction de cet article.

Le troisième article scientifique regroupe une série d'expériences dont les résultats ont permis de mieux comprendre la stratégie utilisée par le parasite *Leishmania donovani* pour inhiber l'expression du CMH II chez le macrophage. L'ensemble de ces travaux ainsi que la rédaction de ce manuscrit ont aussi été effectués par l'auteure de cette thèse sous la supervision du Dr. Albert Descoteaux.

INTRODUCTION

En plus d'être une importante cellule phagocytaire, le macrophage est également reconnu comme un élément majeur jouant un rôle-clé tant au niveau de l'inflammation que de la présentation antigénique (Adams and Hamilton, 1987; Unanue and Allen, 1987). Les LPS et l'IFN- γ sont considérés comme de puissants activateurs des différentes fonctions du macrophage (Adams and Hamilton, 1984; Adams and Hamilton, 1987). Conséquemment, suite à son exposition à ces divers stimuli, de nombreuses cascades de signalisation sont engendrées incluant l'activation des protéines tyrosines kinases (PTK) et des protéines sérine-thréonine kinases telles les PKC (Adams and Hamilton, 1987; Wright et al., 1990).

La PKC a tout d'abord été caractérisée comme une protéine sérine-thréonine kinase dépendante des phospholipides et du Ca^{2+} intracellulaire dont l'activité requiert le diacylglycérol (DAG). Par la suite, il a été établi que PKC est plutôt une famille de protéine sérine-thréonine kinases comprenant douze isoenzymes dont sept sont exprimés chez le macrophage (α , β I et β II, ϵ , δ , η , ζ) (Nishizuka, 1992). Tandis que d'une part nos connaissances demeurent encore relativement limitées sur le(s) rôle(s) respectif(s) de chacun de ces isoenzymes chez le macrophage, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques a d'autre part permis de mettre en évidence le rôle central de PKC dans la transduction des signaux chez le macrophage ainsi que son implication dans la modulation de plusieurs de ses fonctions (Novotney et al., 1991; Shapira et al., 1994; Taniguchi et al., 1989).

D'ailleurs, des résultats précédents basés sur l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs pharmacologiques de PKC suggèrent que la synthèse des prostaglandines E_2 (PGE_2) nécessite l'activation de PKC chez la lignée de macrophages murins RAW 264.7 ainsi que chez les macrophages péritonéaux (Burch, 1987; Pfannkuche et al., 1986). Les PGs sont d'importants médiateurs inflammatoires et immunitaires dont la sécrétion est induite par une grande variété de stimuli incluant les LPS, les phorbols esters, différentes cytokines et la phagocytose (Burch, 1987). Sécrétées en grande quantité par le macrophage, les PGE_2 agissent de façon autocrine pour réguler plusieurs de ses fonctions effectrices dont principalement l'inflammation (Dubois et al., 1998; Russell and Pace,

1984). Les cyclooxygénases (COXs) qui sont les enzymes-clé responsables de catalyser la conversion de l'acide arachidonique (AA) en PGs existent en deux isoformes qui exercent des fonctions physiologiques différentes. Tandis que COX-1 est exprimé constitutivement chez la plupart des cellules pour contrôler l'homéostasie (Dubois et al., 1998; Langenbach et al., 1995), COX-2 est inductible principalement chez les cellules qui jouent un rôle au niveau de l'inflammation notamment le macrophage, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Morham et al., 1995).

Les molécules du CMH de classe II jouent un rôle central dans le déclenchement et le contrôle des réponses immunitaires par leur capacité à présenter des peptides dérivés d'antigènes extracellulaires aux lymphocytes T CD4⁺. Constitutivement exprimées que sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA, monocytes/macrophages, cellules B et cellules dendritiques), les molécules du CMH II peuvent toutefois être exprimées sur la plupart des types cellulaires en réponse à l'IFN- γ (Boss, 1997; Mach et al., 1996; Reith and Mach, 2001). Différentes études basées sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques suggèrent une implication de PKC dans la régulation de l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ chez le macrophage et les astrocytes (Fan et al., 1988; Lee et al., 1995; Politis and Vogel, 1990). De plus, il a été démontré que la microinjection de macrophages péritonéaux avec de la PKC purifiée était suffisante pour induire l'expression du CMH II (Smith et al., 1992). Dans le contexte d'une interaction hôte-pathogène, une régulation précise de l'expression des molécules du CMH II s'avère cruciale pour le développement d'une réponse immune adaptative adéquate et conséquemment pour réussir à contrôler la réplication d'un pathogène (Schwartz, 1986). Or, pour persister à l'intérieur de l'hôte, plusieurs microorganismes interfèrent avec le processus de présentation antigénique évitant de cette façon la reconnaissance par les cellules T. Des études indiquent, par exemple, que la présentation antigénique est déficiente chez des macrophages infectés avec certaines espèces du parasite intracellulaire obligatoire *Leishmania* (Courret et al., 1999; Fruth et al., 1993; Kima et al., 1996; Prina et al., 1996; Wolfram et al., 1995).

Depuis quelques années, les différents travaux effectués dans le laboratoire ont permis d'apporter des précisions considérables quant au rôle de PKC- α chez le macrophage. Ainsi, il a été démontré que PKC- α participe tant à la phagocytose (Breton and Descoteaux, 2000) et au contrôle de la réplication intracellulaire de pathogènes (St-Denis et al., 1999) qu'à la modulation de certaines réponses inflammatoires induites par le LPS (Chano and Descoteaux, 2002; St-Denis et al., 1998). En se basant sur ces différents résultats et sur les évidences indirectes concernant le rôle de PKC au niveau de la sécrétion des PGE₂ et de l'expression du CMH II chez le macrophage, l'objectif global du présent projet consistait à préciser davantage les mécanismes moléculaires qui conduisent à la régulation de l'inflammation et de la présentation antigénique chez le macrophage. Pour ce faire, le projet reposait sur trois objectifs spécifiques :

- 1) Élucider le rôle de PKC- α dans la modulation de l'expression de COX-2
- 2) Déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels PKC- α module l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ
- 3) Étudier l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ dans le contexte d'une infection par la forme amastigote du parasite *Leishmania donovani*

Le corps de cette thèse est constitué des chapitres I et II qui regroupent trois articles, lesquels englobent l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude de ces différents objectifs. Ces chapitres sont précédés d'une revue bibliographique divisée en 5 parties distinctes décrivant les principaux éléments traités dans ces trois articles (Macrophage, Protéine kinase C, Interféron- γ , CMH de classe II, *Leishmania*).

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Le Macrophage

1.1 Description

Au début du 20^{ème} siècle, le macrophage a été décrit par Elie Metchnikoff comme une large cellule mononucléée capable de phagocyter et détruire certaines bactéries. Aujourd'hui, le macrophage est reconnu comme une importante cellule effectrice du système de défense de l'hôte en participant autant à l'immunité innée qu'à l'immunité acquise (Adams and Hamilton, 1984; Gordon, 1998). Il est caractérisé principalement par sa grande taille (25 à 50 µm de diamètre) et sa forme irrégulière, son noyau homogène dans un ample cytoplasme, son cytosquelette dense composé de filaments d'actine responsables de la motilité générale de la cellule et par la présence à sa surface de nombreux récepteurs importants pour la plupart de ses fonctions effectrices (Auger, 1993).

Dérivée de la moëlle osseuse, la forme monocyttaire que l'on retrouve dans la circulation sanguine origine de la différenciation des promonocytes provenant de la division d'un monoblaste qui est le stade précoce du développement des macrophages. Les monocytes représentent 1 à 6% des leukocytes circulants et leur migration à travers les vaisseaux sanguins leur permettra d'atteindre la plupart des tissus devenant ainsi des macrophages matures résidents. Pour faciliter sa migration vers les tissus et aux sites de réactions inflammatoires, le monocyte exprime entre autre à sa surface la protéine LFA-1 qui interagit avec ICAM-1, une molécule d'adhésion présente à la surface des cellules de l'endothélium (Auger, 1993).

1.2 Fonctions

Le macrophage joue un rôle central dans l'initiation et le contrôle des réponses immunitaires et inflammatoires (Adams and Hamilton, 1987). La phagocytose, la présentation antigénique et la sécrétion de médiateurs solubles sont trois fonctions majeures du macrophage.

1.2.1 La phagocytose

La phagocytose de microorganismes pathogènes consiste en la prise en charge et la destruction de particules, incluant les microorganismes extracellulaires, dont la taille est supérieure à 0.5µm (Allen and Aderem, 1996). Il s'agit d'un phénomène indépendant de la clathrine qui implique plutôt des mécanismes nécessitant la réorganisation du cytosquelette d'actine (Greenberg, 1993). À cause de leur compétence dans l'internalisation de particules, les macrophages et les neutrophiles sont considérés comme des phagocytes professionnels (Aderem and Underhill, 1999).

L'internalisation d'une particule est initiée suite à l'interaction des ligands exposés à sa surface avec les récepteurs spécifiques présents sur le phagocyte (Greenberg, 1993) (voir la section 1.3.1 pour connaître les principaux récepteurs impliqués dans la phagocytose). La particule internalisée se retrouve dans une vacuole, le phagosome. Ce dernier, suite à une série d'évènements de fusion et de fission avec différents compartiments endosomaux, se transforme en un compartiment acide et riche en hydrolases, le phagolysosome, dans lequel la particule sera digérée (Desjardins, 1995). Bien que la phagocytose est responsable de l'élimination de la plupart des microorganismes, certains réussissent à subvertir ce processus en utilisant diverses stratégies leur permettant de proliférer et survivre à l'intérieur de la cellule (Aderem and Underhill, 1999; Desjardins and Descoteaux, 1998; Finlay and Cossart, 1997).

En plus de son implication dans la destruction de microorganismes, le macrophage élimine également les cellules apoptotiques et sénescents dans le but de protéger l'organisme de leur contenu potentiellement toxique (Savill et al., 1993). Parmi les récepteurs de phagocytose présents à la surface du macrophage, certains participent à la reconnaissance et à l'internalisation des cellules apoptotiques (Platt et al., 1998; Savill et al., 1993) (voir section 1.3.1 pour connaître les récepteurs impliqués dans la phagocytose).

1.2.2 La présentation antigénique

En établissant le lien entre la réponse immunitaire innée et acquise, la présentation antigénique est considérée comme un événement pivot dans l'organisation d'une réponse immunitaire adéquate (Whitton, 1998). Le macrophage joue un rôle essentiel dans l'initiation des réponses immunes acquises à cause de sa capacité à activer les lymphocytes T en leur présentant des peptides antigéniques liés aux molécules du CMH de classe I ou II (Adams and Hamilton, 1987; Whitton, 1998).

Les molécules du CMH I sont exprimées sur la plupart des types cellulaires et lient les peptides antigéniques générés par un organelle protéolytique appelé protéasome. Ces peptides sont reconnus par les lymphocytes T CD8⁺. Pour leur part, les molécules du CMH II interagissent avec les cellules T CD4⁺ en leur présentant des peptides dérivés de protéines qui sont dégradées dans la voie endosomale suite à la phagocytose d'une particule. L'expression de ces molécules est restreinte aux CPA spécialisées, incluant les cellules B, les cellules dendritiques et les macrophages.

1.2.3 La sécrétion de médiateurs solubles

Le macrophage sécrète plusieurs médiateurs solubles qui influencent l'initiation et le maintien des réponses immunitaires et inflammatoires (Gordon, 1998).

Le TNF- α et l'IL-1 sont deux cytokines pro-inflammatoires sécrétées par le macrophage en réponse à divers stimuli tels que le LPS des bactéries à Gram négatif. En synergie avec l'IFN- γ , le TNF- α est un puissant activateur des fonctions du macrophage (Farrar and Schreiber, 1993; Vassalli, 1992). L'IL-12 est une cytokine produite majoritairement par le macrophage en réponse à plusieurs pathogènes. Elle favorise la production d'IFN- γ par les lymphocytes T activés et les cellules NK et ainsi, elle détient une place centrale dans l'élimination des pathogènes intracellulaires en orientant la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire de type Th1 (Sutterwala and Mosser, 1999). Le NO est un important agent anti-microbien qui contrôle la réplication et

l'élimination de pathogènes intracellulaires (Bogdan et al., 2000). Les PGs sont d'importants médiateurs inflammatoires dont la sécrétion est induite par le LPS, différentes cytokines, les phorbol esters et la phagocytose. Le macrophage sécrète de grande quantité de PGE₂ qui peuvent agir de façon autocrine pour activer ou inhiber certaines de ses fonctions (Dubois et al., 1998; Russell and Pace, 1984).

1.3 Récepteurs

La présence de plusieurs récepteurs à la surface du macrophage lui permet de répondre rapidement et efficacement à divers stimuli rencontrés dans son environnement. L'interaction de ces récepteurs avec leurs ligands respectifs entraîne notamment la reconnaissance et l'internalisation d'une particule ainsi que l'activation de nombreuses voies de signalisation qui mènent à la sécrétion de médiateurs solubles responsables de moduler les réponses inflammatoires et immunitaires (Auger, 1993; Underhill and Ozinsky, 2002a).

1.3.1 Récepteurs de phagocytose

La plupart des pathogènes expriment à leur surface des motifs conservés essentiels à leur biologie qui, par conséquent, ne sont pas sujets à un haut niveau de mutations. Janeway a proposé d'appeler ces motifs des «pathogen-associated molecular patterns» (PAMPs) et les récepteurs responsables de leur reconnaissance des «pathogen recognition receptors» (PRRs) (Janeway, 1992). Les "PAMPs" incluent les résidus mannanes présents dans la paroi cellulaire des levures, les peptides formylés chez la plupart des bactéries, le LPS chez les bactéries à Gram négatif et les acides teichoïques chez les bactéries à Gram positif. Le récepteur mannose (MR), les intégrines et les récepteurs scavengers (SR) sont les principaux récepteurs impliqués dans la reconnaissance de ces différents motifs (Stahl and Ezekowitz, 1998; Underhill and Ozinsky, 2002a). Parmi ces récepteurs, certains SR de classe A (SR-AI et II) et B (CD36 et SR-BI) exprimés chez le macrophage permettent de reconnaître et d'internaliser spécifiquement les cellules apoptotiques en liant les lipoprotéines de faible densité, la

phosphatidylsérine et les composés polyanioniques retrouvés principalement à la surface de ces cellules (Platt et al., 1996; Savill et al., 1993).

Les opsonines, comme les anticorps ou les molécules du complément, entourent la particule pour ensuite interagir avec des récepteurs spécifiques (Greenberg, 1993). Les mieux caractérisés sont les récepteurs pour la portion Fc des IgG (FcγR) et ceux pour la protéine du complément C3bi (CR3) (Carroll, 1998; Daeron, 1997).

Les FcγRs sont divisés en deux classes: les récepteurs activateurs qui possèdent, dans leurs domaines intracellulaires, des motifs ITAMs responsables du recrutement de différentes kinases et les récepteurs inhibiteurs contenant des motifs ITIMs qui recrutent plutôt des phosphatases (Daeron, 1997). L'engagement des récepteurs Fcγ activateurs induit leur phosphorylation sur des résidus tyrosine suivie par une hausse de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire et finalement par le réarrangement du cytosquelette d'actine qui mène à l'internalisation de la particule opsonisée (Daeron, 1997; Greenberg et al., 1993). En plus de déclencher la phagocytose, l'activation des FcγRs mène à l'ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity) et à la production d'anions superoxide et de cytokines (Ravetch and Clynes, 1998).

Les protéines du complément sont reconnus par des récepteurs spécifiques incluant le CR1, le CR3 et le CR4 (Carroll, 1998). L'interaction du CR3 avec une particule opsonisée entraîne une réorganisation du cytosquelette d'actine, l'activation de la PI 3-kinase et l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire (Greenberg, 1995). Contrairement aux FcγRs, la phagocytose médiée par le CR3 n'augmente pas la phosphorylation sur résidus tyrosine et ne déclenche pas de "flambée oxydative" caractérisée par le relâchement d'anions superoxide (Aderem et al., 1985; Wright and Silverstein, 1983).

1.3.2 Récepteurs d'activation

Les membres de la famille des TLRs occupent une place centrale dans la reconnaissance d'un large spectre de pathogènes ainsi que dans l'activation des voies de signalisation menant à l'initiation des réponses inflammatoires (Aderem and Ulevitch, 2000; Gordon, 2002). Cette famille de récepteurs a tout d'abord été décrite chez *Drosophila* et TLR4, reconnu aujourd'hui comme le principal récepteur du LPS, a été le premier homologue humain à être cloné (Medzhitov et al., 1997; Tapping et al., 2000) (voir la section 1.4 pour de plus amples informations concernant le LPS et TLR4). À ce jour, 13 membres de cette famille ont été identifiés chez l'humain (TLR1 à TLR13). Bien que TLR2 et TLR4 sont les récepteurs les mieux caractérisés, on sait que TLR3 lie l'ARN double brin (Alexopoulou et al., 2001), TLR-5 reconnaît les bactéries à Gram positif et à Gram négatif en liant la flagelline (Hayashi et al., 2001) et TLR-9 reconnaît l'ADN bactérien (Hemmi et al., 2000). Plusieurs études sont présentement en cours afin de préciser et/ou d'identifier le(s) ligand(s) spécifique(s) ainsi que le rôle physiologique des différents TLRs connus (Dobrovolskaia and Vogel, 2002).

Le macrophage exprime aussi à sa surface une panoplie de récepteurs spécifiques pour plusieurs cytokines. L'interaction de ces récepteurs avec leur ligand respectif contribue à activer et moduler les diverses fonctions de la cellule (Auger, 1993).

1.4 Les lipopolysaccharides (LPS)

Le LPS, constituant majeur de la paroi des bactéries à Gram négatif, est un puissant activateur des fonctions du macrophage (Ulevitch and Tobias, 1995). L'exposition du macrophage à de faibles quantités de LPS déclenche la sécrétion de plusieurs cytokines incluant le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-10 ainsi que la production de différents médiateurs inflammatoires tels que les prostanoïdes, les leukotriènes et le NO lesquels ensemble modulent l'activité anti-microbienne de la cellule (Dinarello, 1996; Ulevitch and Tobias, 1995). Par contre, en trop grande quantité, le LPS peut conduire à une réponse systémique grave, le choc septique, causée par une suractivation du

macrophage qui sécrète alors des doses anormalement élevées de médiateurs pro-inflammatoires (Akira, 2001; Morrison and Ryan, 1987). Le choc septique représente une des principales complications des infections à bactéries à Gram négatif et est caractérisé par des réactions pathophysiologiques qui conduisent à une défaillance généralisée de plusieurs organes et ultimement à la mort (Gutierrez-Ramos and Bluethmann, 1997).

1.4.1 Structure

La structure du LPS pour l'ensemble des bactéries à Gram négatif consiste en une portion polysaccharidique liée de façon covalente à un composé lipidique, appelé lipide A (Voir Figure 1) (Luderitz, 1982). La portion polysaccharidique se divise en deux régions distinctes : un noyau oligosaccharidique directement lié au lipide A et une chaîne composée d'unités répétitives d'oligosaccharides, communément appelé O-antigène ou chaîne spécifique-O, laquelle est très variable et conséquemment, spécifique à chacune des souches bactériennes (Netea et al., 2002; Rietschel et al., 1982). La fonction biologique du LPS est attribuée principalement au lipide A et malgré que sa structure soit relativement conservée d'une espèce bactérienne à l'autre, sa conformation tridimensionnelle peut varier entraînant ainsi des réponses pro-inflammatoires différentes (Netea et al., 2002).

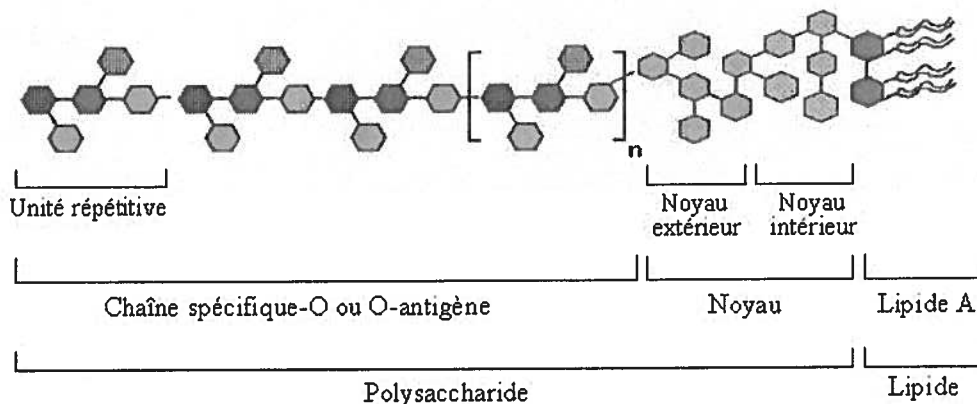


Figure 1 : Structure du LPS

Le LPS est composé d'une portion polysaccharidique et d'une portion lipidique. La chaîne spécifique-O ou O-antigène est unique à chaque type de LPS et sert ainsi à déterminer le sérotype d'une bactérie. Pour sa part, le lipide A est responsable de l'activité biologique et de la toxicité du LPS.

(Lüderitz, O *et al.* Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. In Razin S, Rotten S (eds) Current Topics in membranes and transport, vol 17. Academic, New York. 1982. pp 79-151)

1.4.2 Récepteur

Considéré tout d'abord comme un simple marqueur de différenciation exprimé à la surface du monocyte et du macrophage, CD14, une glycoprotéine attachée à la surface cellulaire via une ancre GPI, a par la suite été décrit comme le principal récepteur du LPS (Bazil et al., 1989; Haziot et al., 1988; Wright et al., 1990). Étant donné que CD14 ne possède pas de région cytoplasmique, l'initiation du signal induit par le LPS dépend ainsi d'une autre molécule de signalisation (Haziot et al., 1996; Perera et al., 1997). Récemment, le clonage et la caractérisation des membres de la famille des TLRs a permis d'identifier TLR4 comme le récepteur qui initie la cascade de signalisation induite par le LPS (Poltorak et al., 1998). Des études révèlent que TLR2 peut aussi de façon exceptionnelle distinguer des formes de LPS qui sont structurellement différentes de celles reconnues par TLR4 (Netea et al., 2002).

1.4.3 Voie de signalisation majeure

L'identification des principales protéines associées à TLR4 a permis de préciser la cascade de signalisation médiée par ce récepteur en réponse au LPS (Voir figure 2).

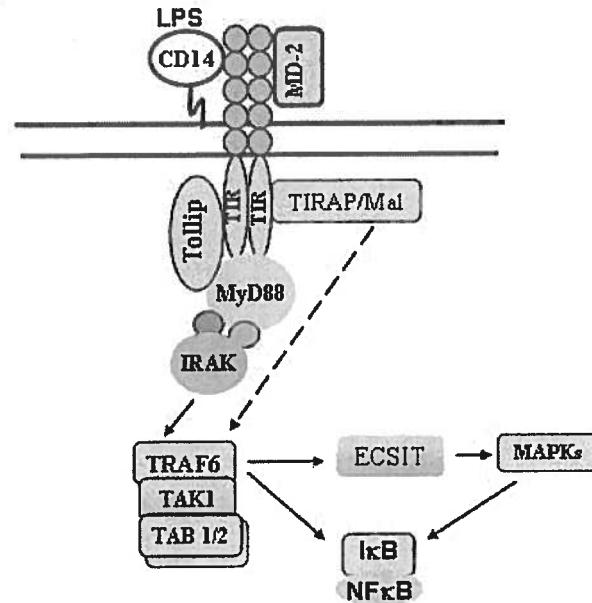


Figure 2: Cascade de signalisation médiée par TLR4 en réponse au LPS

Suite à la liaison du LPS au complexe CD14/TLR4/MD-2, il y aura recrutement de MyD88 au domaine TIR de TLR4 conduisant à l'activation d'IRAK, au recrutement de TRAF6 et ultimement à l'activation de NFκB. La protéine TIRAP, aussi connue sous le nom de Mal, fait partie du mécanisme de signalisation indépendant de MyD88. ECSIT (Evolutionary Conserved Signaling Intermediate in Toll pathway) est une protéine intermédiaire additionnelle qui relie TRAF6 à la voie des MAPKs (JNK, p38 et ERKs).

(Lien, E and Ingalls, RR. Toll-like receptors. 2002. Crit Care Med.)

Brièvement, le LPS lie la LBP présente dans le sérum, ce qui facilite son interaction avec le CD14 (Schumann et al., 1990) qui est lui-même physiquement associé avec un complexe composé de TLR4 et de MD-2, une molécule accessoire extracellulaire essentielle à la reconnaissance du LPS (Lien and Ingalls, 2002; Shimazu et al., 1999; Underhill and Ozinsky, 2002b). Par la suite, TLR4 s'homodimérise et la protéine adaptatrice MyD88, présente dans le cytoplasme, est recrutée via son domaine TIR au domaine cytoplasmique du récepteur. Ceci entraîne alors le recrutement et la phosphorylation d'IRAK, le recrutement de TRAF-6 et ultimement l'activation du facteur

de transcription NF- κ B (Aderem and Ulevitch, 2000; Akira et al., 2001; Cao et al., 1996; Lien and Ingalls, 2002). NF-IL6, AP-1, PU.1 et c-jun/ATF2 sont aussi des médiateurs intracellulaires reconnus pour leur implication dans la transcription des gènes exprimés en réponse au LPS (Sweet and Hume, 1996).

Différentes études basées sur l'utilisation de souris MyD88^{-/-} révèlent que l'activation de NF- κ B peut être médiée indépendamment de cette protéine adaptatrice (Kaisho et al., 2001; Kawai et al., 1999; Seki et al., 2001). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par l'identification de TIRAP, une molécule adaptatrice associée à TLR4, aussi connue sous le nom de Mal, responsable de la transduction du signal via un mécanisme indépendant de MyD88 (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001).

2. Protéine Kinase C (PKC)

2.1 Caractéristiques

Nishizuka et collaborateurs ont tout d'abord décrit la PKC comme une kinase cytoplasmique, dépendante des phospholipides et du Ca²⁺ intracellulaire, capable de phosphoryler les histones sur des résidus sérine (Takai et al., 1977). Il a par la suite été établi que l'activité de PKC était régulée par le DAG, un produit dérivé du cycle des phosphatidylinositols considéré comme un second messenger majeur, ainsi que par les phorbols esters (Castagna et al., 1982; Kishimoto et al., 1980). Bien qu'initialement on croyait que PKC ne constituait qu'une seule entité, plusieurs études ont révélé que PKC est plutôt une famille de protéine sérine/thréonine kinases regroupant plusieurs membres (Nishizuka, 1992). PKC possède un rôle central dans la signalisation et conséquemment, elle est associée à diverses fonctions cellulaires régulatrices comprenant la modulation de la sécrétion, l'activation cellulaire, la mitogenèse, la tumorigenèse et la différenciation (Blobe et al., 1996).

2.1.1 Mécanisme d'activation

De façon classique, le Ca^{2+} , les phospholipides membranaires et le DAG agissent de concert pour activer PKC. La PLC β 1 provoque le clivage du PIP₂ en DAG et en IP₃. Ce dernier initie la hausse des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire en interagissant avec des récepteurs spécifiques situés sur le réticulum endoplasmique (Berridge, 1993). L'augmentation des niveaux de calcium permet à PKC de transloquer à la membrane et de s'y associer en se liant à des PS (Hannun et al., 1985; Takai et al., 1979). Des études réalisées par Hannun et collaborateurs démontrent que suite à son association avec la membrane, PKC demeure inactive et que son interaction subséquente avec le DAG est essentielle à son activation (Hannun et al., 1985; Hannun et al., 1986). Les phorbols esters, comme par exemple le TPA, sont des composés relativement stables qui miment l'action du DAG et qui activent PKC par le même mécanisme (Castagna et al., 1982; Hannun and Bell, 1986).

Depuis que le DAG a été décrit comme un important activateur de PKC (Kishimoto et al., 1980), de nombreux autres composés lipidiques pouvant agir sur PKC en tant qu'activateurs ou que co-facteurs ont été suggérés, incluant différents produits dérivés du cycle des PI (PIP₂ et PIP₃), l'AA ainsi que les lysophospholipides produits par la PLA₂ et le PA produit par la PLD (Blobe et al., 1996).

2.1.2 Isoenzymes

À la fin des années 1980, le clonage et le séquençage du gène de PKC ont permis l'identification et la caractérisation des douze (12) isoenzymes qui composent cette famille de protéine sérine-thréonine kinases (Blobe et al., 1996). À cause de leur structure et des co-facteurs qui régulent leur activité, ces différents isoenzymes peuvent être classés en trois (3) groupes principaux (Voir figure 3) : les PKC classiques (cPKC : α , β I et β II, γ) regroupent les isoenzymes dont l'activité est dépendante du DAG et du Ca^{2+} intracellulaire. Pour leur part, les PKC nouvelles (nPKC : δ , ϵ , η , μ et θ) et les PKC atypiques (aPKC : ζ , ι et λ) sont deux groupes distincts composés d'isoenzymes

indépendants du Ca^{2+} intracellulaire. Au contraire des nPKC, les aPKC sont également indépendantes du DAG (Nishizuka, 1995).

La structure primaire de chacun des isoenzymes de PKC est divisée en quatre domaines fonctionnels et conservés (C1-C4) qui sont séparés par cinq régions variables (V1-V5). La protéine complète ne contient qu'une seule sous-unité composée de deux parties distinctes séparées par une région charnière (V3). La première partie étant le domaine de régulation situé en N-terminal (V1-C2) et la deuxième le domaine catalytique en C-terminal (C3-V5) (Voir Figure 3) (Hug and Sarre, 1993; Nishizuka, 1988).

Situées au niveau du domaine régulateur en N-terminal, les régions C1 et C2 régulent l'activation de PKC tandis que les régions C3 et C4 localisées en C-terminal sont impliquées dans son activité catalytique. Localisé au début de la région C1, le pseudosubstrat possède des caractéristique autorégulatrices en inhibant l'enzyme par sa liaison au site catalytique (House and Kemp, 1987; Soderling, 1990). Chez les cPKC et les nPKC, la région C1 est constituée de 2 régions riches en résidus cystéine répétées en tandem qui permettent la liaison des phorbols esters et du DAG (Kaibuchi et al., 1989; Quest et al., 1994). Ne présentant qu'une seule région riche en résidus cystéine, les aPKC demeurent insensibles au DAG et aux phorbols esters et sont activés par la céramide et le PIP_3 (Nishizuka, 1992). La région C2, absente chez les isoenzymes indépendants du Ca^{2+} (nPKC et aPKC), représente le site de liaison pour ce second messager (Parker et al., 1986). D'ailleurs, cette région contient des séquences d'homologie avec d'autres protéines liant le Ca^{2+} , notamment la PLA_2 (Clark et al., 1991) et la $\text{PLC}\gamma$ (Stahl et al., 1988). En C-terminal, le domaine kinase est composé de la région C3 contenant le site de liaison à l'ATP (Huang, 1989) et de la région C4 principalement responsable de lier les différents substrats de l'enzyme (Kemp and Pearson, 1990; Taylor et al., 1990).

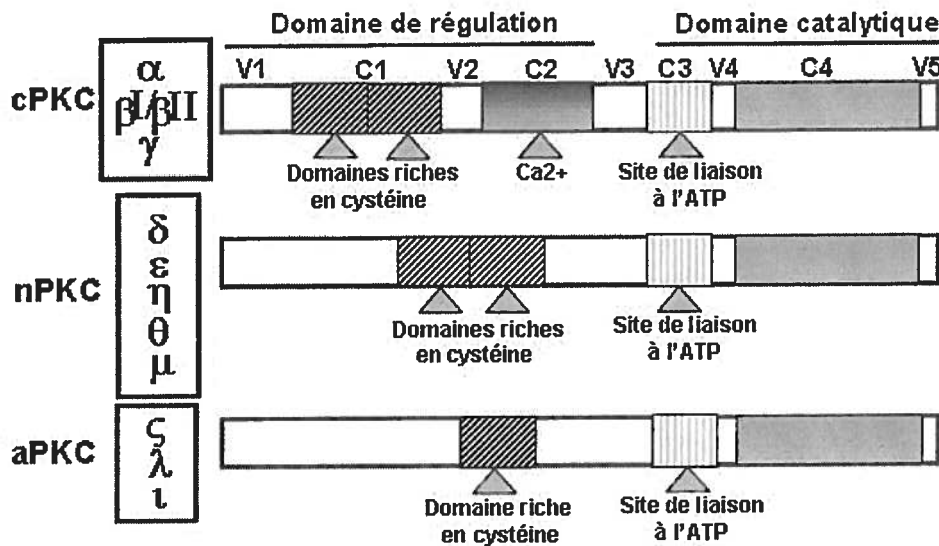


Figure 3: Isoenzymes de la famille des PKC

La famille des PKC est composée de 12 isoenzymes classés en 3 groupes principaux selon leur structure et les co-facteurs qui régulent leur activité. Chacun des isoenzymes contient deux parties: le domaine de régulation et le domaine catalytique. Ces deux domaines contiennent des régions constantes (C1-C4) et des domaines variables (V1-V5). À noter que le macrophage exprime 7 isoenzymes : α , β I et β II, ε , δ , ζ , η .

(Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. 1992 *Science*)

2.2 Implication de PKC dans la réponse inflammatoire

Le macrophage exprime sept (7) isoenzymes (α , β I et β II, ε , δ , η , ζ) (Fujihara et al., 1994; Liu et al., 1994; Mischak et al., 1991) et les différences au niveau de leur structure, des co-facteurs requis pour leur activation, de leur localisation intracellulaire ainsi que de la spécificité pour leurs substrats suggèrent que chacun de ces isoenzymes exercent des fonctions cellulaires spécifiques (Nishizuka, 1992). Depuis quelques années, un nombre croissant de travaux ont d'ailleurs permis de préciser la contribution de ces différents isoenzymes dans la modulation des fonctions du macrophage.

En sécrétant plusieurs médiateurs solubles tels que les PGE₂ et diverses cytokines pro-inflammatoires, le macrophage joue un rôle central dans l'initiation et la modulation de la réponse inflammatoire. De nombreuses études indiquent que PKC participe à l'inflammation, notamment en régulant l'expression de COX-2 ainsi que d'autres médiateurs pro-inflammatoires dans plusieurs systèmes cellulaires en réponse à divers stimuli.

2.2.1. La cyclooxygénase (COX)-2 et la sécrétion de PGE₂

Les prostanoïdes sont associés à différentes conditions physiologiques et pathologiques incluant l'inflammation, la vasodilatation, la vasoconstriction, la fonction rénale, la régulation des réponses immunitaires, la résorption osseuse et l'ovulation (Patrono et al., 2001; Xie, 1992). En plus de regrouper les prostacyclines et les TXs qui jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie vasculaire, ce terme comprend aussi les PGs qui pour leur part sont de puissants médiateurs inflammatoires ainsi que d'importants immunomodulateurs (Phipps et al., 1991; Voet, 1990). La biosynthèse des prostanoïdes dépend d'une cascade de réactions comprenant 3 étapes principales. Tout d'abord, l'action de PLA₂ sur les phospholipides membranaires permet la libération de l'AA, un précurseur majeur des prostanoïdes. Ce dernier est subséquentement oxygéné par les COXs produisant ainsi un intermédiaire instable, PGH₂, lequel est converti par des synthases spécifiques en différents composés actifs incluant les PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ et les TXA₂ (Marnett et al., 1999; Smith et al., 2000). Deux isoformes de ces enzymes-clé ont été identifiés, COX-1 et COX-2, lesquels sont les cibles pharmacologiques des NSAIDs (Langenbach et al., 1995). Malgré que ces deux isoenzymes catalysent la même réaction, ils diffèrent au niveau de leurs fonctions biologiques respectives (Smith et al., 1996; Wen et al., 1993). COX-1 est exprimé dans la plupart des tissus de façon constitutive et synthétise les PGs impliquées dans la régulation de l'homéostasie (Dubois et al., 1998; Roth and Calverley, 1994) tandis que COX-2 est inductible et contribue plutôt à produire les PGs responsables de médier l'inflammation, la douleur et la fièvre (Hinson et al., 1996; Morham et al., 1995). Clairement associée à l'arthrite rhumatoïde (Lipsky and Isakson, 1997), la protéine COX-2 semble aussi

associée à d'autres types de pathologies telles que le cancer du côlon (Singer et al., 1998) et la maladie d'Alzheimer (Breitner, 1996).

Tel qu'observé chez le macrophage murin et humain (Bachwich et al., 1986; Barrios-Rodiles and Chadee, 1998; Hla and Neilson, 1992; Lee et al., 1992), l'ARNm de COX-2 est exprimé en réponse à l'IL-1 β , au LPS et aux phorbols esters chez le monocyte humain (Hla and Neilson, 1992; Vane et al., 1994). Des résultats indiquent que l'induction de COX-2, en réponse au LPS, peut être inhibée par l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 tandis qu'en réponse à l'IFN- γ aucun effet significatif n'a été observé sur la synthèse de PGE₂ (Endo et al., 1996). Chez la lignée de macrophages murins RAW 264.7, l'accumulation d'ARNm de COX-2 est induite par une combinaison de LPS et d'IFN- γ , mais non en réponse à l'IFN- γ seul (Riese et al., 1994). Malgré qu'en réponse au LPS le gène COX-2 soit aussi exprimé chez les macrophages humains U-937 différenciés au PMA, un pré-traitement à l'IFN- γ est nécessaire pour induire l'expression du gène en réponse au TNF- α (Arias-Negrete et al., 1995). En plus des médiateurs solubles, certains pathogènes comme le parasite intracellulaire obligatoire *Leishmania donovani* augmentent la synthèse des PGE₂, possiblement en altérant les voies de signalisation qui conduisent à l'expression des COXs (Matte et al., 2001; Reiner and Malemud, 1984; Reiner and Malemud, 1985).

L'ensemble de ces observations a permis d'approfondir nos connaissances concernant la régulation de l'expression de COX-2 en réponse à divers stimuli chez les monocytes/macrophages. Par ailleurs, les mécanismes de transduction des signaux conduisant à l'expression de COX-2 et à la synthèse des PGE₂ ne sont pas encore complètement élucidés. Jusqu'à tout récemment, la plupart des travaux visant à définir ces mécanismes reposaient sur l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs de protéines kinases. Par exemple, des observations antérieures démontrent que l'expression de COX-2 induite par le LPS et l'IL-1 β est diminuée de façon significative par divers inhibiteurs de PTK (Akarasereenont and Thiemermann, 1996). L'utilisation d'inhibiteurs et d'activateurs de PKC chez la lignée de macrophages murins RAW 264.7 ainsi que chez des macrophages péritonéaux suggère un rôle pour PKC dans la synthèse des PGE₂

(Burch, 1987; Pfannkuche et al., 1986). De plus, la synthèse de PGE₂ observée chez des macrophages humains U-937 infectés avec des promastigotes de *L. donovani* implique possiblement l'expression de COX-2 via un mécanisme dépendant de PKC. Cette même étude suggère également que la synthèse des PGE₂ nécessite des événements moléculaires empruntant la voie des PTK (Matte et al., 2001).

D'autres approches ont également été utilisées dans différents systèmes cellulaires afin d'étudier la fonction spécifique des isoenzymes de PKC dans la modulation de l'expression de COX-2 et de la sécrétion des PGE₂. Chez le rat, la surexpression de PKC- ζ entraîne une augmentation significative de l'expression basale de COX-2 et de la sécrétion des PGE₂ dans des cellules de rein (Miller et al., 1997). La synthèse de PGE₂ par des macrophages dérivés de souris PKC- $\epsilon^{-/-}$ est fortement inhibée en réponse au LPS et à l'IFN- γ (Castrillo et al., 2001). Des expériences de transfections transitoires utilisant différents vecteurs d'expression pour les formes sauvage et DN de PKC- ϵ , ζ et δ ont également permis de démontrer un rôle pour ces protéines dans l'activité transcriptionnelle de COX-2 en réponse au LPS chez la lignée de macrophages murins RAW 264.7 et la lignée monocyttaire humaine THP-1 (Mestre et al., 2001). Une augmentation de l'expression de COX-2 induite par les phorbol esters a été démontré au niveau des cellules de l'épiderme chez des souris transgéniques PKC- α (Wang and Smart, 1999).

2.2.2 Expression de diverses cytokines et médiateurs solubles

En plus d'être impliquée dans l'expression de COX-2 et la synthèse des PGE₂, PKC module la réponse inflammatoire et l'activité anti-microbienne en contribuant également à la transcription de cytokines pro-inflammatoires ou autres médiateurs solubles, comme le NO.

Chez la lignée de macrophage murin J774, l'inhibition de divers isoenzymes de PKC due à un traitement prolongé aux phorbols esters révèle que PKC- β II participe à l'expression d'iNOS et à la sécrétion de NO induites par le LPS (Fujihara et al., 1994). Des expériences de transfections transitoires ont montré que l'expression d'iNOS induite

par le PMA est également régulée par PKC- ϵ chez la lignée de macrophages murins RAW 264.7 (Diaz-Guerra et al., 1996). Un rôle critique pour PKC- ϵ dans la signalisation en réponse au LPS a été mis en évidence chez des macrophages dérivés de souris PKC- ϵ ^{-/-}, lesquels présentent une réponse sévèrement atténuée au LPS et à l'IFN- γ , caractérisée par une diminution importante de la production de NO, TNF- α et IL-1 β (Castrillo et al., 2001). L'utilisation d'oligodéoxyribonucléotides antisens indique que PKC- α , β I et δ contribuent à l'expression d'iNOS et à la sécrétion de NO induites par le LPS par une voie de signalisation qui implique le facteur de transcription NF- κ B (Chen et al., 1998).

Dans le but d'étudier le rôle de PKC- α dans la modulation des fonctions du macrophage, nous avons choisi de surexprimer un mutant DN de PKC- α dans la lignée de macrophages murins RAW 264.7. La mutation (K368D) est située dans le site de liaison de l'ATP rendant ainsi l'enzyme catalytiquement inactive (St-Denis et al., 1998). Le principe du DN consiste à établir une compétition entre l'isoenzyme α muté et endogène. Des résultats non-publiés (St-Denis et Descoteaux) démontrent que la surexpression du mutant DN de PKC- α n'affecte pas l'expression des autres isoenzymes présents chez le macrophage, par contre l'impact spécifique sur l'activité de ces isoformes n'a pas été étudié. Cette approche nous a permis de démontrer que PKC- α est impliquée dans l'expression d'iNOS, GM-CSF, IL-1 α et β ainsi que dans la sécrétion de NO et d'IL-1 β en réponse au LPS (Chano and Descoteaux, 2002; St-Denis et al., 1998). L'inhibition de la production NO en réponse au LPS est visiblement une conséquence directe de la surexpression du DN de PKC- α puisque les niveaux de NO sécrétés dans des clones surexprimant une forme sauvage de PKC- ζ sont similaires à ceux observés chez les cellules RAW 264.7 témoins (St-Denis et al., 1998). Par contre, l'expression et la sécrétion de TNF- α , la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B ainsi que la phosphorylation des protéines p38 et JNK sont normales chez les macrophages exprimant le mutant DN PKC- α (St-Denis et al., 1998). Bien que la translocation nucléaire de NF-IL6 n'est pas affectée chez les macrophages exprimant le mutant DN PKC- α , nous avons toutefois observé qu'en réponse au LPS sa liaison à l'ADN est diminuée par la surexpression du mutant DN PKC- α . Des expériences de transfections

transitoires ont également fourni une évidence additionnelle de l'implication de PKC- α dans l'activation de NF-IL6 induite par le LPS (Chano and Descoteaux, 2002). Ces observations suggèrent que la régulation de l'activité transcriptionnelle de NF-IL6 constitue un des mécanismes par lesquels PKC- α module la transcription de gènes exprimés lors de la réponse inflammatoire induite par le LPS (Chano and Descoteaux, 2002).

3. Interféron (IFN)- γ

3.1 Caractéristiques

À l'origine, le terme IFN a été utilisé pour décrire un agent qui interférait avec la réplication virale (Isaacs, 1957). Classifiés tout d'abord par rapport aux cellules qui les sécrètent, les différents types d'IFN sont maintenant divisés en 2 classes (type I et II) dépendamment de leur récepteur et de leur homologie de séquence (Schroder et al., 2003). Malgré que chacun des types d'IFN soient sécrétés à divers niveaux dans des conditions particulières, il apparaît de plus en plus évident que ces deux systèmes ont évolué en développant des activités chevauchantes mais non-redondantes pour permettre de contrer un spectre plus large de pathogènes (Kimura et al., 1996; Muller et al., 1994). Les IFNs de type I regroupent l'IFN- α , l'IFN- β , l'IFN- ω et l'IFN- τ , lesquels partagent une structure similaire et un récepteur hétérodimérique commun, l'IFNAR, formé par deux chaînes distinctes l'IFNAR1 et l'IFNAR2. Bien que ces types d'IFNs soient sécrétés en faibles quantités par la plupart des cellules en réponse à une infection virale (Bach et al., 1997; Jonasch and Haluska, 2001), les principales cellules productrices sont les cellules hématopoïétiques (IFN- α et IFN- ω) et les fibroblastes (IFN- β) (Bach et al., 1997). La sécrétion de l'IFN- τ n'a été observée jusqu'à maintenant que chez les ruminants (Bazer et al., 1997).

Unique IFN de type II, l'IFN- γ , appelé aussi «Macrophage-activating factor», est un puissant activateur du macrophage. En plus d'induire directement ses mécanismes antitumoraux et antimicrobiens, l'exposition du macrophage à l'IFN- γ amplifie ses

mécanismes de présentation antigénique (Schroder et al., 2003). Il contribue aussi à la migration des leukocytes et influence la croissance, la maturation et la différenciation de plusieurs types cellulaires (Boehm et al., 1997; Perussia et al., 1983). Cette cytokine régule également l'activité des cellules NK (Carnaud et al., 1999) et les fonctions des lymphocytes B (Finkelman et al., 1988). L'IFN- γ est sécrété principalement par les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1, les cellules T CD8⁺ et les cellules NK (Bach et al., 1997; Young, 1996). La synthèse d'IFN- γ n'est toutefois pas exclusive à ces types cellulaires parce que des observations récentes suggèrent que cette cytokine est sécrétée par les lymphocytes B, les cellules NKT et les CPAs professionnels (Flaishon et al., 2000; Frucht et al., 2001; Harris et al., 2000). La sécrétion d'IFN- γ est essentiellement contrôlée par des cytokines produites par les CPAs, spécialement l'IL-12 et l'IL-18 (Dinarello, 1999; Golab et al., 2000; Munder et al., 2001).

3.2 Signalisation

L'IFN- γ ne se distingue pas des IFNs de type I qu'au niveau de sa structure, cette cytokine se lie aussi à un récepteur différent (Bazan, 1990). Plusieurs travaux ont permis d'identifier la structure ainsi que la fonction du récepteur de l'IFN- γ (IFNGR). Ces nouvelles connaissances ont favorisé l'élaboration d'un modèle de transduction des signaux qui s'applique aussi bien à la signalisation par l'IFN- γ qu'à la signalisation via d'autres membres de la superfamille des récepteurs de cytokines (Darnell et al., 1994; Subramaniam et al., 2001).

3.2.1 Récepteur

L'IFNGR est exprimé à la surface de presque tous les types cellulaires, sauf possiblement les érythrocytes matures, et présente une spécificité d'espèce très stricte quant à sa capacité à lier l'IFN- γ (Farrar and Schreiber, 1993). Le récepteur fonctionnel comprend différentes protéines de signalisation associées à 2 chaînes α (ou IFNGR1) ainsi qu'à 2 chaînes β (ou IFNGR2) (Voir Figure 4). Les chaînes α sont principalement responsables de l'interaction avec le ligand (Bach et al., 1996; Kotenko et al., 1995),

tandis que les chaînes β possèdent une fonction majeure dans la transduction des signaux (Bach et al., 1997; Soh et al., 1994).

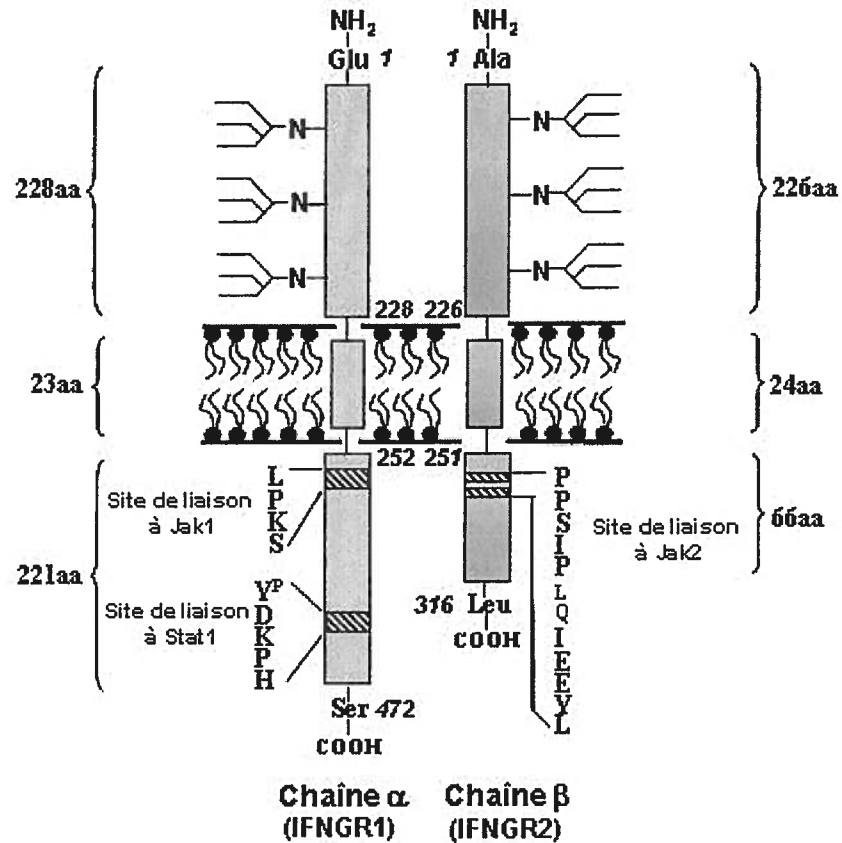


Figure 4: Structure du récepteur de l'IFN- γ

Le récepteur de l'IFN- γ (IFNGR) est composé de deux polypeptides: la chaîne α et la chaîne β . Le domaine intracellulaire de la chaîne α contient deux séquences essentielles: (1) une séquence ²⁶⁶LPKS²⁶⁹ requise pour l'association de la chaîne α avec la protéine tyrosine kinase Jak1 et (2) une séquence ⁴⁴⁰YDKPH⁴⁴⁴ qui, lorsque phosphorylée, sert au recrutement de Stat1. Pour sa part, la chaîne β contient dans sa région intracellulaire un domaine composé de deux séquences requises pour la liaison de Jak2.

(Bach, A.E., Aguet, M. and Schreiber, R.D. The IFN- γ Receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. 1997. Annu. Rev. Immunol.)

Étant dépourvues d'activité kinase et/ou phosphatase, les chaînes α et β de l'IFNGR s'associent à une machinerie de signalisation spécifique indispensable à la phosphorylation du récepteur, à la transduction du signal et par conséquent, à l'induction des réponses biologiques. Les protéines Jak1 et Stat1 s'associent au domaine intracellulaire de la chaîne α , tandis que la protéine Jak2 se lie à une région intracellulaire

de la chaîne β (Farrar et al., 1992; Farrar et al., 1991; Kaplan et al., 1996; Kotenko et al., 1995) (Voir Figure 4). Au cours de la transduction du signal, la phosphorylation du résidu tyrosine 440 situé sur la chaîne α sert principalement au recrutement de Stat1 (Farrar et al., 1992; Farrar et al., 1991). À noter que la chaîne β ne subit pas de phosphorylation sur résidu tyrosine (Kotenko et al., 1995).

L'importance de l'IFN- γ et surtout de son récepteur au sein des mécanismes de défense de l'hôte a été mise en évidence chez des souris déficientes pour l'IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) ou pour la chaîne α du récepteur (IFNGR1 $^{-/-}$). Ces souris ne présentent aucun retard majeur de croissance et leur système immunitaire se développe normalement (Huang et al., 1993). Par contre, elles montrent d'évidentes déficiences dans leur capacité à résister aux bactéries, parasites et infections virales notamment face au virus de la vaccine, au virus de l'encéphalomyélite de Theiler, à *Leishmania major*, à *Toxoplasma gondii*, à *Listeria monocytogenes* et à de nombreuses espèces de mycobactéries, incluant *M. bovis* and *M. avium* (Pearl et al., 2001; van den Broek et al., 1995). En plus des infections récurrentes, une diminution de la motilité des neutrophiles et de l'activité des cellules NK chez les enfants dont la production d'IFN- γ est déficiente soulignent aussi l'importance de l'IFN- γ tant au niveau des réponses inflammatoires qu'immunitaires (Davies et al., 1982). Des travaux récents basés sur le cas d'un enfant possédant une déficience complète de l'IFNGR1 confirment l'importance du récepteur de l'IFN- γ dans le développement d'une réponse immunitaire adéquate. Cet enfant souffrait d'infections mycobactériennes sévères et du sarcome de Kaposi, il a succombé à ces maladies à l'âge de 12 ans. Des anticorps anti-HHV-8 ont également été détectés dans le sérum de ce patient. Les auteurs concluent que des déficiences dans l'immunité médiée par l'IFN- γ entraîne une prédisposition au sarcome de Kaposi chez des enfants infectés par HHV-8 (Camcioglu et al., 2004). Casanova *et al.* ont également identifié des auto-anticorps dirigés contre l'IFN- γ chez un patient décédé des suites d'infections disséminées à *M. tuberculosis* et *M. chelonae* (Doffinger et al., 2004).

3.2.2 Voie des Jak-Stat

Utilisée par plus de 50 cytokines, facteurs de croissance et hormones pour réguler l'expression de nombreux gènes, la voie des Jak-Stat représente un des mécanismes majeurs pour la signalisation par l'IFN- γ (Ihle and Kerr, 1995; Subramaniam et al., 2001). Elle implique le recrutement séquentiel du récepteur suivi par l'activation des membres de la famille des protéine tyrosine kinases Jak ainsi que de la famille des protéines Stat.

3.2.2.1 Protéines Jak

Chez les mammifères, 4 protéines Jak ont été identifiées: Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2 (Krolewski et al., 1990; Rane and Reddy, 1994; Wilks et al., 1991). Contrairement à Jak1, Jak2 et Tyk2 qui sont exprimées de façon ubiquitaire, Jak3 est exprimée constitutivement chez les cellules NK et les thymocytes tandis que son expression est inductible chez les cellules T, les cellules B et les cellules myéloïdes (Gurniak and Berg, 1996; Kawamura et al., 1994; Sharfe et al., 1997). Jak3 est aussi exprimée chez les cellules musculaires lisses et au niveau de l'endothélium (Verbsky et al., 1996).

Plusieurs fonctions sont attribuées aux protéines Jak, notamment dans la signalisation intracellulaire en réponse à diverses cytokines, dont l'IFN- γ , dans le développement et possiblement dans l'oncogenèse (Danial et al., 1995; Meydan et al., 1996; Migone et al., 1995; Zhang et al., 1996). Les protéines Stat sont les principaux substrats des protéines Jak et leur identification a d'ailleurs contribué à mieux caractériser les mécanismes moléculaires qui modulent l'expression des gènes induits par plusieurs cytokines (Leonard and O'Shea, 1998).

3.2.2.2 Protéines Stat

Les protéines Stat sont une famille de facteurs de transcription comprenant sept (7) membres qui sont, chez les mammifères, Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b et Stat6 (Akira, 1999).

La dimérisation (hétéro- ou homo-) est indispensable au fonctionnement des protéines Stat (Leonard and O'Shea, 1998). La structure de ces protéines contient différentes régions qui leur permettent de s'associer entre elles. Par exemple, leur extrémité C-terminal contient un résidu tyrosine qui permet la dimérisation de la protéine lorsque phosphorylé (Horvath and Darnell, 1997; Schroder et al., 2003). La présence d'un domaine SH2 joue également un rôle important dans la fonction des protéines Stat en leur permettant de lier des résidus tyrosine phosphorylés (Shuai et al., 1994; Shuai et al., 1993). Chez certaines protéines Stat, on a identifié un résidu sérine, lequel lorsque phosphorylé amplifie l'activation de la molécule (Uddin et al., 2003; Xu et al., 2003). D'ailleurs, plusieurs études indiquent que la phosphorylation de Stat1 sur le résidu sérine 727 est essentielle pour maximiser son activité transcriptionnelle (Decker and Kovarik, 2000; Goh et al., 1999; Wen et al., 1995; Zhang et al., 1995).

3.2.2.3 Modèle d'activation de la voie des Jak-Stat en réponse à l'IFN- γ

Tel qu'indiqué dans le Tableau 1, la génération de souris déficientes pour diverses protéines Jak et Stat (Voir Tableau 1) a permis de déterminer la signification physiologique de la voie des Jak-Stat. Le Tableau 2 démontre que chaque récepteur de cytokine est associé à un groupe distinct de protéines Jak et Stat et l'IFN γ s'associe spécifiquement aux protéines Jak1, Jak2 et Stat1.

Tableau 1: Phénotypes observés chez des souris déficientes pour diverses protéines Jak et Stat

Jak

Jak1: Mort périnatale

Jak2: Mort au stade embryonnaire. Déficiences au niveau de l'érythropoïèse.

Jak3: Immunodéficiência sévère

Tyk2: Non reporté

Stat

Stat1: Déficiences au niveau de la signalisation en réponse aux IFN de type I et II. Provoque une déficiences dans la réponse aux infections microbiennes.

Stat2: Non reporté

Stat3: Mort au stade embryonnaire

Stat4: Déficiences au niveau de la réponse à l'IL-12 affectant donc le développement de la réponse Th1

Stat5a: Déficiences du développement de la glande mammaire et de la lactogénèse.

Stat5b: Réduction de la fertilité. Déficiences dans la signalisation par le GM-CSF chez les macrophages de moëlle osseuse. Expression de l'IL-2R α en réponse à l'IL-2 déficiente chez les cellules spléniques.

Stat6: Déficiences au niveau de la réponse à l'IL-4 affectant donc le développement de la réponse Th2

Tableau 2: Activation des protéines Jak et Stat en réponse à diverses cytokines

Jak1: IFN α/β , **IFN- γ** , IL-6, IL-11, Oncostatine M, LIF (**L**eukemia **I**nhibitory **F**actor), CNTF (**C**iliary **N**eutrophilic **F**actor), G-CSF, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor), PDGF (**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor), CSF (**C**olony **S**timulating **F**actor)-1

Jak2: **IFN- γ** , IL-6, Oncostatin M, LIF, CNTF, Leptine, IL-12, IL-3, IL-5, GM-CSF, EPO (Érythropoïétine), GH (**G**rowth **H**ormone) Prolactine, G-CSF, EGF, PDGF, CSF-1

Jak3: IL-2, IL-4, IL-7, IL-19, IL-15

Tyk2: IFN- α/β , IL-10, IL-6, IL-12

Stat1: IFN α/β , **IFN- γ** , IL-10 (+/-), IL-6, IL-11, Oncostatine M, LIF (**L**eukemia **I**nhibitory **F**actor), CNTF (**C**iliary **N**eutrophilic **F**actor), G-CSF, IL-2 (+/-), IL-7 (+/-), GH (+/-), Prolactine (+/-), G-CSF, EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor), PDGF (**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor), CSF (**C**olony **S**timulating **F**actor)-1

Stat2: IFN- α

Stat3: IFN α/β , IL-10, IL-6, IL-11, Oncostatine M, LIF (**L**eukemia **I**nhibitory **F**actor), CNTF (**C**iliary **N**eutrophilic **F**actor), Leptine, IL-12, IL-2 (+/-), IL-7 (+/-), IL-9 (+/-), GH, G-CSF, G-CSF, EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor), PDGF (**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor)

Stat4: IL-12

Stat5a/b: IFN- α , IL-10, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, EPO, GH, Prolactine, G-CSF, Leptine

Stat6: IL-4, IL-13, Leptine

(Leonard, WJ. and O'Shea JJ. JAKS AND STATS: Biological Implications. 1998. Annu. Rev. Immunol. 16:293-322)
(Liu, KD., Gaffen SL. and Goldsmith MA. JAK/STAT signaling by cytokines receptors. 1998. Curr. Opin. Immunol. 10: 271-278)

La Figure 5 illustre le modèle de signalisation induit en réponse à l'IFN- γ (Bach et al., 1996). Chez les cellules non-stimulées, les sous-unités α et β de l'IFNGR ne sont pas associées entre elles mais leur domaine intracytoplasmique est associé spécifiquement aux protéines Jak1 et Jak2 (Kaplan et al., 1996; Kotenko et al., 1995; Sakatsume et al., 1995). En réponse à l'IFN- γ , l'assemblage du récepteur complet, contenant 2 sous-unités α et 2 sous-unités β , permet la juxtaposition des protéines Jak inactives qui y sont associées. Jak1 et Jak2 s'activent l'une et l'autre par phosphorylation sur résidus tyrosine. Ensuite elles phosphorylent le résidu tyrosine 440 sur chacune des sous-unités α du récepteur créant ainsi deux sites de recrutement pour Stat1. Deux molécules Stat1 s'associent aux sous-unités α via leur domaine SH2 et sont rapidement phosphorylées sur le résidu tyrosine 701 par les protéines Jak. Les protéines Stat1 phosphorylées se dissocient et s'homodimérisent. L'homodimère Stat1 est également phosphorylé sur le résidu sérine 727 (David et al., 1995b; Nguyen et al., 2001; Wen et al., 1995) avant de transloquer au noyau où il se lie aux séquences promotrices spécifiques (ex: GAS, ISRE) de nombreux gènes pour activer leur transcription.

L'absence de réponse à l'IFN- α/β et à l'IFN- γ chez des souris déficientes pour la protéine Stat1 (Voir Tableau 1) entraîne une grave susceptibilité aux infections virales et microbiennes (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Ces observations indiquent qu'une proportion considérable de réponses biologiques sont dépendantes de Stat1. Or, des études récentes suggèrent que l'IFNGR régule l'expression de certains gènes en activant des voies de signalisation additionnelles qui sont indépendantes de Stat1 (Ramana et al., 2001; Ramana et al., 2002; Ramana et al., 2000; Roy et al., 2000). L'IFN- γ peut induire l'activation des MAPK, PyK2 et ERK1/2 (Takaoka et al., 1999), de Fyn qui fait partie de la famille des protéine kinases Src (Uddin et al., 1997), des protéines adaptatrices c-Cbl, CrKL, CrKII, et Vav (English et al., 1997; Plataniias et al., 1999) ainsi que des protéines tyrosine phosphatases SHP1 et SHP2 (You et al., 1999).

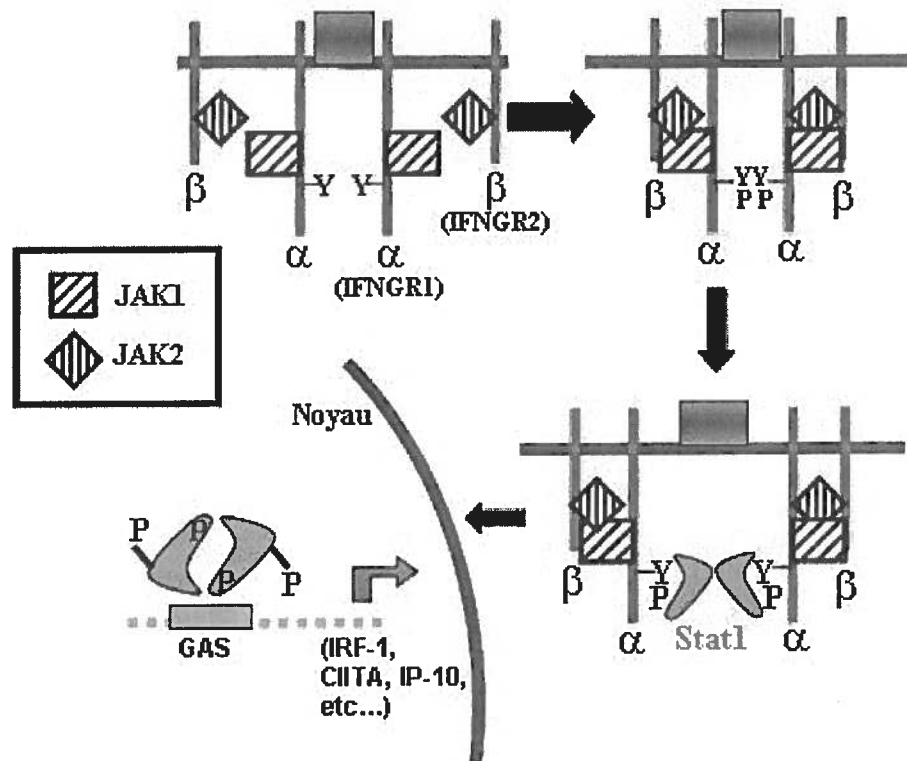


Figure 5: Modèle d'activation de la voie des JAK-STAT en réponse à l'IFN- γ

Chez les cellules non-stimulées, la chaîne α (IFNGR1) est associée avec Jak1 et la chaîne β (IFNGR2) avec Jak2. L'IFN- γ provoque l'oligomérisation des sous-unités du récepteur menant ainsi à la phosphorylation et l'activation de Jak1 et de Jak2. Les protéines Jak activées phosphorylent le résidu Y⁴⁴⁰ de la chaîne α créant un site de recrutement pour Stat1. Une fois lié au récepteur, Stat1 sera phosphorylé sur tyrosine (Y⁷⁰¹) et formera ensuite un homodimère qui transloquera au noyau, se liera à la séquence GAS sur l'ADN permettant finalement la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse à l'IFN- γ .

(Stark, GR., Kerr, IM., Williams, BRG., Silverman, RH. et Schreiber, RD. How cells respond to Interferons. 1998. Annu. Rev. Biochem.)

3.2.2.4 Régulation négative

Une activation non-contrôlée de la voie des Jak-Stat peut conduire à diverses conditions pathophysiologiques incluant des désordres hématopoïétiques, des maladies autoimmunes ou inflammatoires, une résistance à l'IFN et certains cancers (Yasukawa et al., 2000). Par conséquent, différents mécanismes agissent de concert pour réguler négativement cette voie de signalisation induite par l'IFN- γ .

Suivant la transduction du signal, le complexe formé de l'IFN- γ et de la chaîne α est internalisé pour être dissocié dans la voie endosomale (Schreiber and Farrar, 1993). Dans certains types cellulaires, la chaîne α est éventuellement recyclée à la surface de la cellule sous sa forme inactive et le ligand dégradé (Anderson et al., 1983; Celada and Schreiber, 1987; Farrar and Schreiber, 1993), tandis que chez d'autres types cellulaires l'IFN- γ induit la dégradation du récepteur internalisé ayant pour conséquence une diminution de la chaîne α à la surface de la cellule. Ce mécanisme résulte en une désensibilisation de la cellule et prévient ainsi une suractivation de la voie de signalisation (Farrar and Schreiber, 1993).

Les protéines SOCS-1 et SOCS-3 s'associent avec les protéines Jak1/2 pour interférer avec leur activité tyrosine kinase et ainsi agissent comme des inhibiteurs spécifiques de la signalisation induite par l'IFN- γ (Endo et al., 1997; Starr et al., 1997; Yasukawa et al., 1999). La surexpression des protéines SOCS-1 *in vitro* ou *in vivo* cause une perte de sensibilité face à l'IFN- γ (Fujimoto et al., 2000; Sakamoto et al., 1998) et inversement, les souris SOCS-1^{-/-} développent une hyper-sensibilité aux infections microbiennes (Alexander et al., 1999; Marine et al., 1999). L'inhibition de la signalisation induite par l'IFN- γ implique également SHP1 et SHP2, deux protéines tyrosine phosphatases ayant pour fonction de déphosphoryler le récepteur et les protéines Jak qui y sont associées (David et al., 1995a; You et al., 1999; Yu et al., 2000). McBride *et al.*, supportés par d'autres groupes, ont suggéré que la déphosphorylation de Stat1 par une phosphatase nucléaire entraîne sa dissociation de l'ADN et le recyclage, vers le cytoplasme, de la protéine inactive (Haspel and Darnell, 1999; McBride et al., 2000; Mowen and David, 2000).

3.2.2.5 Implication de PKC dans la signalisation induite par l'IFN- γ

De récentes évidences ont démontré l'implication d'isoenzymes spécifiques de PKC dans l'activation et la régulation des réponses induites par l'IFN- γ . Dans la lignée de cellules épithéliales humaines NCI-H292 l'expression d'ICAM-1 induite par l'IFN- γ

implique un mécanisme dépendant de la protéine tyrosine kinase c-Src dans lequel la PLC γ 2 et la PKC- α joue un rôle important (Chang et al., 2002; Chang et al., 2004). En ce qui concerne la phosphorylation de Stat1 sur résidus sérine, une publication récente indique que PKC- δ facilite la transcription des gènes induits par l'IFN- γ en médiant la phosphorylation sur le résidu sérine 727 de Stat1 (Deb et al., 2003). De plus, l'activation de PKC- ϵ est requise pour optimiser la phosphorylation de Stat1 médiée par les protéines Jak (Ivaska et al., 2003). Ces données indiquent que ces isoenzymes de PKC influencent l'expression de plusieurs gènes induits par l'IFN- γ à cause de leur implication dans la modulation des événements précoces de signalisation activés par l'IFN- γ . Malgré ces différentes observations, nos connaissances concernant les mécanismes d'activation de PKC en réponse à l'IFN- γ chez le macrophage restent encore relativement limitées.

3.2.3 Famille des «Interferon Regulatory Factors» (IRF)

La transcription des gènes induits par l'IFN- γ est médiée d'une part par les voies de signalisation dépendantes et indépendantes de Stat1 et d'autre part par certains facteurs de transcription de la famille des IRF (Mamane et al., 1999). Cette famille est composée de 9 membres: IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-6, IRF-7, ICSBP (IRF-8) et ISGF3 γ (complexe composé de Stat1-Stat2-IRF-9)/p48 (Taniguchi et al., 2001). Ces protéines sont impliquées dans la réponse à certains pathogènes, dans la signalisation en réponse aux IFNs de type I et II, dans la croissance cellulaire et dans le développement hématopoïétique (Mamane et al., 1999; Nguyen et al., 1997).

Parmi ces différents membres, les mieux caractérisés sont IRF-1 et IRF-2, lesquels participent à la modulation de l'expression de plusieurs gènes induits par l'IFN- γ (Taniguchi et al., 2001). IRF-1 est une protéine induite par l'IFN- γ qui active la transcription en se liant à une séquence promotrice communément appelée ISRE. L'expression d'IRF-2 est constitutive et c'est son activité qui est régulée par l'IFN- γ . Cette protéine agit principalement comme un inhibiteur de la transcription soit en compétitionnant avec IRF-1 pour la même séquence d'ADN ou possiblement en

réprimant d'autres activateurs localisés au niveau du promoteur (Harada et al., 1989). La protéine ICSBP, dont l'expression est restreinte aux lymphocytes ainsi qu'aux monocytes/macrophages, agit aussi majoritairement comme un régulateur négatif de la transcription induite par l'IFN- γ (Nelson et al., 1993; Sharf et al., 1997). L'activité d'ICSBP dépend de son interaction avec d'autres IRF, notamment IRF-1 et IRF-2, via un domaine spécifique (IAD) conservé parmi certains membres de cette famille (Bovolenta et al., 1994; Sharf et al., 1997).

3.3 Effet cellulaire de l'IFN- γ

En augmentant l'expression de plusieurs protéines impliquées dans les voies de présentation antigénique de classe I et de classe II, l'IFN- γ s'avère une cytokine essentielle à l'initiation et au maintien des réponses immunes adaptatives (Mach et al., 1996; Schroder et al., 2003). Cette cytokine oriente la réponse immunitaire vers un phénotype Th1 en contribuant principalement à l'activation des cellules NK, à l'immunité cytotoxique spécifique médiée par l'interaction entre les cellules T et les CPA et enfin à l'activation du macrophage (Boehm et al., 1997)

3.3.1 Impact sur les fonctions du macrophage

En plus d'amplifier les mécanismes de présentation antigénique de classe II et ainsi stimuler l'activation et la différenciation des cellules T CD4⁺ (Boehm et al., 1997; Mach et al., 1996), l'IFN- γ contribue directement à orienter la réponse immunitaire vers un phénotype Th1 et également, à activer les fonctions effectrices microbicides du macrophage (Adams and Hamilton, 1984).

En réponse à divers stimuli tels le LPS, le macrophage produit de l'IL-12 (Bliss et al., 1999; Coutelier et al., 1995) qui à son tour induit la sécrétion, par les cellules T CD4⁺ et les cellules NK, d'IFN- γ (Lederer et al., 1996; Macatonia et al., 1995). Ce dernier contribue à augmenter davantage la synthèse d'IL-12 par les macrophages (Kubin et al., 1994). Ainsi, en médiant une boucle de rétroaction positive pour amplifier la réponse de

type Th1, l'IL-12 et l'IFN- γ relie la reconnaissance d'un pathogène par les cellules du système immunitaire innée à l'immunité acquise spécifique (Boehm et al., 1997).

L'importance de l'IFN- γ sur l'activité microbicide du macrophage a été mise en évidence par différentes données expérimentales. Le macrophage activé par l'IFN- γ montre une capacité accrue à phagocyter ainsi qu'une plus grande habileté à éliminer les agents microbiens (Decker et al., 2002). D'ailleurs, l'IFN- γ intensifie la flambée oxydative en induisant la production de radicaux oxygénés tels l'anion superoxyde et le NO (Decker et al., 2002). Cette cytokine influence aussi l'ADCC ainsi que la destruction microbienne en augmentant respectivement l'expression des récepteurs Fc γ RI à la surface cellulaire et l'expression d'enzymes lysosomales (Decker et al., 2002; Erbe et al., 1990). La phagocytose médiée par le complément est également amplifiée parce que l'IFN- γ induit la sécrétion des protéines du complément autant que l'expression des CRs à la surface du macrophage (Schroder et al., 2003; Strunk et al., 1985).

4. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II)

Une régulation précise de l'expression du CMH II est cruciale pour le développement et le contrôle des réponses immunes adaptatives. L'étude et la caractérisation du «Bare Lymphocyte Syndrome» (BLS), maladie héréditaire caractérisée par une absence d'expression du CMH II menant à une immunodéficiência sévère ainsi qu'à une extrême vulnérabilité à plusieurs infections, a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui mènent à l'expression du CMH II (Reith and Mach, 2001; Ting and Trowsdale, 2002).

4.1 Fonction

Les molécules du CMH II sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques composées de 2 chaînes distinctes, la chaîne α et la chaîne β , lesquelles sont encodées au niveau du CMH (HLA chez l'humain et complexe H-2 chez la souris). Le système du CMH II est caractérisé principalement par une grande diversité génétique

qui dépend d'une part de la présence de multiples gènes codant pour les chaînes α/β et d'autre part du degré élevé de polymorphisme allélique (Trowsdale, 1993).

Ces molécules sont spécialisées dans la présentation de peptides antigéniques aux lymphocytes T $CD4^+$ et d'ailleurs l'engagement du complexe peptide:CMH II par le TCR représente un évènement clé dans le développement, l'activation et la régulation du système immunitaire adaptatif. Par exemple, dans le thymus, la reconnaissance des complexes peptides:CMH II à la surface des cellules épithéliales et des cellules dérivées de la moëlle osseuse est cruciale pour la sélection négative et positive servant à la formation du répertoire complet de cellules T $CD4^+$ (Viret and Janeway, 1999). En plus de leur rôle dans l'activation des cellules T, les molécules du CMH II peuvent aussi moduler l'activité de plusieurs types cellulaires qui les expriment en induisant des cascades de signalisation transmembranaire résultant de leur interaction avec le TCR, des superantigènes ou d'autres ligands (Scholl and Geha, 1994).

4.2 Expression des molécules du CMH II

4.2.1 Distribution cellulaire

Contrairement à l'expression ubiquitaire qui caractérise les molécules du CMH I, les molécules du CMH II sont généralement exprimées sur un nombre limité de cellules spécialisées. Il existe deux modes d'expression distincts: chez certaines cellules les molécules du CMH II sont exprimées de façon constitutive tandis que chez d'autres types cellulaires elles sont exprimées en réponse à divers stimuli (Glimcher and Kara, 1992). L'expression constitutive est largement restreinte aux CPAs professionnelles notamment les lymphocytes B, les cellules dendritiques ainsi que les macrophages/monocytes (Boss, 1997; Ting and Trowsdale, 2002). Les molécules du CMH II sont aussi présentes à la surface des cellules épithéliales localisées dans le thymus.

4.2.2 Modulation de l'expression

Les mécanismes qui modulent l'expression des molécules du CMH II diffèrent en fonction du type cellulaire et du stimulus (Glimcher and Kara, 1992).

Chez les cellules exprimant le CMH II de façon constitutive, l'expression est principalement régulée en fonction du stade de développement cellulaire mais elle peut également être modulée par de nombreux stimuli. L'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 représentent les inducteurs les plus efficaces (Burstein et al., 1991; Defrance et al., 1994; Erb et al., 1994) de l'expression du CMH II chez les lymphocytes B, tandis que les prostaglandines (ex: PGE₂) et les glucocorticoïdes sont plutôt des inhibiteurs (Glimcher and Kara, 1992; Ivashkiv et al., 1994). Le GM-CSF induit l'expression du CMH II chez les cellules dendritiques (Paglia et al., 1993; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Tel que mentionné précédemment, l'IFN- γ active l'expression des gènes du CMH II chez divers types cellulaires incluant les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires. De plus, l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ peut être amplifiée par l'IL-4 et le TNF- α ou inhibée par le TGF- β , le CSF-1, l'IFN- α/β et le LPS (Guardiola and Maffei, 1993; Koerner et al., 1987). On observe également que l'IL-10 a des effets opposés sur l'expression du CMH II chez le lymphocyte B où il agit comme activateur (Go et al., 1990) et chez le monocyte où il est plutôt inhibiteur (Chadban et al., 1998). L'interaction CD-40/CD-40L ainsi que CD-5/CD-72 augmente l'expression des molécules du CMH II chez les lymphocytes B et les cellules dendritiques, possiblement via un contact avec les cellules T (Kamal et al., 1991; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Santos-Argumedo et al., 1994). L'interaction du macrophage avec les cellules NK peut avoir un effet positif sur l'expression des molécules du CMH II à sa surface (Watson et al., 1995). Ces observations suggèrent que l'expression du CMH II peut également être modulée par un contact direct entre les cellules.

4.2.3 Transcription des gènes du CMH II

Principalement régulée au niveau transcriptionnel (Voir Figure 6), l'expression constitutive et inductible des gènes du CMH II est essentiellement sous le contrôle d'un motif hautement conservé qui est situé dans la région proximale du promoteur (Benoist and Mathis, 1990; Ting and Baldwin, 1993). Cette région est constituée d'une série de motifs appelés boîtes W/S, X (X1 et X2) et Y dont la séquence, l'orientation, la position relative et l'espacement demeurent conservés au niveau des gènes codant pour les chaînes α et β de la plupart des espèces (Glimcher and Kara, 1992; Harton and Ting, 2000; Ting and Trowsdale, 2002). Cette même structure promotrice est également conservée au niveau des gènes connus pour être co-régulés avec ceux du CMH II, notamment les gènes codant pour HLA-DM (ou H-2M, chez la souris) (Chang and Flavell, 1995; Kern et al., 1995) et la chaîne invariante (Ii) (Brown et al., 1993).

Boîte X

La boîte X comprend deux séquences chevauchantes, X1 et X2, liées par différents facteurs de transcription incluant respectivement les protéines de la famille RFX et le complexe X2BP qui a été identifié comme étant la protéine CREB (Moreno et al., 1999; Moreno et al., 1995; Reith et al., 1994). D'ailleurs, RFX qui se lie à X1 est un complexe formé de trois unités, RFXANK/RFXB, RFX5 et RFXAP, chacune étant déficiente respectivement dans les BLS de groupe B, C et D (Durand et al., 1997; Masternak et al., 1998; Nagarajan et al., 1999; Steimle et al., 1995). Parmi les cinq membres de la famille des facteurs de transcription RFX (RFX1 à RFX5), on considère RFX5 comme le seul facteur essentiel à l'activation transcriptionnelle des gènes du CMH II (Steimle et al., 1995). D'ailleurs, chez certains patients atteints du BLS, l'absence de ce facteur de transcription résulte en l'abrogation complète de l'expression constitutive et inductible des gènes du CMH II (Reith et al., 1988).

Boîte Y

Constituée d'une séquence CCAAT inversée, la boîte Y lie le facteur de transcription hétérotrimérique NF-Y (Dorn et al., 1987), molécule impliquée dans la régulation de nombreux gènes (Mantovani, 1999). De plus, YB-1 est un facteur de transcription qui peut aussi interagir avec la boîte Y pour inhiber l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ (Ting et al., 1994).

Boîte W/S

La région W/S consiste en deux sous-éléments (W et S) et occupe une place importante dans l'expression constitutive et induite par l'IFN- γ des gènes du CMH II (Tsang et al., 1990; Vilen et al., 1992). D'ailleurs, il a été démontré très récemment que l'intégrité de la boîte S ainsi que de la distance qui la sépare de la boîte X étaient essentielles au recrutement de CIITA et à la fonction du promoteur (Muhlethaler-Mottet et al., 2004). Ces travaux ont également montrés que la liaison de la protéine RFX n'est pas requise pour la formation du complexe transcriptionnel (Muhlethaler-Mottet et al., 2004), contrairement à ce qui avait été observé antérieurement (Fontes et al., 1997; Jabrane-Ferrat et al., 1996).

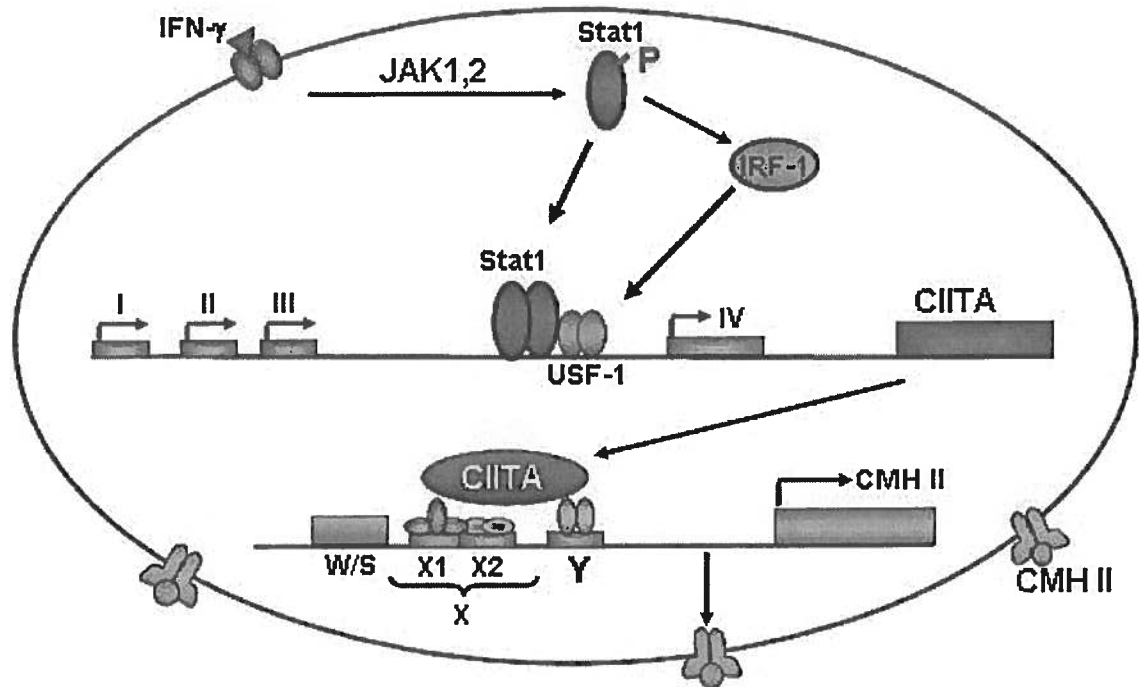


Figure 6: Cascade de signalisation menant à l'expression des molécules du CMH de classe II

CIITA est considéré comme une protéine-clé responsable de moduler aussi bien l'expression constitutive que celle induite par l'IFN- γ des gènes codant pour les molécules du CMH II. Ce facteur de transcription ne se lie pas à l'ADN mais agit plutôt en interagissant avec les protéines régulatrices (RFX, X2BP, NF-Y) liées aux différentes séquences (boîtes X, Y, W/S) localisées au niveau du promoteur des gènes du CMH II. Chez la souris, il existe 3 types de CIITA et ceux-ci possèdent des fonctions spécifiques chez différents types cellulaires. Tandis que les protéines CIITA de type I et III sont surtout impliquées dans l'expression constitutive du CMH II chez les cellules dendritiques et les cellules B respectivement, la protéine CIITA de type IV est principalement responsable d'induire l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ .

(Muhletaler-Mottet, A. Di Bernardino, W. Otten L. A. Mach, B. Activation of the MHC Class II Transactivator CIITA by IFN- γ requires Cooperative Interaction between Stat1 and USF-1. 1998. *Immunity*. 157-166.)

4.3 CIITA

4.3.1 Caractéristiques

CIITA a tout d'abord été identifié comme un des gènes responsables du développement du BLS (Steimle et al., 1993). Par la suite, il a été établi que ce gène code pour un facteur de transcription essentiel jouant un rôle clé dans la modulation de l'expression constitutive et inductible des molécules du CMH II (Harton and Ting, 2000; Steimle et al., 1994). Par exemple, chez des souris déficientes pour le gène CIITA, l'ARNm et l'expression à la surface du CMH II est absente chez la majorité des cellules.

La transfection de CIITA dans des lignées cellulaires et des cellules primaires, qui normalement n'expriment pas le CMH II, est suffisante pour induire l'expression des molécules du CMH II à la surface de ces cellules (Chang et al., 1994; Chin et al., 1994; Steimle et al., 1994). De plus, Otten a démontré que l'expression du CMH II est directement proportionnelle avec celle de CIITA (Otten et al., 1998).

Tandis que CIITA contient un domaine acide à l'extrémité amino-terminale possédant des propriétés transactivatrices (Riley et al., 1995; Zhou and Glimcher, 1995) et trois régions riches en résidus proline-sérine-thréonine critique à son fonctionnement global (Chin et al., 1997), aucune séquence de liaison à l'ADN n'a été identifiée (Steimle et al., 1993). Par conséquent, CIITA est un co-activateur qui interagit avec les facteurs de transcription liés aux séquences promotrices des gènes du CMH II (Hake et al., 2000; Scholl et al., 1997; Zhu et al., 2000).

4.3.2 Régulation de l'expression

Malgré que l'expression de CIITA peut être induite par l'IFN- γ chez différents types cellulaires, les CPAs sont les seules cellules qui l'expriment de façon constitutive (Chang et al., 1994; Rigaud et al., 1996; Steimle et al., 1994).

La transcription du gène CIITA est contrôlée par une région régulatrice composée chez l'humain de quatre promoteurs indépendants (pI, pII, pIII et pIV) dont trois sont conservés chez la souris (pI, pIII et pIV) (Voir Figure 6). Ces multiples promoteurs mènent à trois transcrits d'ARNm (CIITA de type I, III et IV) qui diffèrent au niveau de l'exon 1 (Muhlethaler-Mottet et al., 1997). Au moment de leur découverte, pI et pIII ont tout d'abord été associés à l'expression constitutive de CIITA respectivement chez les cellules dendritiques et les cellules B. L'expression de CIITA en réponse à l'IFN- γ chez divers types cellulaires incluant les macrophages, les microglies, les astrocytes, les fibroblastes ainsi que les cellules endothéliales est plutôt sous le contrôle de pIV (Dong et al., 1999; Muhlethaler-Mottet et al., 1997).

Or, des études récentes démontrent que la restriction de ces promoteurs à différents types cellulaires n'est pas absolue. Par exemple, le CIITA de type III est également exprimé chez les cellules dendritiques et les monocytes humains (Landmann et al., 2001) et il peut être induit par l'IFN- γ (Deffrennes et al., 2001; Piskurich et al., 1999; Soos et al., 2001). Pour sa part, le CIITA de type I n'est pas exclusif aux cellules dendritiques puisqu'il module la transcription du CMH II chez le macrophage murin (Waldburger et al., 2001). Pai *et al.* ont d'ailleurs montré que chez les BMM les trois types de CIITA sont induits en réponse à l'IFN- γ mais les types I et IV demeurent les plus abondants (Pai et al., 2002).

4.3.2.1 Expression induite par l'IFN- γ

La Figure 6 illustre la cascade de signalisation intracellulaire induite par l'IFN- γ qui conduit à la transcription du gène codant pour le CIITA de type IV. L'implication de la voie des Jak-Stat a été mise en évidence par l'absence de l'expression de CIITA en réponse à l'IFN- γ chez des cellules Jak1^{-/-} (Chang et al., 1994). De plus, l'ARNm de CIITA n'est pas induite par l'IFN- γ chez des BMM (Bone Marrow-derived Macrophage) dérivés de souris Stat1^{-/-} supportant ainsi un rôle pour la voie des Jak-Stat dans la transcription du gène CIITA (Meraz et al., 1996). La présence d'une séquence GAS au niveau de pIV supporte aussi un rôle direct pour Stat1 (Muhlethaler-Mottet et al., 1998). Constitutivement exprimé et lié à la boîte E, le facteur de transcription USF-1 contribue à la transcription du CIITA de type IV principalement en stabilisant Stat1 sur l'ADN (Muhlethaler-Mottet et al., 1998). L'importance de la séquence ISRE au niveau du promoteur IV ainsi que l'inhibition significative des niveaux d'ARNm de CIITA chez des fibroblastes IRF1^{-/-} sont deux observations qui indiquent un rôle fonctionnel pour IRF-1 dans l'activation de pIV en réponse à l'IFN- γ (Hobart et al., 1997; Muhlethaler-Mottet et al., 1998).

Malgré que la régulation transcriptionnelle du CIITA de type IV est relativement bien connue, les facteurs de transcription responsables de l'expression du CIITA de type I ne sont pas clairement identifiés et aucune séquence de réponse à l'IFN- γ n'a été

identifiée au niveau du promoteur (Muhlethaler-Mottet et al., 1997; Waldburger et al., 2001). Selon des données obtenues par Pai *et al.*, le contrôle transcriptionnel des gènes CIITA de type I et IV en réponse à l'IFN- γ impliquerait toutefois des éléments régulateurs distincts (Pai et al., 2002).

4.4 Rôle de PKC dans l'expression du CMH II

Des résultats antérieurs basés sur des évidences pharmacologiques suggèrent que PKC est impliquée dans la régulation de l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ chez différents types cellulaires, notamment le macrophage et l'astrocyte (Fan et al., 1988; Lee et al., 1995; Politis and Vogel, 1990). De plus, l'induction de l'expression du CMH II suite à la microinjection de PKC purifié supporte également un rôle pour PKC dans la modulation de l'expression du CMH II (Smith et al., 1992).

Par contre, jusqu'à maintenant la fonction spécifique des différents isoenzymes de PKC dans l'expression du CMH II demeure peu connue. Malgré des progrès considérables concernant l'élucidation des événements transcriptionnels qui mènent à l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ , la participation des différents isoenzymes de PKC dans ces mécanismes reste également à déterminer.

5. Leishmania

5.1 Description

Membres de la famille des *Trypanosomatidae*, les parasites protozoaires du genre *Leishmania* sont des organismes unicellulaires caractérisés par la présence d'un flagelle et d'une organelle riche en ADN, le kinétoplaste (Descoteaux and Turco, 2002). Transmis à l'homme par la mouche des sables du genre *Phlebotomus* (Ancien Monde) ou du genre *Lutzomyia* (Nouveau Monde), le parasite *Leishmania* est l'agent causal d'un large spectre de maladies communément appelées leishmanioses (Descoteaux and Turco, 2002). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que plus de 350 millions de

personnes habitant les régions tropicales et subtropicales de 88 pays différents sont exposées au risque d'infection par différentes espèces de *Leishmania*. On évalue que plus de 15 millions de personnes sont présentement atteintes de leishmaniose classant cette maladie tropicale comme une des 6 plus importantes parasitoses. Plus de 60 000 en meurent chaque année et environ 2 millions de nouveaux cas apparaîtront dans la prochaine année. Il existe au moins 25 espèces de *Leishmania* et le Tableau 3 montre les espèces majeures et leur distribution géographique.

Tableau 3: Distribution géographique des espèces majeures de *Leishmania* responsables de diverses maladies humaines

<u>Espèces</u>	<u>Région¹</u>	<u>Maladie</u>
<i>L. donovani</i>	Old World	Leishmaniose viscérale
<i>L. major</i>	Old World	Leishmaniose cutanée
<i>L. Tropica</i>	Old World	Leishmaniose cutanée
<i>L. mexicana</i>	New World	Leishmaniose cutanée disséminée
<i>L. braziliensis</i>	New World	Leishmaniose cutanée et mucocutanée
<i>L. amazonensis</i>	New World	Leishmaniose cutanée et mucocutanée
<i>L. chagasi</i>	New World	Leishmaniose viscérale

¹ Old World: Europe de l'Est, Afrique, Asie, Inde, Moyen-Orient
New World: Amérique du Sud et Amérique Centrale

(Mathlashewski, G. *Leishmania* infection and virulence. 2001. Med. Microbiol. Immunol. 190: 37-42)

5.1.1 Leishmaniose

Il existe trois formes de leishmanioses qui se distinguent par les symptômes ainsi que les manifestations cliniques et qui sont causées par différentes espèces de *Leishmania* (Voir Tableau 3). Les leishmanioses peuvent atteindre la peau (leishmaniose cutanée), les surfaces muqueuses (leishmaniose mucocutanée) ou certains organes viscéraux (leishmaniose viscérale) (Herwaldt, 1999; Pearson and Sousa, 1996). Avec 1.5 millions de nouveaux cas à chaque année, la forme cutanée est l'infection la plus commune tandis que la leishmaniose viscérale, dont l'incidence annuelle est de 500 000 nouveaux cas, représente la forme la plus fatale.

Caractérisée par des lésions sur la peau généralement non-douloureuses et non-purulentes, la leishmaniose cutanée est causée par *L. major*, *L. mexicana* et *L. tropica*. Dans la plupart des cas, ces lésions guériront à l'intérieur de quelques semaines à quelques mois. De plus, la leishmaniose cutanée disséminée est une forme rare de cette maladie provoquée par la dissémination sur tout le corps des nodules non-ulcéreux. Une variante de la leishmaniose cutanée, appelée leishmaniose mucocutanée, est causée par *L. braziliensis* qui est une espèce ayant un tropisme spécifique aux macrophages des régions du pharynx, de la bouche et du nez.

L. donovani, parasite responsable de la leishmaniose viscérale (ou Kala-Azar), se dissémine et infecte les macrophages de la rate, du foie, des ganglions lymphatiques et de la moëlle osseuse. Chronique, cette infection s'avère mortelle dans presque 100% des cas si elle n'est pas traitée. Jusqu'à maintenant il n'existe aucun vaccin ou mesure prophylactique efficace, par contre les traitements actuels impliquent des antimoniaux pentavalents (ou antimoine) ou des composés diamidines.

5.1.2 Cycle de vie

Tout au long de son cycle de vie (Voir Figure 7), le parasite du genre *Leishmania* alterne entre 2 stades de développement, la forme promastigote qui réside dans le système digestif de la mouche des sables (genres *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*) et la forme amastigote qui se retrouve chez l'hôte mammifère à l'intérieur des phagolysosomes de macrophages. Ces deux formes se distinguent également par leur morphologie, les promastigotes étant allongées (environ 10 µm) et flagellés tandis que les amastigotes sont non-flagellés, plus arrondis et plus petits (environ 3-5 µm).

Lorsqu'une mouche des sables infectée se nourrit de sang sur un mammifère, les promastigotes sont inoculés dans l'hôte où ils sont subséquemment phagocytés par les macrophages. À l'intérieur du phagosome de la cellule hôte, les promastigotes se différencient en amastigote, forme non-motile ayant évolué pour proliférer dans l'environnement hostile du phagolysosome. La prolifération du parasite entraîne la lyse

du macrophage et ainsi le relargage d'amastigotes qui peuvent infecter les macrophages environnants. Le cycle se complète au moment où une mouche des sables se nourrit sur un hôte infecté et ingère des amastigotes qui se différencient initialement en promastigotes procycliques. Non-infectieux et se divisant rapidement dans l'intestin de la mouche des sables, ces parasites se transforment par la suite en promastigotes métacycliques infectieux et migrent vers le pharynx de l'insecte à partir duquel ils seront transférés dans un hôte mammifère au prochain repas sanguin.

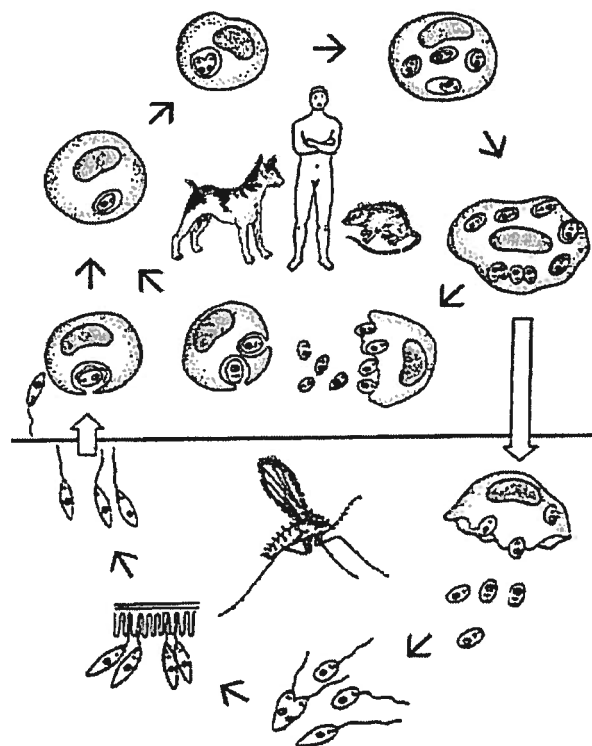


Figure 7: Cycle de vie de *Leishmania*

Les parasites du genre *Leishmania* possèdent un cycle de vie biphasique. Les promastigotes (formes extracellulaires) sont transmis à l'hôte vertébrés par une mouche de sable femelle et se différencient en amastigotes (forme intracellulaire) capables de proliférer à l'intérieur du phagolysosome du macrophage. L'éclatement du macrophage permet le relâchement d'amastigotes qui peuvent infecter d'autres macrophages environnants. Lorsqu'un individu infecté est piqué par l'insecte-vecteur, les amastigotes sont alors aspirés par la mouche où ils se transforment en promastigote. Après 5-7 jours, la mouche de sable infectée est apte à transmettre le parasite à de nouveaux hôtes.

Tiré de : Modern Parasite Biology. Chang, K. P. Éditeur: Wyler, D. J.

5.2 Immunité

Les modèles murins d'infection à *Leishmania* démontre que la production de cytokines par les cellules T CD4⁺ représente un facteur majeur déterminant le résultat de l'infection. Chez les souris BALB/c susceptibles à l'infection par *L. major*, d'importantes quantités de transcripts d'ARNm d'IL-4 sont exprimés dans les ganglions lymphatiques. Au contraire, les souris résistantes C57BL/6 expriment un nombre élevé de transcripts pour l'IFN- γ tandis que l'IL-4 est exprimée de façon transitoire au tout début de l'infection (Solbach and Laskay, 2000).

Ainsi, le patron de cytokines présent chez l'animal au moment de l'infection détermine le type de réponse qui se développera. L'IFN- γ et l'IL-12 contrôle la réplication du parasite en induisant une réponse de type Th1 caractérisée par la production de NO. Par contre, l'IL-4 et l'IL-10 favorisent plutôt le développement d'une réponse Th2, laquelle demeure inefficace dans l'éradication de l'infection (Abbas et al., 1996; Biedermann et al., 2001; Bogdan et al., 1990; Doherty and Coffman, 1999; Kemp, 1997).

5.3 Interaction avec le macrophage

Malgré que certains travaux démontrent que les parasites du genre *Leishmania* infectent les fibroblastes et les cellules dendritiques (Rittig and Bogdan, 2000), ils résident principalement à l'intérieur des phagocytes mononucléés (macrophages et monocytes) d'hôtes vertébrés. Suite à leur transmission à l'hôte mammifère, les promastigotes sont phagocytés par les macrophages via plusieurs récepteurs cellulaires (Mosser and Rosenthal, 1993) incluant le CR3 (Handman and Bullen, 2002; Mosser and Brittingham, 1997), le MR (Wilson and Pearson, 1986; Wilson and Pearson, 1988), certains TLRs (Hawn et al., 2002), des protéines présentes sur le réticulum endoplasmique (calréticuline et calnexine) (Desjardins, 2003; Schrag et al., 2001) et possiblement le récepteur pour la fibronectine (Alexander and Russell, 1992).

Une des caractéristiques principales des parasites du genre *Leishmania* est leur capacité à survivre aux conditions hostiles auxquelles ils sont exposés tout au long de leur cycle de vie. La présence de molécules telles que le lipophosphoglycan (LPG) et la Gp63 à la surface de *Leishmania* contribue largement à leur survie dans l'intestin de la mouche des sables (Pimenta et al., 1997; Sacks et al., 2000), à leur survie face à l'activation de la voie du complément (Dominguez and Torano, 1999; McConville et al., 1992; Puentes et al., 1990; Turco and Descoteaux, 1992) et également à leur survie intracellulaire (Descoteaux and Turco, 2002). Le LPG, glycolipide unique aux différentes espèces de *Leishmania*, forme un glycocalyx dense autour du parasite et est la molécule de surface du promastigote la plus abondante (Turco, 1990). Suivant la phagocytose, la présence du LPG s'avère cruciale pour la survie initiale du promastigote ainsi que pour sa transformation en amastigote (Descoteaux and Turco, 2002; Desjardins and Descoteaux, 1998). Les parasites du genre *Leishmania* ont développé divers mécanismes pour interférer avec l'activité des macrophages leur permettant ainsi de s'établir et de proliférer à l'intérieur de l'hôte (Buates and Matlashewski, 2001; McDowell and Sacks, 1999; Moore et al., 1993).

5.3.1 Manipulation de la signalisation intracellulaire

Considérant que les récepteurs CR1 et CR3 permettent la phagocytose de microorganismes tout en évitant la flambée oxydative, la liaison de ces récepteurs par *Leishmania* pour entrer dans le macrophage favorise assurément sa survie intracellulaire (Descoteaux and Turco, 2002). D'autant plus que la liaison à CR3 inhibe la sécrétion d'IL-12 (Sutterwala et al., 1997). À la lumière de ces observations, l'entrée des promastigotes de *Leishmania* via les CRs s'avère un processus remarquablement silencieux prévenant la production de NO et de diverses cytokines pro-inflammatoires par le macrophage (Carrera et al., 1996; Reiner et al., 1994).

La manipulation de la voie des MAPKs durant l'infection est une des stratégies de virulence utilisées par plusieurs types de pathogènes. Par exemple, l'attachement et l'internalisation de *L. donovani* par des macrophages murins naïfs dérivés de la moëlle

osseuse n'activent pas la phosphorylation des trois MAPKs majeures, notamment p38, ERK1/2 et JNK (Prive and Descoteaux, 2000). De plus, la présence de LPG à la surface des promastigotes de *L. donovani* prévient l'activation de ERK1/2 sans toutefois affecter celle de p38 et de JNK (Prive and Descoteaux, 2000). Ces données suggèrent que le LPG pourrait contribuer à l'entrée silencieuse des promastigotes à l'intérieur des macrophages naïfs.

Des macrophages infectés par *Leishmania* montrent également une faible sensibilité à divers activateurs de PKC (Descoteaux and Matlashewski, 1989; Descoteaux et al., 1992; Descoteaux, 1993; Reiner, 1994). Fait intéressant, des observations *in vitro* ont révélé que le LPG est un puissant inhibiteur de l'activité de PKC (McNeely and Turco, 1987). En fait, cette molécule interagit avec les domaines régulateurs de PKC dans lesquels sont situés les sites de liaison pour le DAG, le Ca^{2+} et les phospholipides (McNeely et al., 1989). Conséquemment, l'exposition du macrophage à du LPG purifié inhibe plusieurs événements dépendants de PKC incluant par exemple l'induction de la flambée oxidative (Frankenburg et al., 1990), l'expression du gène *c-fos* induit par le LPS et le DAG (Descoteaux et al., 1991) ainsi que la phosphorylation de MARCKS (Descoteaux et al., 1992). À noter que les glycoinositolphospholipides, glyconconjugués les plus abondants à la surface de l'amastigote, sont également des inhibiteurs de l'activité de PKC (McNeely et al., 1989).

5.3.2 Manipulation de la présentation antigénique

Pour échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T et ainsi promouvoir leur survie à l'intérieur de l'hôte, certains microorganismes ont développé des mécanismes qui affectent la présentation antigénique (Ayala et al., 1996; Forestier et al., 2000; Wojciechowski et al., 1999). La présentation antigénique dans le contexte du CMH II est déficiente chez les macrophages infectés avec différentes espèces de *Leishmania* (Courret et al., 1999; Fruth et al., 1993; Prina et al., 1996; Wolfram et al., 1995). Par exemple, on suggère que la forme amastigote de *L. amazonensis* et de *L. mexicana* inhibe la présentation antigénique en internalisant et en dégradant les molécules du CMH II

(Antoine et al., 1999). Les amastigotes de *L. mexicana* sécrètent également des polysaccharides qui bloquent la présentation antigénique (Ilg et al., 1995). Pour sa part, *L. donovani* inhibe l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ par un mécanisme transcriptionnel qui n'est pas tout à fait élucidé (Kwan et al., 1992; Reiner et al., 1988). Tel que mentionné précédemment à la section 3.2.2, les réponses biologiques induites par l'IFN- γ sont principalement régulées au niveau transcriptionnel par la voie des JAK-STAT (Stark et al., 1998). De ce fait, l'infection de monocytes humains avec des amastigotes de *L. donovani* atténuent l'activation de la voie des Jak-Stat induite par l'IFN- γ (Nandan and Reiner, 1995). Des résultats similaires démontrent également que l'infection de macrophages murins avec des promastigotes de *L. donovani* est associée à une déphosphorylation de JAK2 possiblement causée par une suractivation de la protéine tyrosine phosphatase SHP1 (Blanchette et al., 1999). Ces observations suggèrent que *L. donovani* interfère directement avec l'activation de la voie des JAK-STAT pour inhiber l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ .

OBJECTIFS

Tel que mentionné précédemment, le but général de ce projet de doctorat consistait à mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui modulent deux des principales fonctions du macrophage, notamment l'inflammation et la présentation antigénique. Cette étude comportait 3 objectifs :

- 1) Élucider le rôle de PKC- α dans l'expression de la cyclooxygénase-2 et dans la sécrétion des PGE₂ en réponse au LPS et à l'IFN- γ .
- 2) Préciser les mécanismes moléculaires par lesquels PKC- α régule l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ .
- 3) Finalement, à la lumière des résultats obtenus lors de l'étude du 2^{ème} objectif et en se basant sur des études antérieures, le dernier objectif avait pour but de mieux comprendre la stratégie utilisée par le parasite *L. donovani* pour inhiber l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ .

CHAPITRE I

(L'inflammation chez le macrophage: Étude de l'implication de PKC- α dans la
régulation de l'expression de COX-2 et dans la sécrétion des PGE₂)

Résumé de la première publication

« Cyclooxygenase-2 expression in macrophages : modulation by Protein Kinase C- α . *J. Immunol.* 2000. 165 (7). 3985-3991 »

COX-2 est une enzyme inductible responsable de la synthèse de PGs au cours des réponses inflammatoires et immunitaires. Des études précédentes basées sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques suggèrent que PKC est impliquée dans la production des PGs possiblement en régulant l'expression de COX-2. La présente étude avait pour but d'élucider le rôle de PKC- α dans la modulation de l'expression de COX-2 et dans la synthèse des PGE₂ chez la lignée de macrophages murins RAW 264.7 surexprimant un mutant DN de PKC- α . L'effet de différents stimuli, notamment le LPS et l'IFN- γ ainsi que l'effet du parasite intracellulaire *L. donovani* a été étudié sur l'expression de COX-2. Tout d'abord, en réponse au LPS l'expression du gène et de la protéine COX-2 diminue chez les macrophages exprimant le DN de PKC- α . Contrairement à ce que l'on observe en réponse au LPS, l'expression de COX-2 induite par l'IFN- γ augmente de façon significative chez les clones surexprimant le DN PKC- α . On a également démontré une importante corrélation entre les niveaux de PGE₂ et les niveaux d'ARNm et de protéine COX-2 induits par l'IFN- γ chez les macrophages surexprimant le DN PKC- α . L'ensemble de ces résultats suggère un rôle pour PKC- α tant dans la modulation de l'expression de COX-2 induite par le LPS et l'IFN- γ que dans la sécrétion des PGE₂ induite par l'IFN- γ .

Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C- α ¹

Mélanie Giroux and Albert Descoteaux²

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

Publié dans : *Journal of Immunology*, 165: 3985-3991 (2000)

Keywords: monocytes/macrophages, gene regulation, inflammatory mediators, protein kinase C

ABSTRACT

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible enzyme responsible for high levels prostaglandin (PG) production during inflammation and immune responses. Previous studies with pharmacological inhibitors suggested a role for protein kinase C (PKC) in prostaglandin production possibly by regulating COX-2 expression. In the present study, we addressed the role of PKC- α in the modulation of COX-2 expression and PGE₂ synthesis by overexpressing of a dominant-negative (DN) mutant of this isoenzyme in the mouse macrophage cell line RAW 264.7. We investigated the effect of various stimuli on COX-2 expression, namely lipopolysaccharide (LPS), IFN- γ , and the intracellular parasite *Leishmania donovani*. Whereas LPS-induced COX-2 mRNA and protein expression were down-regulated in DN PKC- α -overexpressing clones, IFN- γ -induced COX-2 expression was upregulated in DN PKC- α -overexpressing clones with respect to normal RAW 264.7 cells. Measurements of PGE₂ levels revealed a strong correlation between PGE₂ secretion and IFN- γ -induced COX-2 mRNA and protein levels in DN PKC- α -overexpressing clones. Taken together, these results suggest a role for PKC- α in the modulation of LPS- and IFN- γ -induced COX-2 expression, as well as in IFN- γ -induced PGE₂ secretion.

INTRODUCTION

Prostaglandins (PGs) are important mediators of inflammatory and immune responses. Their secretion is induced by various stimuli including LPS, phorbol esters, cytokines, and phagocytosis (1). Prostaglandin E₂ (PGE₂) is one of the main PGs secreted in large quantities by macrophages and acts as an autocrine regulator of their activity (2, 3). Cyclooxygenases (COX), the key enzymes responsible for the conversion of arachidonic acid to PGs, exist in two isoforms with different physiological functions. Whereas COX-1 is constitutively expressed in most cell types and is responsible for regulating normal physiological functions (3, 4), COX-2 is inducible in cells playing a role in inflammation such as macrophages, fibroblasts, and endothelial cells (5, 6). In human and murine macrophages, COX-2 expression is induced by LPS, interleukin-1, and phorbol esters (6-9). Studies with the murine macrophage cell line RAW 264.7 indicated that accumulation of COX-2 mRNA can be induced by a combination of IFN- γ and LPS but not by IFN- γ alone (10). In addition to soluble mediators, pathogens such as the intracellular parasite *Leishmania donovani* can increase synthesis of PGE₂, possibly by inducing alterations in the cyclooxygenase pathway (11, 12).

Previous studies using protein kinase C (PKC) inhibitors and activators suggested that PGE₂ synthesis requires the activation of PKC in the mouse macrophage cell line RAW 264.7, as well as in peritoneal macrophages (1, 13). Twelve isoenzymes of PKC, a family of protein serine/threonine kinases, have been identified so far. Differences in their structure, requirement for activity, subcellular localization, and substrate specificity suggest that in a given cell, the various PKC isoenzymes may exert specific functions. Six of them are expressed in macrophages but their respective roles in the regulation of macrophage functions are poorly understood (14, 15). Using clones of the RAW 264.7 macrophage cell line overexpressing a dominant-negative mutant of PKC- α (DN PKC- α), we recently reported that PKC- α regulates selective LPS-induced responses, including iNOS and IL-1 α expression (16). This study led us to propose a role for PKC- α in the regulation of inflammatory responses. Previous studies based on selective

depletion of PKC isoenzymes and their differential sensitivities to pharmacological inhibitors led to the suggestion that PKC- α regulates zymosan-stimulated arachidonic acid metabolism and eicosanoid synthesis in peritoneal macrophages (17). To further investigate the role of PKC- α in the regulation of COX-2 expression and PGE₂ secretion, we used DN PKC- α -overexpressing clones of the RAW 264.7 macrophage line (16). We obtained evidence that PKC- α modulates COX-2 expression in macrophages exposed to both LPS and IFN- γ , thereby providing additional evidence that PKC- α is involved in the regulation of macrophage inflammatory responses.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. The murine macrophage cell line RAW 264.7 transfected with the expression vector pCIN-4, and the DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 (16) were cultured in a 37°C incubator with 5 % CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium with glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), containing 10% heat-inactivated FBS (Hyclone, Logan, UT), 10 mM Hepes pH 7.3, and antibiotics supplemented with 200 μ g/ml G418 (Life Technologies Inc.).

Bone marrow-derived macrophages. BMM were obtained as previously described (18). Briefly, bone marrow cells obtained from femurs of 6- to 8-wk-old female BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada), were freed of RBC by osmotic shock and resuspended in complete medium with 15 % (v/v) L929 cell-conditioned medium. After 1 day in culture (37°C, 5 % CO₂), non-adherent cells were transferred into new culture dishes and then allowed to differentiate and adhere for 6 days. BMM were made quiescent by culturing them in CSF-1-free medium for 18 h prior to being used.

Leishmania. Promastigotes of *Leishmania donovani* (Ethiopian strain LV9, obtained from G. Matlashewski, McGill University, Montréal, QC, Canada) were freshly derived from amastigotes isolated from the spleen of an infected hamster and were grown in at 26°C in RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 100 μ M adenine, 5 μ M hemin, 1 μ M biotin, 20 mM 2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid, pH 5.5, and antibiotics. For infections with *Leishmania*, 2.5 X 10⁶ adherent macrophages were incubated with 2.5 X 10⁷ parasites for 8 h.

Northern Blot Analyses. Total RNA preparation and Northern Blot analyses were performed essentially as described previously (16, 19). The probe for murine COX-2 consisted of the 1.2 kb EcoRI/ApaI fragment from COX-2 cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-24 (5'-CCCCTTCCTGCGAAGTTTAATC-3') and AD-25 (5'-GCATCTGGACGAGGTTTTTCC-3').

Plasmids. The luciferase reporter vector (pTIS10L) containing the promoter region of the mouse COX-2 gene (20) (-963/+70 from the transcription initiation site) was kindly provided by Harvey Herschman (UCLA) and was used for transient transfections studies. The PKC- α expression vector (pCMV-PKC- α) was constructed by insertion of the human wild-type PKC- α cDNA (21) into the HindIII site of the expression vector pRcCMV (Invitrogen) and was used for overexpression analyses. The pRL-TK plasmid encoding the *Renilla* luciferase was from Promega (Madison, WI).

Transient transfections. Adherent cells (2.5×10^5 /well) were transfected using GenePorter (Gene Therapy Systems) with 0.25 μ g of COX-2 luciferase reporter plasmid, and either 0.65 μ g of pRcCMV (Invitrogen) or pCMV-PKC- α expression vector for 45 min. All transfections included 0.1 μ g of pRL-TK (Promega) as transfection efficiency control. Cells were transfected with 250 μ l DNA/GenePorter mix for 5 h and 1 ml of serum-free medium was added. Cells were treated 7 h later with 100 ng/ml LPS and harvested at 12 h in Reporter lysis buffer (Promega). Firefly and *Renilla* luciferase values were obtained by analyzing 20 μ l of cell extracts according to standard instructions provided in the Dual Luciferase Kit (Promega) using a Lumat LB 9507 luminometer (EG & G Berthold). Statistically significant differences were identified using the unpaired Student's *t* test. *p* values of ≤ 0.01 were considered to be statistically significant.

Western Blot Analyses. Western Blot analyses were performed as described previously (16). Anti-COX-2 monoclonal antibodies were from Transduction Laboratories (Lexington, KY).

PGE₂ production. PGE₂ levels in the supernatants of macrophage were measured by competitive immunoassay (EIA, Cayman Chemicals) after 8 h of incubation with different stimuli as recommended by the manufacturer. When indicated, the cyclooxygenase inhibitors NS398 (5 μ M) and valeryl salicylate (1 mM) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI), or the iNOS inhibitor L-NMMA (500 μ M) (Alexis, San

Diego, CA) were used. Statistically significant differences were identified using the unpaired Student's *t* test. *p* values of 0.01 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced COX-2 expression. In macrophages, COX-2 expression is strongly induced by LPS, phorbol-ester, and several cytokines (22). To investigate the role of PKC- α in this process, we measured COX-2 mRNA accumulation and protein levels expression in normal RAW 264.7 cells (containing the empty vector) and in DN PKC- α -overexpressing clones (B1 and C2, ref. 16) after stimulation with LPS (10 and 100 ng/ml) for 8 h. In normal RAW 264.7 cells, LPS induced the expression of COX-2 mRNA accumulation and protein synthesis in a dose-dependent manner (Fig. 1A and 1B, lanes 1-3). In DN PKC- α -overexpressing clones, LPS-induced COX-2 mRNA accumulation and protein levels were significantly inhibited. Densitometric analyses revealed that in clone B1, COX-2 mRNA levels were reduced by 10- to 20- fold (Fig. 1 A, lanes 4-6) and protein levels were reduced by approximately 4-fold (Fig. 1 B, lanes 4-6) with respect to the levels observed in control cells. In clone C2, LPS-induced COX-2 mRNA levels were barely detectable (Fig. 1A, lanes 7-9), whereas COX-2 protein levels were reduced by approximately 3- to 5- fold with respect to control cells (Fig. 1B, lanes 7-9). Thus, similar to LPS-induced IL-1 α and iNOS expression (16), DN PKC- α overexpression strongly inhibited LPS-induced COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages.

Overexpression of PKC- α increases LPS-induced COX-2 promoter activity. The inhibition of LPS-induced COX-2 expression in DN PKC- α -overexpressing macrophages indicated that PKC- α plays a role in modulating COX-2 expression. To further demonstrate the involvement of PKC- α in the induction of COX-2 by LPS, we transiently transfected RAW 264.7 cells with a COX-2-luciferase reporter and a wild type PKC- α expression vector. Overexpression of wild type PKC- α had no effect on basal COX-2 promoter activity in untreated RAW 264.7 cells (Fig. 2). In contrast, PKC- α overexpression significantly increased LPS-stimulated COX-2 promoter activity by approximately two-fold with respect to controls (Fig. 2, $p = 0.0001$, $n = 3$). These data

are consistent with PKC- α playing a role in modulating COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages.

Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression following a stimulation with IFN- γ . IFN- γ is a potent regulator of macrophage function (23). In addition to inducing the expression of several genes, incubation of macrophages with IFN- γ enhances their responsiveness to LPS (10, 24). To determine whether PKC- α plays a role in the regulation of IFN- γ -induced responses we have measured the induction of COX-2 mRNA accumulation and protein synthesis in control RAW 264.7 cells and in the DN PKC- α overexpressing clones B1 and C2 in response to 100 U/ml IFN- γ alone or in combination with 100 ng/ml LPS. Macrophages were primed with 100 U/ml IFN- γ for 18 h before the addition of either 100 U/ml IFN- γ or the combination of 100 U/ml IFN- γ and 100 ng/ml LPS. IFN- γ induced an important increase of COX-2 mRNA accumulation in DN PKC- α overexpressing cells (20-fold for clone B1 and 60-fold for clone C2) (Fig.3A, lanes 6 and 10) compared with control cells (Fig. 3A, lane 2). Similar results were obtained with the levels of COX-2 protein expression, as in clone B1 (Fig.3B, lane 6) and in clone C2 (Fig.3B, lane 10) COX-2 levels were increased by 2-fold and 4-fold, respectively, compared to the levels observed in control cells (Fig. 3B, lane 2). This significant increase in IFN- γ -induced COX-2 expression in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells suggested that PKC- α negatively modulates IFN- γ -induced COX-2 expression. When macrophages were exposed to a combination of both IFN- γ and LPS, high levels of COX-2 mRNA and protein were induced independently of DN PKC- α overexpression (Fig 3A and 3B, lanes 4, 8, and 12). Thus, DN PKC- α overexpression had little effect on the synergistic effect of LPS and IFN- γ on the induction of COX-2 mRNA accumulation and protein synthesis.

COX-2 expression following a phagocytic stimulation with *Leishmania donovani* promastigotes. Infection with the intracellular protozoan *L. donovani* stimulates macrophages to secrete PGE₂, possibly by inducing COX-2 expression (11, 12). We thus determined whether PKC- α was involved in this process by comparing the induction of

COX-2 mRNA accumulation and protein synthesis in normal RAW 264.7 cells and in DN PKC- α -overexpressing clones following phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. For priming experiments, cells were incubated for 18 h with 100 U/ml IFN- γ before the addition of either 100 U/ml IFN- γ alone or in combination with *L. donovani* promastigotes for an additional 8 h. Phagocytic stimulation with *L. donovani* promastigotes failed to induce COX-2 mRNA accumulation as well as protein synthesis in control RAW 264.7 macrophages (Fig. 4A and 4B, lane 3) and in the two DN PKC- α -overexpressing clones (Fig. 4A and 4B, lane 7 for clone B1 and lane 11 for clone C2). Priming with IFN- γ had no effect on the induction of COX-2 expression following phagocytosis of *L. donovani*, as COX-2 mRNA and protein levels induced by IFN- γ alone (Fig. 4A and 4B, lane 2 for control cells, lane 6 for clone B1 and lane 10 for clone C2) were similar to those induced by the combination of IFN- γ and *L. donovani* (Fig. 4A and 4B, lane 4 for control cells, lane 8 for clone B1 and lane 12 for clone C2). In naive BMM, *L. donovani* evaded the induction of COX-2 expression (Fig 5A and 5B, lane 5), whereas priming with IFN- γ led to the induction of COX-2 mRNA and protein synthesis by *L. donovani* promastigotes in BMM (Fig.5A and 5B, lane 6).

Effect of DN PKC- α overexpression on PGE₂ secretion. We compared the ability of control RAW 264.7 cells and clones B1 and C2, to secrete PGE₂ in response to either LPS (10 or 100 ng/ml), 100 U/ml IFN- γ , or *L. donovani*. As shown in Figure 6A, in the presence of 10 ng/ml (*hatched bars*) and 100 ng/ml (*closed bars*) LPS, control RAW 264.7 cells as well as DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 secreted PGE₂ in a dose-dependent manner. In contrast to COX-2 mRNA and protein levels, overexpression of DN PKC- α did not affect LPS-induced PGE₂ secretion by RAW 264.7 cells (For 10 ng/ml LPS, $p = 0.15$ for B1 vs control cells, and $p = 0.02$ for C2 vs control cells, $n = 3$. For 100 ng/ml LPS, $p = 0.103$ for B1 vs control cells, and $p = 0.07$ for C2 vs control cells, $n = 3$). Data obtained with the specific COX-2 inhibitor NS-398 (5 μ M) (25) confirmed that COX-2 activation is the major pathway responsible LPS-stimulated PGE₂ secretion (Table I). The observation that valeryl salicylate, a COX-1 inhibitor (26), reduced LPS-induced PGE₂ production by 50% suggested a role for COX-1, although it

is possible that COX-2 activity was also inhibited at the concentration used (1 mM) (Table I). As shown in Fig. 6B, IFN- γ induced the secretion of minimal PGE₂ levels in control RAW 264.7 cells, whereas DN PKC- α -overexpression increased IFN- γ -induced PGE₂ secretion by 35-fold by clone B1 ($p = 0.005$, $n = 3$) and 70-fold by clone C2 ($p = 0.01$, $n = 3$). Collectively, these results indicated that DN PKC- α overexpression had no effect on LPS-induced PGE₂ secretion but strongly upregulated IFN- γ -induced PGE₂ secretion. When macrophages were exposed to a combination of IFN- γ and LPS, control RAW 264.7 cells and the DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 secreted similar PGE₂ levels ($p = 0.04$ for B1 vs control cells, and $p = 0.795$ for C2 vs control cells, $n = 3$) (Fig. 6C). As observed for COX-2 mRNA and protein synthesis, *L. donovani* promastigotes failed to induce PGE₂ secretion in control RAW 264.7 cells as well as in DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 (data not shown).

DISCUSSION

Prostaglandins are important regulatory mediators for the maintenance of numerous physiological functions and are synthesized by most mammalian tissues (3, 27). In inflammatory reactions, macrophages are the main producers of large quantities of PGE₂ (10, 28). COX-2, the inducible cyclooxygenase isoform, has been identified in activated macrophages and constitutes the key enzyme responsible for the high production of inflammatory prostaglandins such as PGE₂ (3, 5, 29). A role for PKC in the regulation of prostaglandin production (possibly by regulating COX-2 expression) has been suggested after treatment of macrophages with PKC inhibitors or activators (1, 13). In the present study, we investigated the role of PKC- α in the regulation of COX-2 expression in macrophages. To this end, we have stably overexpressed a DN mutant of this isoenzyme in the murine macrophage cell line RAW 264.7 (16). We obtained evidence suggesting that PKC- α activity is important for the modulation of COX-2 expression in macrophages exposed to either LPS or IFN- γ .

Previous studies suggested that PKC is involved in the regulation of COX-2 expression. A role for PKC- α in the regulation of zymosan-induced PGE₂ secretion in mouse peritoneal macrophages has been previously proposed based on the selective down-regulation of PKC isoenzymes and on their differential sensitivities to pharmacological inhibitors (17). Recently, it has been reported that overexpression of wild type PKC- α in mouse epidermis increases phorbol esters-induced expression of specific proinflammatory mediators, including COX-2, suggesting that PKC- α plays a role in cutaneous inflammation (30). Our data obtained with DN PKC- α -overexpressing clones suggest that this isoenzyme is required for COX-2 expression the RAW 264.7 macrophage cell line. However, the possibility exists that stable overexpression of the DN PKC- α might have affected basal PKC- α activity levels, thereby altering the maintenance of normal cellular functions. A possible consequence of such alterations could be the loss of regulator(s), which could potentially affect signal transduction pathways leading to COX-2 expression. Accordingly, PKC- α would play a secondary

role in LPS-induced COX-2 expression. On the other hand, our observation that overexpression of wild type PKC- α increases LPS-induced COX-2 promoter activity is not consistent with this possibility and argues in favor of a direct role for PKC- α (Fig. 2). Thus, our observations further support a role for PKC- α in the modulation of COX-2 expression in macrophages, and hence in the regulation of inflammatory responses.

The mechanism by which PKC- α modulates COX-2 expression remains obscure. One possibility is that PKC- α is required for the activation of specific transcription factors. In this regard, few studies have addressed the identity of the transcription factor(s) regulating COX-2 expression (31, 32, 33). The ubiquitous transcription factor NF- κ B, one of the main mediator of LPS responses (34), binds to regulatory sequences within the promoter region (-403 bp to -395 bp) of both the human and mouse COX-2 genes to regulate COX-2 expression (35). Since LPS-induced NF- κ B activation takes place normally in DN PKC- α -overexpressing macrophages (16), it is likely that transcription factor(s) other than NF- κ B and required for LPS-induced COX-2 expression, may be defective in our DN PKC- α overexpressing clones. Consensus binding sites for NF-IL6 have been identified within the COX-2 promoter region, and recent evidence indicated that this regulatory sequence is responsible for the induction of human COX-2 by LPS, through NF-IL6 β (C/EBP δ) (33). More recently, it has been established that while NF- κ B is not required, NF-IL6 is essential for LPS-induced COX-2 gene expression in RAW 264.7 cells (36). Further studies will be required to examine whether a defective activation of NF-IL6 could account for the inhibition of LPS-induced COX-2 expression in the DN PKC- α overexpressing RAW 264.7 macrophages. In this regard, preliminary evidence indicated that DN PKC- α overexpression inhibited LPS-induced NF-IL6 activation in RAW 264.7 cells (F. Chano and A. Descoteaux, unpublished data).

IFN- γ is a pleiotropic cytokine that plays a key role in modulating immune and inflammatory responses (37) and regulates several macrophages functions (38). Previous studies in human macrophages demonstrated that IFN- γ priming is required for the induction of COX-2 expression following stimulation with either IFN- γ or TNF- α .

Moreover, IFN- γ in combination with either LPS or TNF- α , induced a synergistic increase in the accumulation of COX-2 mRNA (24). This synergistic effect is however not universal, as IFN- γ priming down-regulated COX-2 gene transcription in response to IL-1 β but not to LPS in human macrophages (6). In spite of these observations, no data exist on the regulation of COX-2 expression by PKC following stimulation with IFN- γ . In contrast to LPS-induced COX-2 expression, we found that levels of COX-2 mRNA were significantly enhanced in DN PKC- α -overexpressing macrophages following a stimulation with IFN- γ . These data suggest that PKC- α negatively modulates COX-2 expression in response to IFN- γ . Two possible mechanisms may account for these results. First, overexpression of DN PKC- α influences the transcriptional activity of the COX-2 promoter, possibly by regulating the activation of IFN- γ -induced transcription factor(s). ICSBP, which is primarily expressed in cells of the macrophage and lymphocytic lineages, is a member of the IRF family that binds to a DNA sequence, known as the ISRE, that mediates IFN- γ responsiveness for several genes (39, 40). ICSBP mRNA levels become elevated in response to IFN- γ , but not IFN α/β , in macrophage cell lines and in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages (41). Thus, the selectivity of ICSBP for macrophages and other cells of the immune system, coupled with its strong inducibility and long-half-life in macrophages, suggests that it could play a critical role in the down-regulation of macrophage activity after activation by IFN- γ (42). Recent studies provided evidence that ICSBP can selectively suppress the expression of IFN-responsive genes (40). Furthermore, induction of ICSBP mRNA by IFN- γ was found previously to be inhibited by PKC inhibitors (41). Considering these observations, it will be of interest to verify the role of ICSBP in IFN- γ -induced COX-2 expression in DN PKC- α overexpressing RAW 264.7 cells in response to IFN- γ . Second, the steady-state levels of COX-2 transcripts are the result of a balance between the rate of gene transcription and the rate of degradation of the mRNA produced. The 3' untranslated region of COX-2 mRNA contains conserved AUUA repeats also found in other short-lived mRNA species, such as GM-CSF mRNA (20, 43), that are important in determining mRNA stability and translation (44, 45). Whether PKC- α activity negatively regulates the binding of putative cytosolic factors to the 3' untranslated region of the COX-2

transcripts, and hence influences COX-2 mRNA stability in IFN- γ stimulated macrophages, is an hypothesis that will deserve further attention.

L. donovani is an obligate intracellular protozoan that resides within mononuclear phagocytes of infected mammals (46). A previous study demonstrated that infection of murine peritoneal macrophages with *L. donovani* induced specific alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. This response involved selective increase of some metabolites, such as PGE₂ (11). Another study in spleen cells indicated an *ex-vivo* evidence for increased cyclooxygenase activity (12). Because LPS- and IFN- γ -induced COX-2 expression are modulated by PKC- α it was of interest to determine whether DN PKC- α -overexpression would influence COX-2 expression during phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. However, we failed to detect COX-2 expression in RAW 264.7 cells exposed to *L. donovani* promastigotes. In contrast to RAW 264.7 cells, IFN- γ treatment of BMM prior to infection with *L. donovani* promastigotes allowed the induction of COX-2 expression.

Whereas COX-2 mRNA and protein synthesis were inhibited, LPS-induced PGE₂ secretion was normal in DN PKC- α -overexpressing macrophages. A recent study reported that secretion of NO attenuates PGE₂ production in response to LPS in RAW 264.7 macrophages (47). Moreover, it was shown that NO suppresses the activity and expression of COX-2 mRNA in LPS-stimulated rat peritoneal macrophages (48). However, data obtained with the iNOS inhibitor L-NMMA (Table I) ruled out the possibility that our data are related to the low levels of NO secreted by LPS-stimulated DN PKC- α -overexpressing clones (16). In contrast, PGE₂ secretion was increased in DN PKC- α -overexpressing clones compared with control RAW 264.7 cells in response to IFN- γ .

In summary, we have provided evidence suggesting a role for PKC- α in the modulation of COX-2 expression in macrophages. Further knowledge of the mechanism

that regulates COX-2 expression may potentially lead to the development of novel anti-inflammatory therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank K. Chadee for critical comments and helpful discussions, J. Giroux for helping with calculations, and H. R. Herschman for the COX-2-luciferase reporter construct pTIS10L.

REFERENCES

1. Burch, R. M. 1987. Protein kinase C mediates endotoxin and zymosan-induced prostaglandin synthesis. *Eur. J. Pharmacol.* 142:431.
2. Russell, S. W. and J. L. Pace. 1984. Both the kind and magnitude of stimulus are important in overcoming the negative regulation of macrophage activation by PGE₂. *J. Leuk. Biol.* 35:291.
3. Dubois, R. N., S. B. Abramson, L. Crofford, R. A. Gupta, L. S. Simon, L. B. Van De Putte, and P. E. Lipsky. 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12:1063.
4. Langenbach, R., S. G. Morham, H. F. Tiano, C. D. Loftin, B. I. Ghanayem, P. C. Chulada, J. F. Mahler, C. A. Lee, E. H. Goulding, and K. D. Kluckman. 1995. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83:483.
5. Morham, S. G., R. Langenbach, C. D. Loftin, H. F. Tiano, N. Vouloumanos, J. C. Jennette, J. F. Mahler, K. D. Kluckman, A. Ledford, and C. A. Lee. 1995. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83:473.
6. Barrios-Rodiles, M. and K. Chadee. 1998. Novel regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production by IFN-gamma in human macrophages. *J. Immunol.* 161:2441.
7. Lee, S. H., E. Soyoola, P. Chanmugam, S. Hart, W. Sun, H. Zhong, S. Liou, D. Simmons, and D. Hwang. 1992. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 267:25934.
8. Bachwich, P. R., S. W. Chensue, J. W. Larrick, and S. L. Kunkel. 1986. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E₂ production in resting macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136:94.

9. Hla, T. and K. Neilson. 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:7384.
10. Riese, J., T. Hoff, A. Nordhoff, D. L. DeWitt, K. Resch, and V. Kaefer. 1994. Transient expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 during mouse macrophage activation. *J. Leuk. Biol.* 55:476.
11. Reiner, N. E. and C. J. Malemud. 1985. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *J. Immunol.* 134:556.
12. Reiner, N. E. and C. J. Malemud. 1984. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (*Donovani*): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. *Cell. Immunol.* 88:501.
13. Pfannkuche, H. J., V. Kaefer, and K. Resch. 1986. A possible role of protein kinase C in regulating prostaglandin synthesis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139:604.
14. Newton, A. C. 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270:28495.
15. Blobe, G. C., S. Stribling, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun. 1996. Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv.* 27:213.
16. St-Denis, A., F. Chano, P. Tremblay, Y. St-Pierre, and A. Descoteaux. 1998. Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 273:32787.
17. Huwiler, A. and J. Pfeilschifter. 1993. A role for protein kinase C-alpha in zymosan-stimulated eicosanoid synthesis in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Biochem.* 217:69.

18. Descoteaux, A. and G. Matlashewski. 1989. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*- infected macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 9:5223.
19. Descoteaux, A. and G. Matlashewski. 1990. Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 145:846.
20. Fletcher, B. S., D. A. Kujubu, D. M. Perrin, and H. R. Herschman. 1992. Structure of the mitogen- inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J. Biol. Chem.* 267:4338.
21. Finkenzeller, G., D. Marme, and H. Hug. 1990. Sequence of human protein kinase C alpha. *Nucleic Acids Res.* 18:2183.
22. Smith, W. L., R. M. Gravito, and D. L. DeWitt. 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271:33157.
23. Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67:227.
24. Arias-Negrete, S., K. Keller, and K. Chadee. 1995. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:582.
25. Futaki, N., I. Arai, Y. Hamasaka, S. Takahashi, S. Higuchi, and S. Otomo. 1993. Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 45:753.
26. Davidson, M. E., and R. J Lang. 2000. Effects of selective inhibitors of cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclo-oxygenase-2 (COX-2) on the spontaneous myogenic contractions in the upper urinary tract of the guinea-pig and rat. *Br. J. Pharmac.* 129:661.
27. Williams, J. A. and E. Shacter. 1997. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 272:25693.

28. Phipps, R. P., S. H. Stein, and R. L. Roper. 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol. Today* 12:349.
29. Pennisi, E. 1998. Building a better aspirin. *Science* 280:1191.
30. Wang, H. Q. and R. C. Smart. 1999. Overexpression of protein kinase C-alpha in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester- induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF-alpha expression but not tumor promotion. *J. Cell Sci.* 112:3497.
31. Bauer, M. K., K. Lieb, K. Schulze-Osthoff, M. Berger, P. J. Gebicke-Haerter, J. Bauer, and B. L. Fiebich. 1997. Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur. J. Biochem.* 243:726.
32. D'Acquisto, F., T. Iuvone, L. Rombola, L. Sautebin, M. Di Rosa, and R. Carnuccio. 1997. Involvement of NF-kappaB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett.* 418:175.
33. Kim, Y. and S. M. Fischer. 1998. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J. Biol. Chem.* 273:27686.
34. Sweet, M. J. and D. A. Hume. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leuk. Biol.* 60:8.
35. Yamamoto, K., T. Arakawa, N. Ueda, and S. Yamamoto. 1995. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor- interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 270:31315.
36. Wadleigh D. J., S. T. Reddy, E. Kopp, S. Ghosh, and H. R. Herschman. 2000. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* 275:6259.

37. Young, H. A. and K. J. Hardy. 1995. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leuk. Biol.* 58:373.
38. Adams, D. O. and T. A. Hamilton. 1987. Molecular transductional mechanisms by which IFN gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol. Rev.* 97:5.
39. Friedman, R. L. and G. R. Stark. 1985. alpha-Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314:637.
40. Kantakamalakul, W., A. D. Politis, S. Marecki, T. Sullivan, K. Ozato, M. J. Fenton, and S. N. Vogel. 1999. Regulation of IFN consensus sequence binding protein expression in murine macrophages. *J. Immunol.* 162:7417.
41. Politis, A. D., J. Sivo, P. H. Driggers, K. Ozato, and S. N. Vogel. 1992. Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine peritoneal macrophages. Induction by IFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha, dexamethasone, and protein kinase inhibitors. *J. Immunol.* 148:801.
42. Politis, A. D., K. Ozato, J. E. Coligan, and S. N. Vogel. 1994. Regulation of IFN-gamma-induced nuclear expression of IFN consensus sequence binding protein in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 152:2270.
43. Shaw, G. and R. Kamen. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46:659.
44. Hel, Z., S. Di Marco, and D. Radzioch. 1998. Characterization of the RNA binding proteins forming complexes with a novel putative regulatory region in the 3'-UTR of TNF-alpha mRNA. *Nucleic Acids. Res.* 26:2803.
45. Gueydan, C., L. Houzet, A. Marchant, A. Sels, G. Huez, and V. Kruys. 1996. Engagement of tumor necrosis factor mRNA by an endotoxin-inducible cytoplasmic protein. *Mol. Med.* 2:479.

46. Liew, F. Y. and C. A. O'Donnell. 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 32:161.
47. Patel, R., M. G. Attur, M. Dave, S. B. Abramson, and A. R. Amin. 1999. Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E2 production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J. Immunol.* 162:4191.
48. Habib, A., C. Bernard, M. Lebret, C. Creminon, B. Esposito, A. Tedgui, and J. Maclouf. 1997. Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 158:3845.

FOOTNOTES

1. This work was supported by grant MT-12933 from the Medical Research Council (MRC) of Canada and from an establishment grant from the Fonds FCAR du Québec. AD is a MRC Scholar.
2. Address correspondence to Albert Descoteaux, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7. Tel: (450) 687-5010; Fax: (450) 686-5501; email: albert.descoteaux@iaf.quebec.ca
3. Abbreviations used in this paper: COX, cyclooxygenase; IFN, interferon; PKC, protein kinase C; LPS, lipopolysaccharide; PG, prostaglandin; BMM, bone marrow derived-macrophage; L-NMMA, N^G-monomethyl-L-arginine monoacetate

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced COX-2 expression. Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence (lanes 1, 4, and 7) or in the presence of either 10 ng/ml (lanes 2, 5, and 8) or 100 ng/ml (lanes 3, 6, and 9) LPS for 8 h. Total RNA was extracted and Northern Blot analyses was performed (A) and cell extracts were prepared for Western Blot analyses (B) as described under Materials and Methods. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

Figure 2. Overexpression of PKC- α increases LPS-induced COX-2 promoter activity in RAW 264.7 macrophages. Adherent RAW 264.7 cells were transiently transfected with the COX-2/Luc reporter construct and pRL-TK were for 5 h, along with either the control vector (*hatched bars*) or the wild-type PKC- α expression vector (*open bars*). Cells were incubated for 7 h and then stimulated with 100 ng/ml LPS for 12 h. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Each experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in two separate experiments. $**p = 0.0001$ as compared with LPS-stimulated cells transfected with control vector.

Figure 3. Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression induced by LPS and IFN- γ . Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence (lanes 1, 5, and 9) or in the presence of either 100 U/ml IFN- γ (lanes 2, 6, and 10), 100 ng/ml LPS (lanes 3, 7, and 11) or a combination of both (lanes 4, 8, and 12) for 8 h. For priming experiments, cells were first incubated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h followed by additional stimulation with LPS, IFN- γ or both. Total RNA was extracted and Northern Blot analyses was performed (A) and cell extracts were prepared for Western Blot analyses (B) as described under Materials and Methods. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

Figure 4. Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression induced by *Leishmania donovani* promastigotes. Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence (lanes 1, 5, and 9) or in the presence of different stimuli, namely 100 U/ml IFN- γ (lanes 2, 6, and 10), *L. donovani* promastigotes (lanes 3, 7, and 11) or a combination of both (lanes 4, 8, and 12) for 8 h. For priming experiments, cells were first incubated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h followed by additional stimulation with *L. donovani*, IFN- γ or both. Total RNA was extracted and Northern Blot analyses was performed (A) and cell extracts were prepared for Western Blot analyses (B) as described under Materials and Methods. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

Figure 5. COX-2 expression in BMM. BMM were incubated in the absence (lane 1) or in the presence of different stimuli (lanes 2-6) for 8 h. For priming experiments, cells were first incubated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h followed by 100ng/ml LPS, *L. donovani* promastigotes, or 100 U/ml IFN- γ . Total RNA was extracted and Northern Blot analyses was performed (A) and cell extracts were prepared for Western Blot analyses (B) as described under Materials and Methods. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

Figure 6. Effect of DN PKC- α on PGE₂ secretion. Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence or presence of either 10 ng/ml or 100 ng/ml LPS (A), 100 U/ml IFN- γ (B) or a combination of 100 U/ml IFN- γ and 100 ng/ml LPS (C) for 8 h. Cells stimulated with IFN- γ were first incubated for 18 h with 100 U/ml IFN- γ . Levels of PGE₂ in cell supernatant were determined by Elisa as described under Materials and Methods. Each experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with IFN- γ -treated control cells.

Figure 1: Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced COX-2 expression

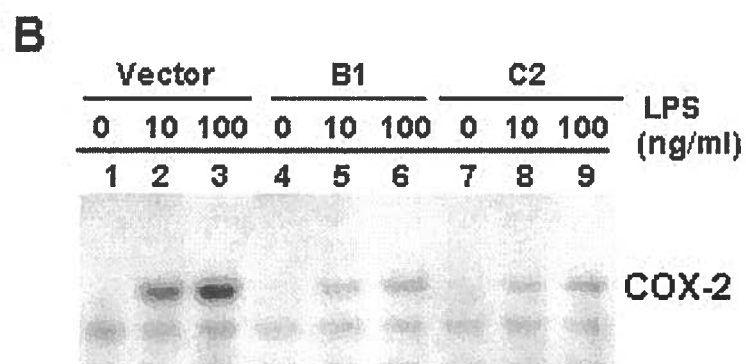
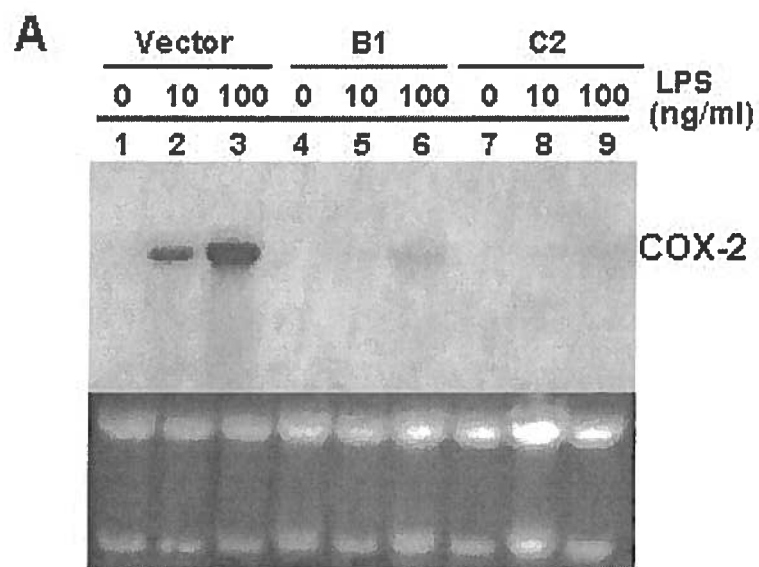


Figure 2: Overexpression of PKC- α increases LPS-induced COX-2 promoter activity in RAW 264.7 macrophages

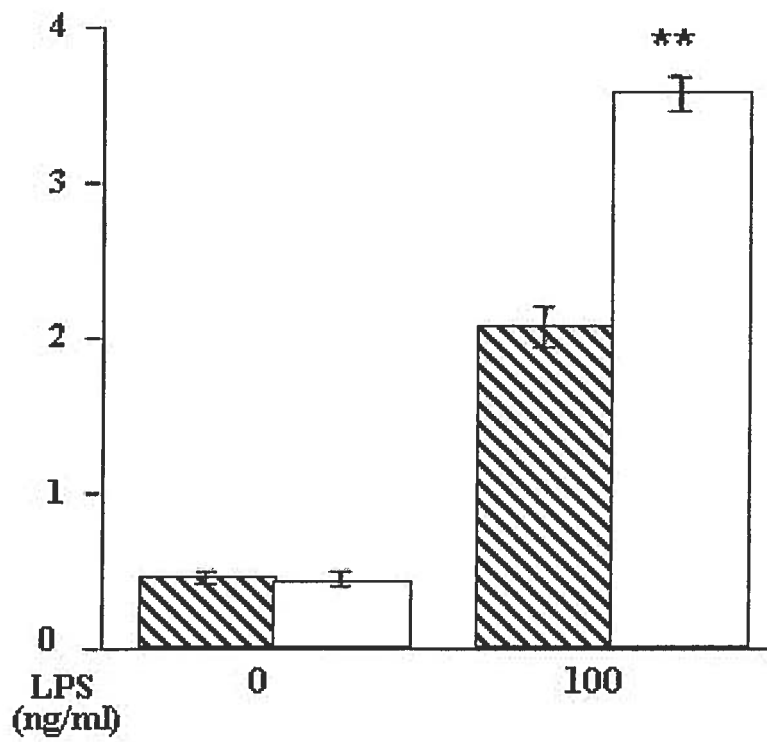
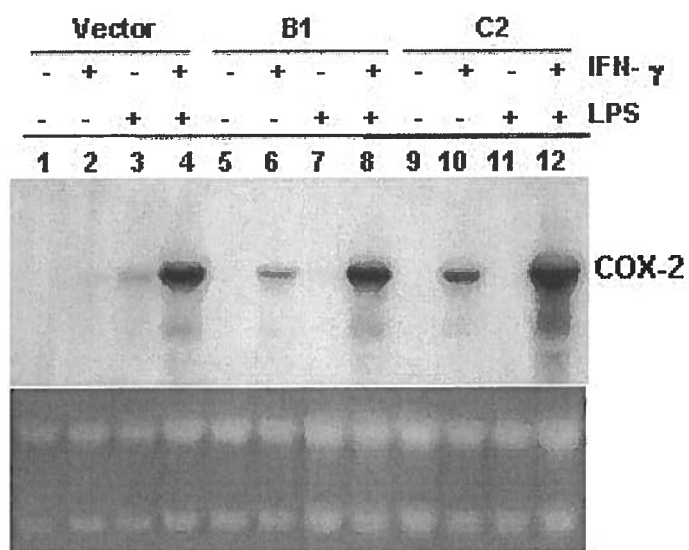


Figure 3: Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression induced by LPS and IFN- γ

A



B

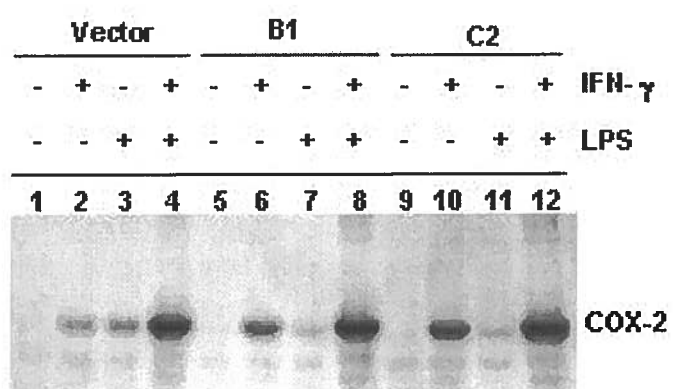
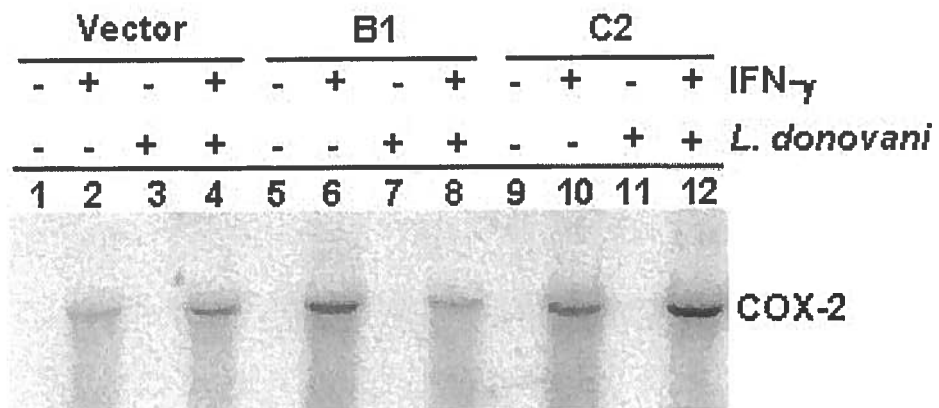


Figure 4: Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression induced by *L. donovani* promastigotes

A



B

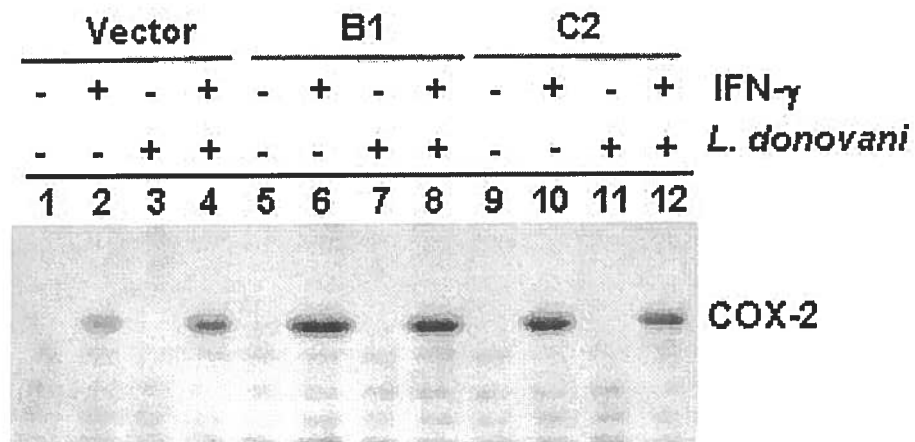


Figure 5: COX-2 expression in BMM

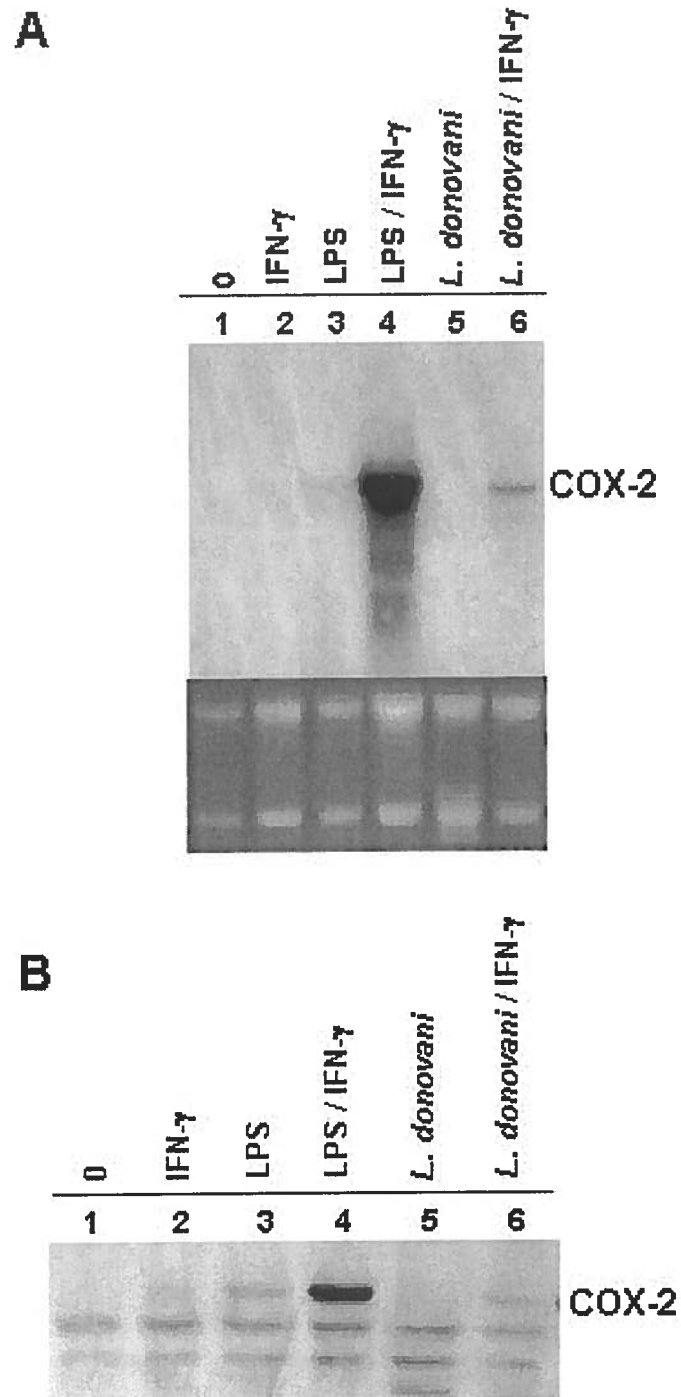


Figure 6: Effect of DN PKC- α on PGE₂ secretion

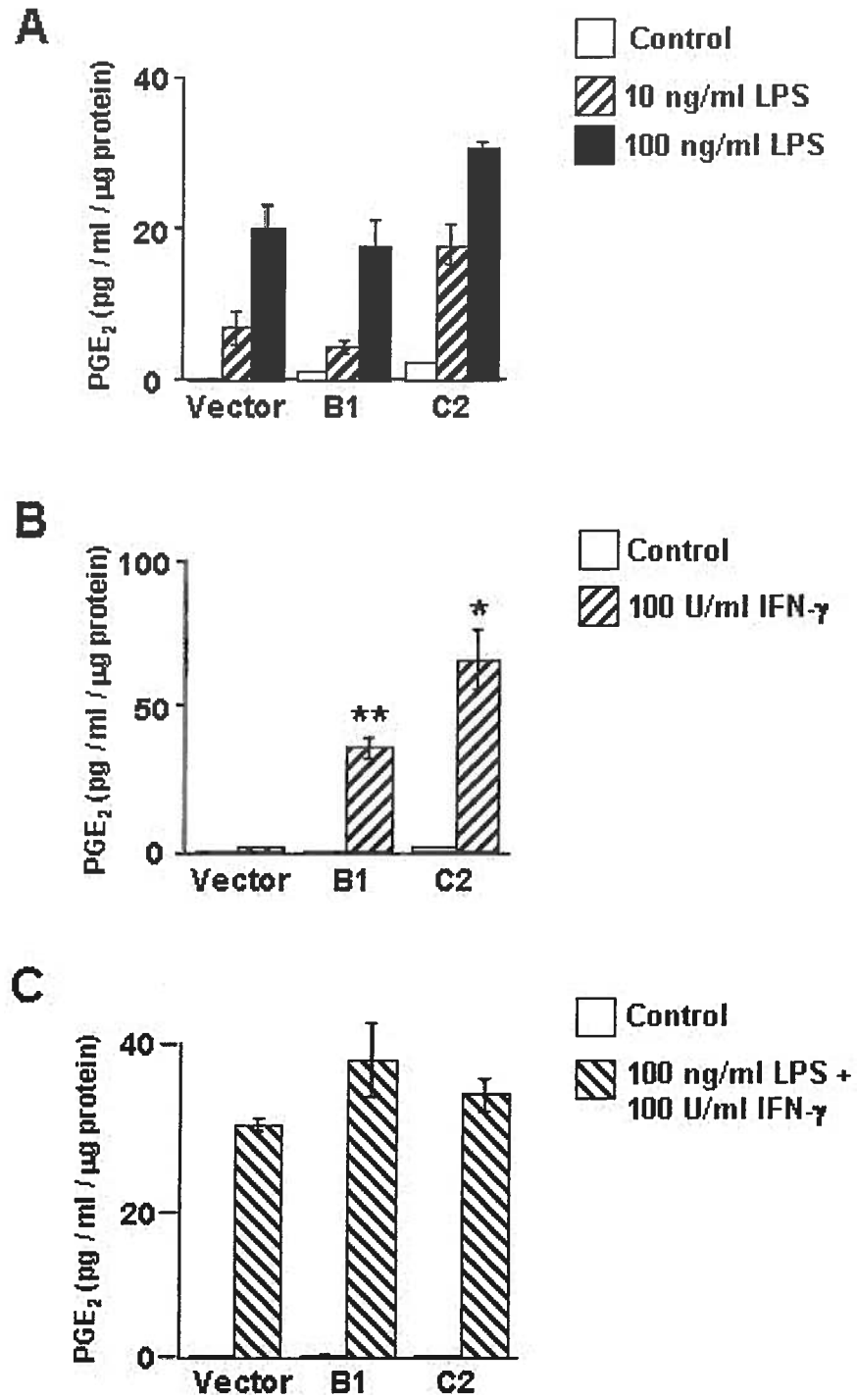


Table I. *Effect of COX and iNOS inhibitors on LPS-induced PGE₂ secretion in RAW 264.7 macrophages*^a

Inhibitors	PGE ₂ (pg/ml/ug protein) ^b			
	Vector		Clone C2	
	Control	LPS	Control	LPS
None	0.07 ± 0.00	12.89 ± 0.91	0.09 ± 0.04	13.58 ± 3.20
NS-398	0.13 ± 0.06	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.04
Valeryl Salicylate	0.12 ± 0.01	7.61 ± 1.63	0.16 ± 0.07	6.12 ± 0.83
L-NMMA	0.12 ± 0.05	13.20 ± 1.34	0.15 ± 0.05	14.19 ± 2.12

^a Macrophages (2.5×10^5 per well) were incubated for 15 min in the absence or presence of either NS-398 (5 μ m), valeryl salicylate (1 mM), or L-NMMA (500 μ m) prior to the addition of 100 ng/ml LPS. PGE₂ levels in the supernatants were measured after 8 h as described in *Materials and Methods*.

^b Results are expressed in picograms per milliliter PGE₂ produced per microgram total protein. The values represent the mean \pm SD of one experiment performed in triplicate samples. Similar results were obtained in a separate experiment.

CHAPITRE II

(La présentation antigénique chez le macrophage: Étude des mécanismes moléculaires
qui modulent l'expression du CMH de classe II)

Résumé de la deuxième publication

« IFN- γ -induced MHC class II expression : transactivation of CIITA promoter IV by IRF-1 is regulated by Protein Kinase C- α . *J. Immunol.* 2003. 171 (8) 4187-4194 »

Des évidences pharmacologiques suggèrent l'implication de PKC dans la régulation de l'expression du CMH de classe II. Les travaux présentés dans le présent article avaient pour but d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels PKC- α module l'expression du CMH de classe II en réponse à l'IFN- γ dans la lignée de macrophage murin RAW 264.7. En réponse à l'IFN- γ , la surexpression du DN de PKC- α inhibe l'expression du CMH de classe II mais n'a aucun effet ni sur la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN de STAT1, ni sur l'expression d'iNOS, du CMH de classe I, d'IRF-1, d'ICSBP et d'IP-10. CIITA est un facteur de transcription essentiel à l'expression du CMH II. Nos expériences ont permis de démontrer que l'accumulation d'ARNm de CIITA est fortement diminuée chez les macrophages surexprimant le mutant DN de PKC- α . De plus, des expériences de transfections transitoires utilisant un vecteur rapporteur contenant le promoteur IV du gène CIITA révèlent que la surexpression d'une forme constitutivement active de PKC- α augmente la capacité de transactivation de IRF-1 sans augmenter celle de IRF-2. Des différences au niveau des modifications post-traductionnelles de IRF-1 ont également été observées entre les cellules témoins et les cellules surexprimant le mutant DN de PKC- α . Collectivement, nos données suggèrent un nouveau mécanisme de régulation pour l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ , par lequel PKC régule l'expression de CIITA en modulant de façon sélective l'activité transcriptionnelle de IRF-1.

IFN- γ -induced MHC class II expression: transactivation of CIITA promoter IV by IRF-1 is regulated by protein kinase C- α *

Mélanie Giroux[†], Manuel Schmidt[‡], and Albert Descoteaux^{†§}

[†]INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

[‡]Mologen GmbH, 14195 Berlin, Germany

Publié dans: *Journal of Immunology*, 171: 4187-4994 (2003)

Running title: Protein kinase C- α modulates IFN- γ -induced MHC class II expression

Keywords: Macrophages; MHC; Transcription Factors; Gene Regulation

§ Address correspondence to Dr Albert Descoteaux, INRS- Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval QC, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010 ext 4465; Fax: (450) 686-5301; Email: albert.descoteaux@inrs-iaf.quebec.ca

Abstract

Previous studies based on pharmacological evidence suggested a requirement for protein kinase C (PKC) activity in the regulation of IFN- γ -induced MHC class II expression. In the present study, we investigated the molecular mechanisms by which PKC- α modulates IFN- γ -induced MHC class II expression in the mouse macrophage cell line RAW 264.7. Overexpression of a dominant-negative (DN) mutant of PKC- α inhibited the expression of IFN- γ -induced MHC class II but had no effect on IFN- γ -induced STAT1 nuclear translocation and DNA binding activity, as well as on the expression of iNOS, ICSBP, MHC I, IRF-1, and IP-10. Further analysis showed that IFN- γ -induced expression of the MHC class II transactivator (CIITA), a transcriptional coactivator essential for MHC class II expression, was inhibited in DN PKC- α -overexpressing cells. Studies with reporter constructs containing the promoter IV region of CIITA revealed that overexpression of a constitutively active mutant of PKC- α enhanced IRF-1, but not IRF-2, transcriptional activity. Furthermore, characterization of IRF-1 from both normal and DN PKC- α -overexpressing cells revealed differences in IRF-1 posttranslational modifications. Collectively, our data suggest a novel regulatory mechanism for IFN- γ -induced MHC class II expression, whereby PKC regulates CIITA expression by selectively modulating the transcriptional activity of IRF-1.

Introduction

Major histocompatibility complex class II (MHC class II) molecules play a pivotal role in the induction and regulation of immune responses by virtue of their ability to present peptides derived mainly from processed extra-cellular antigens to CD4⁺ T helper lymphocytes (1, 2). Although constitutively present on "professional" antigen-presenting cells (monocytes/macrophages, B cells, and dendritic cells), MHC class II expression can be induced in most cell types and tissues by IFN- γ (1, 3, 4).

The regulation of both constitutive and IFN- γ inducible MHC class II expression occurs primarily at the transcriptional level. The signaling cascade leading to MHC class II gene expression in response to IFN- γ is initiated by the activation of the protein tyrosine kinases Jak1 and Jak2 and the subsequent tyrosine phosphorylation and dimerization of Stat1. Then, Stat1 dimers translocate to the nucleus where they bind to IFN- γ -activated sequence (GAS³) elements present in the promoters of IFN- γ -responsive genes (5). Such genes include the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-1 and the transcriptional coactivator CIITA. IRF-1, which is strongly inducible by IFN- γ , binds promoter sequences known as IFN-stimulated responsive element (ISRE) (6), and is essential for CIITA induction by IFN- γ (7). CIITA is a non-DNA binding transcriptional coactivator essential for both constitutive and IFN- γ -inducible MHC class II expression (8, 9). *CIITA* gene expression is controlled by the alternative usage of three distinct promoters: constitutive expression in dendritic cells and B lymphocytes by promoters I and III, respectively, and IFN- γ -inducible expression in other cell types mainly by promoter IV (10). However, a recent study revealed that in macrophages, both type I and type IV CIITA are responsive to IFN- γ (11). Although the regulation of type I CIITA remains to be elucidated, IFN- γ inducibility of type IV CIITA is dependent mainly upon an ISRE, a GAS and an adjacent E-box, which bind the transcription factors IRF-1, STAT1 and upstream stimulating factor-1 (USF-1), respectively (12).

Previous studies using protein kinase C (PKC) inhibitors suggested that IFN- γ -induced MHC class II expression requires the activation of PKC in macrophages and astrocytes (13-15). Furthermore, microinjection of peritoneal macrophages with purified PKC was sufficient to induce MHC-II expression, suggesting that PKC participates in the regulation of MHC-II expression (16). Despite that considerable progress was made concerning the elucidation of the transcriptional events leading to IFN- γ -induced MHC class II expression, the role of PKC in this process remains poorly understood. At least six isoenzymes of PKC, a family of protein serine/threonine kinases, are expressed in macrophages but knowledge on their respective roles in the regulation of macrophage functions is limited. Using clones of the RAW 264.7 macrophage cell line overexpressing a dominant-negative mutant of PKC- α (DN PKC- α) (17), we have accumulated evidence that PKC- α is involved in the regulation of several macrophage functions, including LPS- and IFN- γ -induced responses, as well as phagocytosis (17-19). In the present study, we report that PKC- α selectively regulates IFN- γ -induced expression of MHC class II by modulating the ability of IRF-1 to transactivate the CIITA promoter IV. These results suggest that PKC- α participates in the development of a proper adaptive immune responses in macrophages.

Materials and Methods

Cell lines. The murine macrophage cell line RAW 264.7 transfected with the expression vector pCIN-4, and the DN PKC- α -overexpressing clones A2, B1 and C2 (17) were cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in DMEM with glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada), containing 10% heat-inactivated FBS (HyClone, Logan, UT), 10 mM Hepes pH 7.3, antibiotics, and 500 μ g/ml G418 (Life Technologies).

Northern blot analyses. Total RNA extraction and Northern blot analyses were performed essentially as described previously (17, 20). The probe for murine MHC-II (H2-IA- α ; *d* haplotype) consisted of a 591-bp fragment from the MHC-II cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-70 (forward) (5'-ggaattcTGGGAATCTCAGGTTCCCAGTG-3') and AD-71 (reverse) (5'-ggaattcTGAACACCATGCTCAGCCTCTG-3'). The probe for murine MHC-I (H2-K *d*) consisted of a 518-bp fragment from the MHC-I cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-92 (forward) (5'-ggaattcGATTACATCGCCCTGAACG-3') and AD-93 (reverse) (5'-ggaattcAATTCAAGGACAACCAGAACAGCAATG-3'). The probe for murine IP-10 was the 500-bp *EcoRI* fragment from C7-1 (21) (from the American Type Culture Collection). The inducible nitric oxide synthase (iNOS) probe was the 817-bp *HincII-EcoRI* fragment from piNOSL3 (22) (provided by D. Radzioch, McGill University, Montreal, Canada). The probe for murine ICSBP was the 1.2-kb *EcoRI* fragment from pSK-ICSBP (23) (kindly provided by K. Ozato, NIH). The probe for murine IRF-1 consisted of a 207-bp fragment from the IRF-1 cDNA obtained by PCR amplification using oligodeoxynucleotides AD-134 (forward) (5'-CAGAGGAAAGAGAGAAAGTCC-3') and AD-135 (reverse) (5'-CACACGGTGACAGTGCTGG-3').

RT-PCR reactions. Total RNA was prepared as described previously (17, 20). The relative quantities of mRNA for CIITA and hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), were determined by RT-PCR. For cDNA synthesis, 5 μ g of total RNA, 1 μ l of oligo-d(T) primer (Amersham Pharmacia Biotech), and RNase-free water

were added to a sterile microcentrifuge tube to obtain a total volume of 14 μ l. This reaction mixture was heated at 70 C for 10 min, placed on ice for 1 min and the following components were added: 2 μ l 10X synthesis buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 1 μ g/ μ l BSA), 1 μ l 10 mM dNTP mix (Amersham Pharmacia Biotech), 2 μ l 0.1 M DTT, and 1 μ l of AMV reverse transcriptase (Amersham Pharmacia Biotech, 20 U/ μ l). Samples were then incubated at room temperature for 10 min, 42 C for 50 min, and 70 C for 15 min. For PCR reactions, samples were amplified under the following conditions: 30 sec at 94 C, 1 min at 50 C, and 1 min at 72 C (30 cycles). After the PCR amplification reaction, 20 μ l of PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1.3% agarose gel. The primers used for *CIITA* were AD-157 (forward) (5'-CAAGTCCCTGAAGGATGTGGA-3') and AD-158 (reverse) (5'-ACGTCCATCACCCGGAGGGAC-3'). The primers used for type I *CIITA* were AD-263 (forward) (5'-AAGAGCTGCTCTCACGGGAAT-3') and AD-268 (reverse) (5'-CTCTGCTCCAATGTGCTCCTA-3'). The primers used for type IV *CIITA* were AD-267 (forward) (5'-ACAGCCACAGCCGCGACCATA-3') and AD-268 (reverse) (5'-CTCTGCTCCAATGTGCTCCTA-3'). The primers used for *HPRT* were AD-55 (forward) (5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3') and AD-56 (reverse) (5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3').

Western blot analyses. Western blot analyses were performed as described previously (17). Rabbit polyclonal antisera against IRF-1 and IRF-2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Plasmids. For the dual luciferase assays, the upstream 377 bp of the type IV promoter of *CIITA* was PCR-amplified and cloned into the pGL3-basic firefly luciferase reporter vector (Promega, WI, USA). The two putative transcription factors binding sites, ISRE and GAS, were mutated as described previously (24). The GAS element was changed from TTCTGAGAAA to TAGTGAGAAA and the ISRE motif from GAAAGTGAAAGG to GAAAGTGGTGGG. Mouse IRF-2 expression vector was constructed as described (25). The primers used for PCR-amplification of IRF-1 were (forward) (5'-CGGATCCCTCCGGCACCCCTCTGCGA-3') and (reverse) (5'-GAATTCGGAGGGAGACAAGAACGGGTCAGA-3') and the IRF-1 product was

then inserted into pcDNA3 (BamHI/EcoRI) (Invitrogen, NV Leek, The Netherlands). The constitutively active (CA) PKC- α expression vector was provided by Dr G. Baier (University of Innsbruck, Austria). The pRL-TK plasmid encoding the Renilla luciferase was from Promega (Madison, WI). pRcCMV was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Transient transfections. Adherent cells (2.5×10^5 /well) were transfected using Fugene (Roche Diagnostics, Laval, Canada) with 0.3 μ g of the CIITA luciferase reporter construct, and various combinations of pRcCMV, CA PKC- α , IRF-1 and IRF-2 expression vector, as indicated in the Results section, for a total of 0.7 μ g. All transfections included 0.15 μ g of pRL-TK (Promega) to control for transfection efficiency. Cells were transfected with 100 μ l DNA/Fugene mix in 1 ml of medium for 6 h, and then fresh medium containing 5% heat-inactivated FBS was added. Cells were treated 18 h later with 100 U/ml IFN- γ for 8 h 30 min and lysed in Reporter lysis buffer (Promega). Firefly and *Renilla* luciferase values were obtained by analyzing 20 μ l of cell extracts with the Dual Luciferase kit (Promega) using a Lumat LB 9507 luminometer (EG & G Berthold, Nashua, NH). Statistically significant differences were identified using unpaired Student's *t* test. Values of $p = 0.05$ were considered statistically significant.

Nuclear extracts and Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Adherent cells (8×10^6 /100-mm tissue culture dish) were stimulated with 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points, washed, and scraped into 1.5 ml of cold PBS. Cell suspensions were transferred into microcentrifuge tubes, pelleted, and the nuclear protein extracts were prepared essentially as described (25). Protein contents were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and the extracts were stored at -70 C. EMSA were performed using the following oligonucleotides as probes: CIITA-IRF-1 consensus oligonucleotide (5'- GGTGTAGACAGAAAGTGAAAGGGGAAAAGCGCCACAGA -3') corresponds to the type IV CIITA promoter sequence -81 to -43 (10, 12). The GAS-probe (5'- AGCCATTTCCAGGAATCGAAA -3') was derived from the Mg21

promoter sequence and contains a GAS site identical to the optimum GAS sequence (TTCCSGGAA) for STAT-1 binding (26). ³²P-labeled CIITA-IRF-1 oligonucleotide was incubated with 10 µg of nuclear extracts for 30 min at room temperature in a volume of 20 µl containing 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 12% glycerol, 1 µg salmon sperm DNA and 1 µg poly(dI:dC). ³²P-labeled GAS-probe was incubated with 5 µg of nuclear extracts for 20 min at room temperature in a volume of 20 µl containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 50 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0.2% Nonidet P-40 and 1 µg poly(dI:dC). The CIITA-IRF-1-protein or GAS-protein complexes were separated from free oligonucleotides by electrophoresis under nondenaturing conditions in a 6% polyacrylamide gel at 250 V in 1X TGE (50 mM Tris-HCl, 380 mM glycine, 2 mM EDTA) and in a 5% polyacrylamide gel at 180 V in 0.5X TBE (44.5 mM Tris-HCl, 44.5 mM borate, pH 8.0 and 1 mM EDTA), respectively. The gels were exposed to a phosphor screen which was scanned on a PhosphoImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Immunoprecipitations and immunoblotting. Adherent cells (8×10^6 /100-mm tissue culture dish) were stimulated with 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Cells were washed once with PBS, homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitors, and protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Immunoprecipitations and immunoblottings were performed as described previously (19). Anti-STAT1 or anti-JAK2 antibodies were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Tyrosine phosphorylation was analyzed using the mouse anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (4G10).

In vivo phosphorylation of IRF-1. Adherent RAW 264.7 cells (1×10^7 /100-mm tissue culture dish) were incubated for 2 h in 3 ml phosphate-free DMEM with glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada) supplemented with 0.5 mCi/ml ³²Pi (Amersham Biosciences Inc, Baie d'Urfé, Québec) before the addition of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Cells were then washed with ice-cold PBS and homogenized in

immunoprecipitation buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Total extracts were immunoprecipitated as described previously (19) and separated on 10% SDS-PAGE. The gels were exposed to a phosphor screen which was scanned on a PhosphoImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) to determine IRF-1 phosphorylation.

2-D Gel Electrophoresis. Preparation of cell extracts and immunoprecipitation were performed as described previously (19). Anti-IRF-1 antibodies used for immunoprecipitation were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Solubilisation of proteins were performed in a buffer containing 8 M urea, 2 M thiourea, 4 % CHAPS, DTE 40 mM, Tris-HCl 20 mM, 2% IPG buffer (Amersham Biosciences Inc, Baie d'Urfé, Québec), 0.5 µl Bromophenol blue (0.5%). Proteins were first separated according to their isoelectrical point along 7-cm linear immobilized pH-gradient strips (Amersham Biosciences Inc) using IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham Pharmacia Biotech). The strips were then equilibrated in a solution containing 13 mM DTE for 10 min, followed by a solution containing 2.5 % iodoacetamide for 5 min. The proteins were finally separated according to their molecular mass using 10% SDS-PAGE, transferred on Hybond-ECL membranes, and detected by Western blot analysis using anti-IRF-1 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Translocation of PKC- α . Adherent RAW 264.7 cells were transfected using Gene Porter (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) with 0.6 µg of the hPKC- α -GFP construct (provided by C. Quittau-Prévostel, INSERM, France). Cells were seeded (1×10^5 /well) in 24-well plates containing microscope coverslips (Fisher Scientific) for 1 day, transfected with 250 µl DNA/Gene Porter mix for 5 h, and further incubated in medium for 18 h. Cells were then stimulated for 2 h with 100 U/ml IFN- γ , fixed with 2% formaldehyde, permeabilized with ice-cold PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% BSA for 10 min at room temperature and then, incubated with Alexa Fluor 568 phalloidin (Molecular Probes, Oregon, USA). Coverslips were washed six times with PBS and mounted with Fluoromount-G (Interscience, Markham, Ontario). Analyses were

performed using a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) installed on an Eclipse E800 microscope. Phalloidin fluorescence and translocation of PKC- α -GFP were analyzed using an argon/krypton laser respectively at 568 nm and at 488 nm both with a Plan Apo Nikon 60x (NA 1.4) oil immersion lens. At least 20-30 cells from each of two independent experiments were examined under each experimental conditions. Images were acquired in the normal scanning mode with a Kalman filter of 10 using the LaserSharp software.

Interaction between PKC- α and IRF-1. 293T cells were grown to 75-85% confluence in 100mm-tissue culture dish. Cells were transfected with 15 μ g of IRF-1 expression vector, and either 15 μ g of pRcCMV or CA PKC- α expression vector using calcium phosphate co-precipitation technique. Plasmid DNA and water were mixed to a total volume of 450 μ l and 50 μ l of 2.5 M CaCl₂ was added. The calcium/DNA solution was mixed quickly with 500 μ l HeBS 2X buffer (140 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH 7.05) and the precipitate was immediately added to the dishes. Cells were transfected 8 h at 37°C, washed twice with methionine-free DMEM with glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada), and then incubated for 16 h in methionine-free DMEM with glutamine supplemented with 0.2 mCi/ml [³⁵S]methionine (Amersham Biosciences Inc, Baie d'Urfé, Québec). After the labelling period, cells were washed with ice-cold PBS and then homogenized in lysis buffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.4, 0.2% Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitors. Total cell extracts were subjected to immunoprecipitation as described previously (19) with antibodies to IRF-1 (Santa Cruz, CA) and to PKC- α (Santa Cruz, CA). The IRF-1 immunoprecipitate was denatured by a treatment of 5 min at room temperature and 5 min at 95°C in 50 μ l elution buffer (1% SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 10 mM DTT), and 10 μ l of 10% BSA was added. Samples were then diluted in 1 ml with lysis buffer containing 10 mM iodoacetamide, cleared by centrifugation and the second immunoprecipitation was performed with anti-IRF-1 and anti-PKC- α antibodies. Proteins were analyzed on 10% SDS-PAGE and dried gels were exposed to a phosphor screen which was scanned on a PhosphoImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Results

DN PKC- α overexpression selectively inhibits IFN- γ -induced MHC class II mRNA accumulation.

Using clones of the mouse macrophage cell lines overexpressing a DN PKC- α , we previously obtained evidence for the involvement of PKC- α in the modulation of IFN- γ -induced COX-2 expression in macrophages (18). To further investigate the role of PKC- α in the modulation of IFN- γ -induced responses, we first determined whether IFN- γ alters the intracellular localization of PKC- α . To this end, we transiently transfected RAW 264.7 cells with a PKC- α -GFP expression vector. Incubation in the presence of 100 U/ml IFN- γ induced the translocation of PKC- α -GFP from the cytoplasm to the nucleus within 2 h (Figure 1A). We next compared the expression of several genes in normal RAW 264.7 cells (transfected with the empty vector) and in DN PKC- α -overexpressing clones (B1 and C2; (17)) after stimulation with 100 U/ml IFN- γ alone or in combination with 100 ng/ml LPS. MHC class II mRNA accumulation was completely abrogated in DN PKC- α overexpressing clones B1 and C2 (Fig. 1B, *lanes 5 and 8*) compared to the levels observed in normal cells (Fig. 1B, *lane 2*). It has been demonstrated that LPS down-modulates the accumulation of Ia mRNA induced by IFN- γ (27, 28). Accumulation of MHC class II mRNA decreased in normal RAW 264.7 macrophages in response to a combination of IFN- γ and LPS (Fig. 1B, *lane 3*) compared with the levels observed for IFN- γ -induced mRNA in control cells (Fig. 1B, *lane 2*). Consistent with the inhibition of IFN- γ -induced MHC class II mRNA accumulation, DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 failed to express MHC class II mRNA in response to LPS and IFN- γ (Fig. 1B, *lanes 6 and 9*). The inhibitory effect of DN PKC- α on IFN- γ -induced MHC class II expression was not the consequence of a general defect in IFN- γ -induced responses, since the expression of several other IFN- γ -inducible genes (iNOS, ICSBP, IRF-1, MHC-I, and IP-10) was not affected by DN PKC- α (Fig. 1B, *lanes 2, 5 and 8*). Furthermore, IFN- γ -induced tyrosine phosphorylation on STAT1 and JAK2 (Fig. 2A) as well as the kinetics of STAT1 nuclear translocation and DNA binding activity (Fig. 2B) were normal in DN PKC- α -overexpressing cells. Collectively, these

data indicated that DN PKC- α selectively inhibits IFN- γ -induced MHC class II mRNA accumulation, downstream of STAT1 activation.

PKC- α modulates IFN- γ -induced type IV CIITA expression.

CIITA is a master-regulator of both inducible and constitutive MHC class II expression (7, 9). To elucidate the mechanism by which DN PKC- α inhibits IFN- γ -induced MHC class II expression, we compared the accumulation of total CIITA mRNA in normal RAW 264.7 cells and in DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 after stimulation with 100 U/ml IFN- γ . In normal RAW 264.7 cells, IFN- γ induced the expression of total CIITA mRNA in a time-dependent manner (Fig. 3A, lanes 1-4). In contrast, IFN- γ -induced total CIITA mRNA levels were barely detectable in DN PKC- α -overexpressing clone B1 and C2 (Fig. 3A, lanes 5-12). Thus, similar to IFN- γ -induced MHC class II expression, DN PKC- α overexpression inhibited IFN- γ -induced CIITA gene expression in RAW 264.7 macrophages. These results raised the possibility that PKC- α modulates IFN- γ -induced MHC class II gene expression by regulating CIITA expression. In macrophages, CIITA IFN- γ -inducible expression is mainly regulated by promoters I and IV (10, 11, 29). In IFN- γ -stimulated RAW 264.7 cells, type IV CIITA was induced earlier and more abundantly than type I CIITA (Fig. 3B, lanes 2 and 3). Overexpression of DN PKC- α strongly inhibited IFN- γ -induced type IV CIITA mRNA accumulation and slightly reduced IFN- γ -induced type I CIITA mRNA (Fig. 3B, lanes 5 and 6), suggesting that PKC- α modulates IFN- γ -induced type IV CIITA expression. To further address the role of PKC- α in the induction of type IV CIITA expression, we transiently transfected RAW 264.7 cells with a constitutively active (CA) PKC- α expression vector, and a type IV CIITA promoter reporter construct. Expression of CA PKC- α had no significant effect on basal CIITA promoter IV activity in untreated RAW 264.7 cells (Fig. 3C). In contrast, CA PKC- α significantly increased IFN- γ -stimulated CIITA promoter IV activity by ~1.6-fold (Fig. 3C, $p = 0.005$, $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. Similar results were obtained with a wild-type PKC- α expression vector (data not shown). These data are consistent with PKC- α playing a role in modulating type IV CIITA expression in IFN- γ -stimulated macrophages. To determine the influence of

PKC- α on the various promoter IV elements, we transiently transfected RAW 264.7 cells with the CA PKC- α expression vector and reporter constructs containing either the GAS-mutated or the ISRE-mutated promoter IV region. As previously shown (12), we observed that both GAS and ISRE elements were important for promoter IV activity in untreated as well as in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 cells (Fig. 3C). In untreated cells, CA PKC- α significantly increased basal activity of promoter IV containing the GAS-mutated region by ~ 1.7 -fold (Fig. 3C, $p = 0.005$, $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. In IFN- γ -treated cells, CA PKC- α significantly increased promoter activity of promoter IV containing the GAS-mutated region by ~ 2 -fold (Fig. 3C, $p = 0.002$, $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. But intriguingly, the construct containing the ISRE-mutated region was less induced by CA PKC- α in untreated and in IFN- γ -treated cells. We obtained similar results with cells transfected with a wild-type PKC- α expression vector (data not shown). These results suggested that PKC- α might modulate the activity of ISRE-binding and IFN- γ -activated factors to stimulate type IV CIITA promoter. These transcription factors may be IRF-1 or IRF-2

Expression and DNA binding activity of IRF-1 and IRF-2 are normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells.

Since both IRF-1 and IRF-2 are involved in IFN- γ -induced CIITA expression (7, 30), we have determined whether expression of these proteins was affected by DN PKC- α . In both control RAW 264.7 cells (Fig. 4A, lanes 1-4) and DN PKC- α overexpressing cells (clone B1, Fig. 4A, lanes 5-8 and clone C2, Fig. 4A, lanes 9-12), IRF-1 was equally induced by IFN- γ . Similarly, IRF-2 was constitutively expressed to similar levels in control cells (Fig. 4A, lanes 1-4) as well as in DN PKC- α -overexpressing clones B1 (Fig. 4A, lanes 5-8) and C2 (Fig. 4A, lanes 9-12). In addition, the kinetics of IRF-1 nuclear translocation and DNA binding activity were similar in IFN- γ -stimulated control cells and DN PKC- α -overexpressing clones C2 (Fig. 4B). We obtained similar data with DN PKC- α -overexpressing clones B1 and A2 (data not shown). Supershift experiments using antibodies to IRF-1 and IRF-2, revealed that IRF-1 was the major factor bound to

the IRF element in the CIITA promoter IV (data not shown). Collectively, these results indicated that IFN- γ -induced IRF-1 expression and DNA binding activity, as well as IRF-2 expression are not affected by DN PKC- α .

PKC- α increases IFN- γ -induced transactivating activity of IRF-1 but not IRF-2.

To investigate the role of PKC- α in IFN- γ -induced activation of IRF-1 or IRF-2, we transiently transfected RAW 264.7 cells with either CA PKC- α , IRF-1, IRF-2 expression vectors or a combination of CA PKC- α and IRF-1 or IRF-2 expression vectors along with the CIITA promoter IV reporter construct. As previously reported (30), we observed that expression of both IRF-1 and IRF-2 increased basal and IFN- γ -induced promoter IV activity. In untreated RAW 264.7 cells, basal promoter IV activity was significantly increased by 4.2-fold with the IRF-1 expression vector (Fig. 5, $p < 0.0001$, $n = 3$) and by 3.9-fold with IRF-2 expression vector (Fig. 5, $p < 0.0001$, $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. In IFN- γ -treated RAW 264.7 cells, promoter IV activity was increased by 2.1-fold with the IRF-1 expression vector (Fig. 5, $p < 0.0001$, $n = 3$) and by 1.8-fold with the IRF-2 expression vector (Fig. 5, $p = 0.004$, $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. Co-transfection of CA PKC- α with IRF-1 had a significant effect on IRF-1 transactivating activity, further increasing type promoter IV activity in untreated cells by 2-fold (Fig. 5, $p < 0.0001$, $n = 3$) and in IFN- γ -treated cells by 1.4-fold (Fig. 5, $p = 0.03$, $n = 3$) with respect to cells transfected with the IRF-1 expression vector. In contrast, CA PKC- α had no effect on IRF-2-dependent basal (Fig. 5, $p = 0.324$, $n = 3$) and IFN- γ -induced (Fig. 5, $p = 0.843$, $n = 3$) promoter IV activity. These data indicate that PKC- α modulates IRF-1, but not IRF-2, transactivating activity to induce CIITA promoter IV transcription.

Effect of DN PKC- α overexpression on the modulation of IFN- γ -induced IRF-1 posttranslational modifications.

Both IRF-1 and IRF-2 undergo posttranslational modifications such as phosphorylation and acetylation (31-35). To assess the impact of PKC- α on IRF-1 posttranslational modifications, we first compared the phosphorylation of IRF-1 in IFN- γ -treated normal

RAW 264.7 cells and DN PKC- α -overexpressing cells. As shown in Figure 6A, there was no detectable difference in the kinetics and levels of IRF-1 phosphorylation in these cells. However, two-dimensional gel electrophoresis analysis revealed that the migration in a pH gradient of IRF-1 from DN PKC- α -overexpressing cells was delayed with respect to the migration of IRF-1 from normal RAW 264.7 cells (Figure 6B). To determine whether IRF-1 and PKC- α directly interact, we performed an immunoprecipitation-recapture assay. The observation that PKC- α was recaptured from IRF-1 immunoprecipitate in 293T cells transfected with both IRF-1 and CA PKC- α expression vectors (Figure 6C, *lane 7*) suggested that both proteins interact *in vivo*. The specificity of the interaction was evidenced by the absence of bands corresponding to PKC- α in IRF-1 immunoprecipitate from cells transfected only with the IRF-1 expression vector (Figure 6C, *lane 3*).

Discussion

Previous studies based on pharmacological agents suggested that PKC participates in IFN- γ -induced MHC class II expression in various cell types, including macrophages (36) (13, 14, 37). Our data obtained with DN PKC- α -overexpressing cells revealed a role for PKC- α in the regulation of MHC class II expression in IFN- γ -treated RAW 264.7 macrophages. Significantly, overexpression of DN PKC- α had no effect on IFN- γ -induced expression of several unrelated genes (iNOS, IRF-1, IP-10, ICSBP, MHC class I), supporting the notion that PKC- α selectively modulates IFN- γ -induced responses.

The inhibition of IFN- γ -induced CIITA mRNA accumulation observed in DN PKC- α -overexpressing cells indicated that PKC- α regulates MHC II expression at the level of CIITA expression. This role for PKC- α was further substantiated by the fact that expression of a CA PKC- α significantly increased IFN- γ -induced CIITA promoter IV activity in transient transfection assays. Dissection of the IFN- γ -induced signaling cascade leading to CIITA expression revealed that kinetics and extent of tyrosine phosphorylation of both STAT1 and JAK2 were similar in control RAW 264.7 cells and in DN PKC- α -overexpressing cells. Furthermore, nuclear translocation and DNA-binding activity of STAT1 took place normally in DN PKC- α -overexpressing cells. These data indicated that the inhibitory effect of DN PKC- α on IFN- γ -induced CIITA expression may be downstream of these early signaling events. This was expected since IFN- γ -induced expression of iNOS, MHC I, ICSBP, and IRF-1 was normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells. The observation that DN PKC- α had no effect on both the IFN- γ -induced IRF-1 expression and IRF-1 DNA binding activity raised the possibility that PKC- α modulates IRF-1 transactivating capacity. Indeed, expression of a CA PKC- α enhanced the ability of IRF-1, but not IRF-2, to transactivate CIITA promoter IV in both unstimulated and IFN- γ -treated RAW 264.7 cells, thereby strongly supporting this view. Although the underlying mechanism is presently unknown, there is growing evidence that phosphorylation is important for IRF-1 function (31, 38). The possibility

that PKC- α participates to posttranslational modifications of IRF-1 is supported by the finding that the IRF-1 protein complex is more basic in DN PKC- α -overexpressing cells than in control cells and by the observation of a direct interaction between PKC- α and IRF-1. Mutation analysis of serine and threonine residues potentially phosphorylated by PKC will be required to elucidate the mechanism by which PKC- α modulates IRF-1 activity.

Studies with cells from mice with a targeted disruption of the IRF-1 gene established that IRF-1 is essential for IFN- γ -induced expression of a number of genes including CIITA, iNOS, and MHC class I (7, 39-41). The observation that IFN- γ -induced expression of iNOS and MHC class I was normal in DN PKC- α -overexpressing cells suggests that PKC- α -mediated modulation of IRF-1 activity may not be required for the transactivation of all IRF-1-dependent promoters but rather that this requirement is limited to a subset of promoters. The expression of a given gene depends on the simultaneous interactions of a specific combination of regulatory proteins within the control DNA elements, leading to the assembly of nucleoprotein structures termed enhanceosomes (42, 43). It is possible that in the context of CIITA promoter IV, PKC- α -dependent posttranslational modification(s) of IRF-1 may be required for the stability of the enhanceosome or for the presentation of a specific activation surface. Whole genome expression analysis in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells may identify genes other than CIITA whose expression requires PKC- α -dependent modulation of IRF-1 transactivating activity.

The inhibition of IFN- γ -mediated induction of CIITA and MHC II expression by DN PKC- α indicates that PKC- α activation is an important event in IFN- γ -induced expression of these genes in RAW 264.7 macrophages. However, the mechanism by which PKC- α is activated in IFN- γ -treated macrophages remains to be established. PKC- α is activated by diacylglycerol which can be generated through different pathways, including the activation of phospholipase C. In the human epithelial cell line NCI-H292, IFN- γ -induced ICAM-1 expression involves a c-Src tyrosine kinase activation pathway in

which phospholipase C- γ 2 and PKC- α play an important role (44). Additional studies will be required to determine whether a similar pathway is involved in the activation of PKC- α in IFN- γ -treated macrophages.

The Jak-Stat signaling pathway plays a central role in IFN- γ -induced responses (5). Recent evidence indicate that members of the PKC family are required for proper function and fine tuning of this pathway. Hence, PKC- δ mediates serine phosphorylation of Stat1 to facilitate transcription of IFN- γ -stimulated genes (45), whereas PKC- ϵ is required for optimal Jak-mediated Stat1 tyrosine phosphorylation (46). This suggests that both PKC- δ and PKC- ϵ have a broad impact on IFN- γ responses. In contrast, PKC- α acts further downstream by modulating the transcriptional activity of IRF-1 in the context of CIITA promoter IV. In this respect, PKC- α appears to exert a narrower influence than PKC- δ and PKC- ϵ in the regulation of IFN- γ -induced responses. Collectively, these data support the view that PKC isoenzymes modulate specific signaling and transcriptional events in IFN- γ -stimulated cells.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. G. Baier for providing the constitutively active PKC- α expression vector and Dr. C. Quittau-Prévostel for providing the PKC- α -GFP expression vector. We thank M. Desrosiers for his technical expertise in confocal microscopy.

References

1. Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 14:301.
2. van den Elsen, P. J., S. J. Gobin, M. C. van Eggermond, and A. Peijnenburg. 1998. Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. *Immunogenetics* 48:208.
3. Boss, J. M. 1997. Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr Opin Immunol* 9:107.
4. Reith, W., and B. Mach. 2001. The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol* 19:331.
5. Bach, E. A., M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15:563.
6. Harada, H., T. Fujita, M. Miyamoto, Y. Kimura, M. Maruyama, A. Furia, T. Miyata, and T. Taniguchi. 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF- 2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58:729.
7. Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Berardino, L. A. Otten, and B. Mach. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8:157.
8. Harton, J. A., and J. P. Ting. 2000. Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol Cell Biol* 20:6185.
9. Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106.
10. Muhlethaler-Mottet, A., L. A. Otten, V. Steimle, and B. Mach. 1997. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *Embo J* 16:2851.

11. Pai, R. K., D. Askew, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2002. Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J Immunol* 169:1326.
12. O'Keefe, G. M., V. T. Nguyen, L. L. Ping Tang, and E. N. Benveniste. 2001. IFN-gamma regulation of class II transactivator promoter IV in macrophages and microglia: involvement of the suppressors of cytokine signaling-1 protein. *J Immunol* 166:2260.
13. Politis, A. D., and S. N. Vogel. 1990. Pharmacologic evidence for the requirement of protein kinase C in IFN- induced macrophage Fc gamma receptor and Ia antigen expression. *J Immunol* 145:3788.
14. Lee, Y. J., R. B. Panek, M. Huston, and E. N. Benveniste. 1995. Role of protein kinase C and tyrosine kinase activity in IFN-gamma- induced expression of the class II MHC gene. *Am J Physiol* 268:C127.
15. Fan, X. D., M. Goldberg, and B. R. Bloom. 1988. Interferon-gamma-induced transcriptional activation is mediated by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5122.
16. Smith, M. R., E. A. Ramsburg, H. F. Kung, and S. K. Durum. 1992. Components of the protein kinase C pathway induce Ia expression after injection into macrophages. *J Immunol* 149:1304.
17. St-Denis, A., F. Chano, P. Tremblay, Y. St-Pierre, and A. Descoteaux. 1998. Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 273:32787.
18. Giroux, M., and A. Descoteaux. 2000. Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C-alpha. *J Immunol* 165:3985.
19. Breton, A., and A. Descoteaux. 2000. Protein kinase C-alpha participates in Fc gamma R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 276:472.
20. Descoteaux, A., and G. Matlashewski. 1990. Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor. *J Immunol* 145:846.

21. Narumi, S., and T. A. Hamilton. 1991. Inducible expression of murine IP-10 mRNA varies with the state of macrophage inflammatory activity. *J Immunol* 146:3038.
22. Xie, Q. W., H. J. Cho, J. Calaycay, R. A. Mumford, K. M. Swiderek, T. D. Lee, A. Ding, T. Troso, and C. Nathan. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225.
23. Politis, A. D., J. Sivo, P. H. Driggers, K. Ozato, and S. N. Vogel. 1992. Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine peritoneal macrophages. Induction by IFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha, dexamethasone, and protein kinase inhibitors. *J Immunol* 148:801.
24. Landt, O., H. P. Grunert, and U. Hahn. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* 96:125.
25. Andrews, N. C., and D. V. Faller. 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19:2499.
26. Hussain, S., B. S. Zwillig, and W. P. Lafuse. 1999. Mycobacterium avium infection of mouse macrophages inhibits IFN-gamma Janus kinase-STAT signaling and gene induction by down-regulation of the IFN-gamma receptor. *J Immunol* 163:2041.
27. Koerner, T. J., T. A. Hamilton, and D. O. Adams. 1987. Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA. *J Immunol* 139:239.
28. Glimcher, L. H., and C. J. Kara. 1992. Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol* 10:13.
29. Waldburger, J. M., T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2001. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med* 194:393.
30. Koenig Merediz, S. A., M. Schmidt, G. J. Hoppe, J. Alfken, D. Meraro, B. Z. Levi, A. Neubauer, and B. Wittig. 2000. Cloning of an interferon regulatory factor 2 isoform with different regulatory ability. *Nucleic Acids Res* 28:4219.

31. Lin, R., and J. Hiscott. 1999. A role for casein kinase II phosphorylation in the regulation of IRF-1 transcriptional activity. *Mol Cell Biochem* 191:169.
32. Lin, R., A. Mustafa, H. Nguyen, D. Gewert, and J. Hiscott. 1994. Mutational analysis of interferon (IFN) regulatory factors 1 and 2. Effects on the induction of IFN-beta gene expression. *J Biol Chem* 269:17542.
33. Sharf, R., D. Meraro, A. Azriel, A. M. Thornton, K. Ozato, E. F. Petricoin, A. C. Lerner, F. Schaper, H. Hauser, and B. Z. Levi. 1997. Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J Biol Chem* 272:9785.
34. Masumi, A., and K. Ozato. 2001. Coactivator p300 acetylates the interferon regulatory factor-2 in U937 cells following phorbol ester treatment. *J Biol Chem* 276:20973.
35. Birnbaum, M. J., B. van Zundert, P. S. Vaughan, A. J. Whitmarsh, A. J. van Wijnen, R. J. Davis, G. S. Stein, and J. L. Stein. 1997. Phosphorylation of the oncogenic transcription factor interferon regulatory factor 2 (IRF2) in vitro and in vivo. *J Cell Biochem* 66:175.
36. Mattila, P., and R. Renkonen. 1991. Protein kinase C regulates MHC-class II expression on endothelial cells. *Scand J Immunol* 34:153.
37. Politis, A. D., J. Sivo, and S. N. Vogel. 1993. Multiple pathways of interferon-induced gene expression in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 53:583.
38. Momose, I., M. Terashima, Y. Nakashima, M. Sakamoto, H. Ishino, T. Nabika, Y. Hosokawa, and Y. Tanigawa. 2000. Phorbol ester synergistically increases interferon regulatory factor-1 and inducible nitric oxide synthase induction in interferon-gamma- treated RAW 264.7 cells. *Biochim Biophys Acta* 1498:19.
39. Jarosinski, K. W., and P. T. Massa. 2002. Interferon regulatory factor-1 is required for interferon-gamma-induced MHC class I genes in astrocytes. *J Neuroimmunol* 122:74.
40. Kamijo, R., H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S. I. Koh, T. Kimura, S. J. Green, and et al. 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263:1612.

41. Martin, E., C. Nathan, and Q. W. Xie. 1994. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 180:977.
42. Merika, M., and D. Thanos. 2001. Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev* 11:205.
43. Johnson, K. M., K. Mitsouras, and M. Carey. 2001. Eukaryotic transcription: the core of eukaryotic gene activation. *Curr Biol* 11:R510.
44. Chang, Y. J., M. J. Holtzman, and C. C. Chen. 2002. Interferon-gamma-induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway. *J Biol Chem* 277:7118.
45. Deb, D. K., A. Sassano, F. Lekmine, B. Majchrzak, A. Verma, S. Kambhampati, S. Uddin, A. Rahman, E. N. Fish, and L. C. Platanias. 2003. Activation of protein kinase Cdelta by IFN-gamma. *J Immunol* 171:267.
46. Ivaska, J., L. Bosca, and P. J. Parker. 2003. PKCepsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat Cell Biol* 5:363.

Footnotes

*This work was supported by grant MT-12933 from the Canadian Institutes of Health Research (to A.D), the 'Deutsche Jose-Carreras-Leukämienstiftung e.V. (to M.S.) and the 'Wilhelm Sander-Stiftung' (to M.S.). M.G. is the recipient of a studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). A.D. is chercheur-boursier of the FRSQ and the holder of a Canada Research Chair.

§ Address correspondence to Dr Albert Descoteaux, INRS- Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval QC, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010 ext 4465; Fax: (450) 686-5301; Email: albert.descoteaux@inrs-iaf.quebec.ca

Figure legends

Figure 1. Effect of DN PKC- α overexpression on IFN- γ -induced MHC-II mRNA accumulation. (A), Adherent RAW 264.7 cells were transfected with hPKC- α -GFP, incubated with 100 U/ml IFN- γ for 2 h and prepared for confocal microscopy as described in *Material and Methods*. hPKC- α -GFP is located in the cytoplasm of unstimulated cells and undergoes nuclear translocation following activation with 100 U/ml IFN- γ . Similar results were obtained in two separate experiments. (B), Adherent cells (vector alone, clone B1 and, clone C2) were incubated in the absence (*lanes 1, 4 and 7*) or in the presence of either 100 U/ml IFN- γ (*lanes 2, 5 and 8*) or a combination of 100 U/ml IFN- γ and 100 ng/ml LPS (*lanes 3, 6 and 9*) for 8 h. For priming experiments, cells were first incubated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h followed by additional stimulation with IFN- γ , or IFN- γ and LPS. Total RNA was extracted and Northern Blot analysis were performed as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

Figure 2. Effect of DN PKC- α overexpression on IFN- γ -induced activation of JAK-STAT pathway. Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. (A), Total cell extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-STAT1 and anti-JAK2 antibodies and then the levels of tyrosine phosphorylation were determined by Western Blot analysis with anti-phosphotyrosine (4G10) mAb as described in *Materials and Methods*. (B), Nuclear extracts were prepared and EMSA for STAT1 were performed as described in *Materials and Methods*. In *lane 13*, 100-fold excess cold probe was co-incubated with the reaction mixture containing nuclear extracts from control cells incubated with 100 U/ml IFN- γ for 15 min prior to EMSA. Similar results were obtained in three different experiments.

Figure 3. PKC- α modulates IFN- γ -induced CIITA transcriptional activity. (A), Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the presence of

100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR reactions with specific primers for *CIITA* and *HPRT*. (B), Adherent cells (vector alone and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR reactions with specific primers for type I and type IV *CIITA* and *HPRT*. (C), Adherent RAW 264.7 cells were transiently transfected with the luciferase reporter vectors containing the normal, the GAS-mutated and the ISRE-mutated type IV *CIITA* promoter region and the pRL-TK for 6 h along with either the control vector (pRcCMV), or the constitutively active (CA) PKC- α (A25E) expression vector. Cells were incubated for 18 h and then stimulated with 100 U/ml IFN- γ for 8h30. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments. *, $p \leq 0.05$ as compared with untreated or IFN- γ -treated cells transfected with control vector.

Figure 4. Expression and DNA binding activity of IRF-1/2 are normal in DN PKC- α overexpressing RAW 264.7 cells. (A), Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Cell extracts were prepared for Western Blot analyses as described in *Materials and Methods*. (B), Adherent cells (vector alone, clone A2, clone B1, and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for 1 h and 8 h. Nuclear extracts were prepared and EMSA for IRF-1 were performed as described in *Materials and Methods*. In lane 13, 100-fold excess cold probe was co-incubated with the reaction mixture containing nuclear extracts from control cells incubated with 100 U/ml IFN- γ for 1 h prior to EMSA. Similar results were obtained in three different experiments.

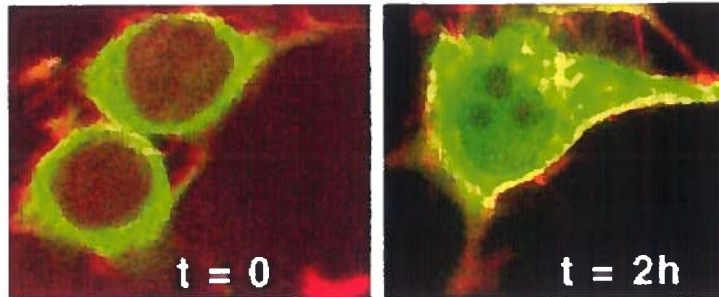
Figure 5. Overexpression of PKC- α increases IFN- γ -induced transactivation activity of IRF-1 but not IRF-2. Adherent RAW 264.7 cells were transiently transfected with the *CIITA* promoter-IV/Luc reporter construct and pRL-TK for 6 h along with either the control vector (pRcCMV), the constitutively active (CA)-PKC- α (A25E) expression

vector, and/or the IRF-1 or IRF-2 expression vector. Cells were incubated for 18 h and then stimulated with 100 U/ml IFN- γ for 8h30. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments. *, $p < 0.05$ as compared with untreated or IFN- γ -treated cells transfected with control vector. **, $p < 0.05$ as compared with untreated or IFN- γ -treated cells transfected with IRF-1 expression vector.

Figure 6. Role of PKC- α in the modulation of IFN- γ -induced IRF-1 posttranslational modifications. (A), Adherent cells (vector alone and clone C2) were incubated in ^{32}P -containing medium for 2 h before the addition of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Immunoprecipitation of IRF-1 was carried as described in *Materials and Methods*. (B), Adherent cells (vector alone and clone C2) were treated with 100 U/ml IFN- γ for 1 h. Total cell lysates were immunoprecipitated with anti-IRF-1 antibodies and 2-D gel electrophoresis was performed as described in *Materials and Methods*. IEF, Isoelectric focussing (C), 293T cells were transiently transfected with an IRF-1 expression vector, together with either pRcCMV or a CA PKC- α expression vector for 8 h, followed by an incubation in [^{35}S]methionine-containing medium for 16 h. Total cell extracts were prepared as described in *Materials and Methods* and subjected to immunoprecipitation with anti-IRF-1 (*lanes 1 and 5*) and anti-PKC- α (*lanes 4 and 8*) antibodies. The IRF-1 immunoprecipitate was denatured as described in *Materials and Methods*. After dilution with lysis buffer, aliquots were subjected to re-precipitation with antibodies to IRF-1 (*lanes 2 and 6*) and PKC- α (*lanes 3 and 7*). Proteins were resolved on a 7.5% SDS-PAGE, the gel dried and exposed on a phosphor screen which was scanned on a PhosphoImager. The presence PKC- α in lane 7 indicates that it was co-precipitated with IRF-1. The amount of IRF-1 immunoprecipitate loaded in lanes 1 and 5 is represents 1/10 of the total sample. Data shown are representative of three independent experiments.

Figure 1. Effect of DN PKC- α overexpression on IFN- γ -induced MHC II mRNA accumulation

A



B

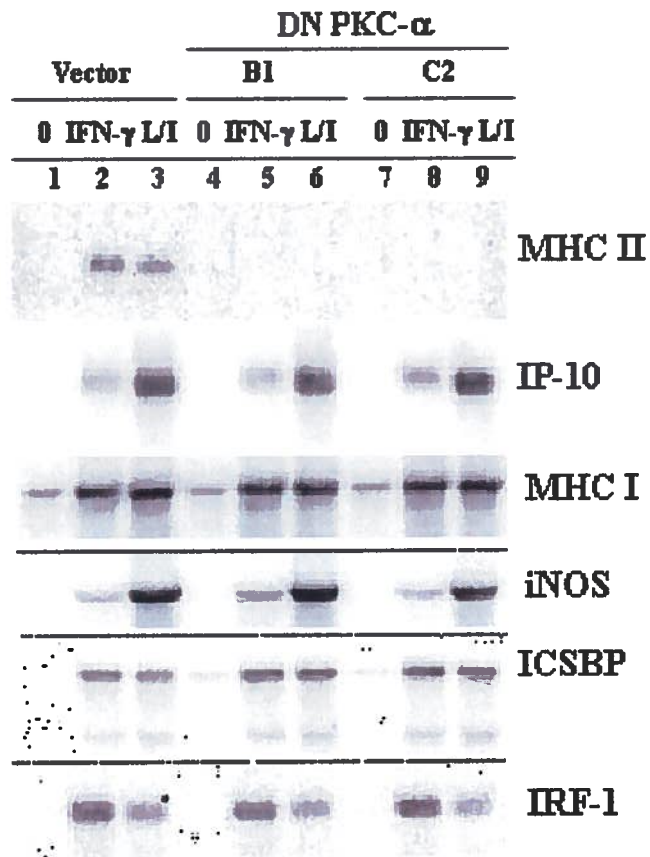
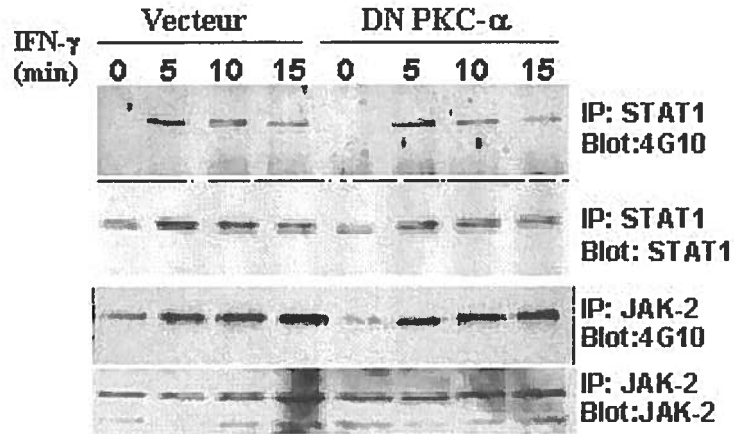


Figure 2. Effect of DNPKC- α -overexpression on IFN- γ -induced activation of the JAK-STAT pathway

A



B

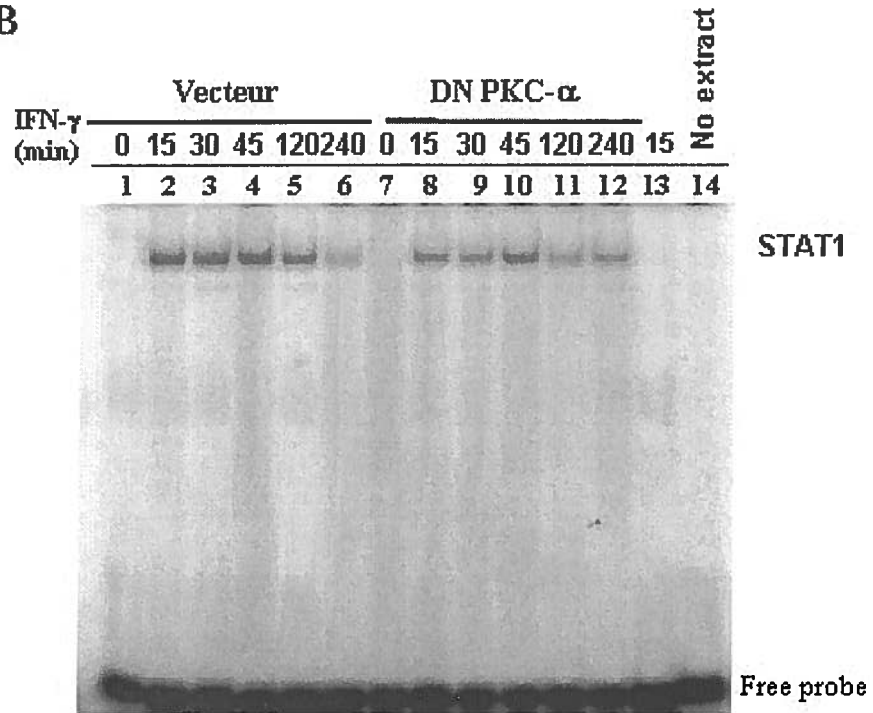


Figure 3. PKC- α modulates IFN- γ -induced CIITA transcriptional activity

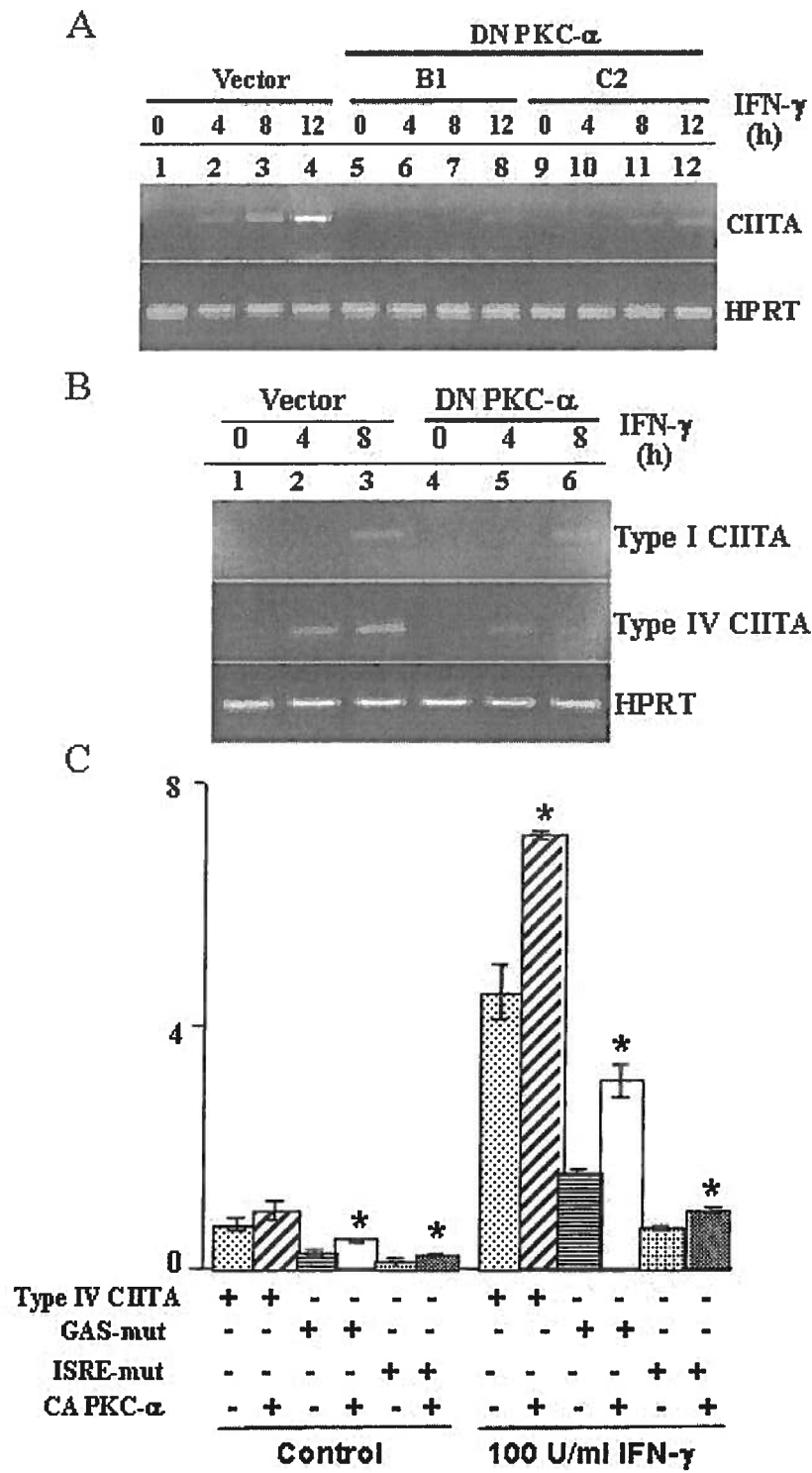


Figure 4. Expression and DNA binding activity of IRF-1/2 are normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells.

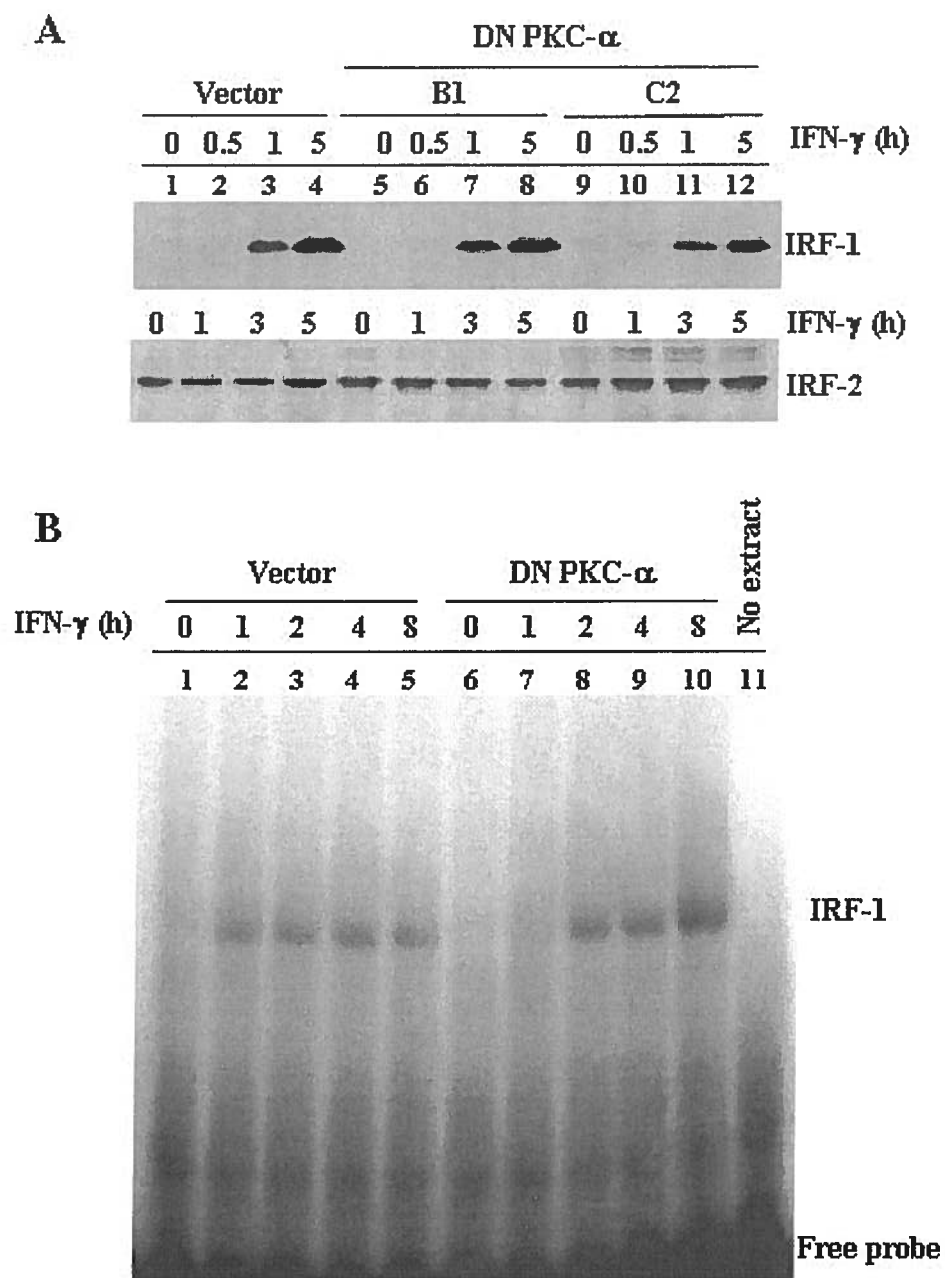


Figure 5. Overexpression of PKC- α increases IFN- γ -induced transactivation activity of IRF-1 but not IRF-2

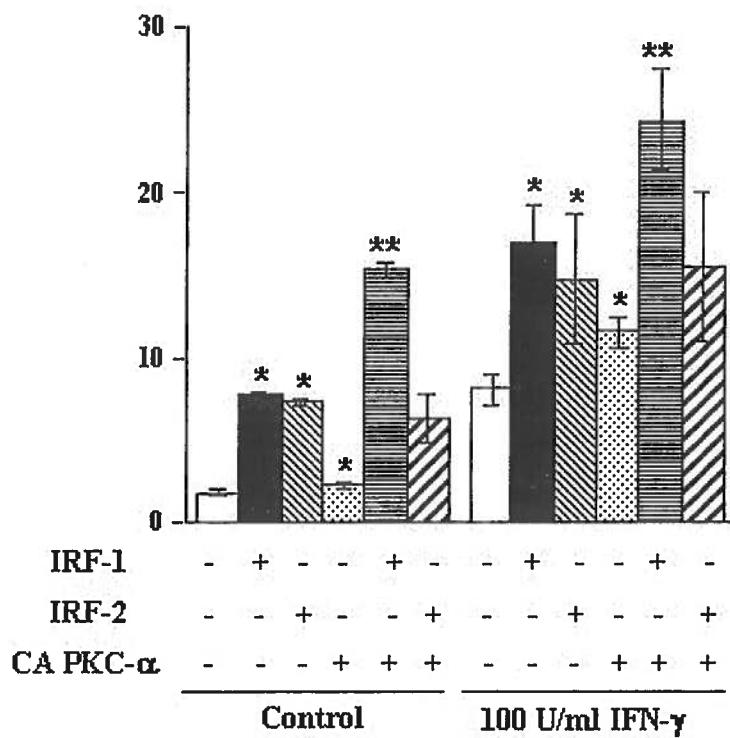
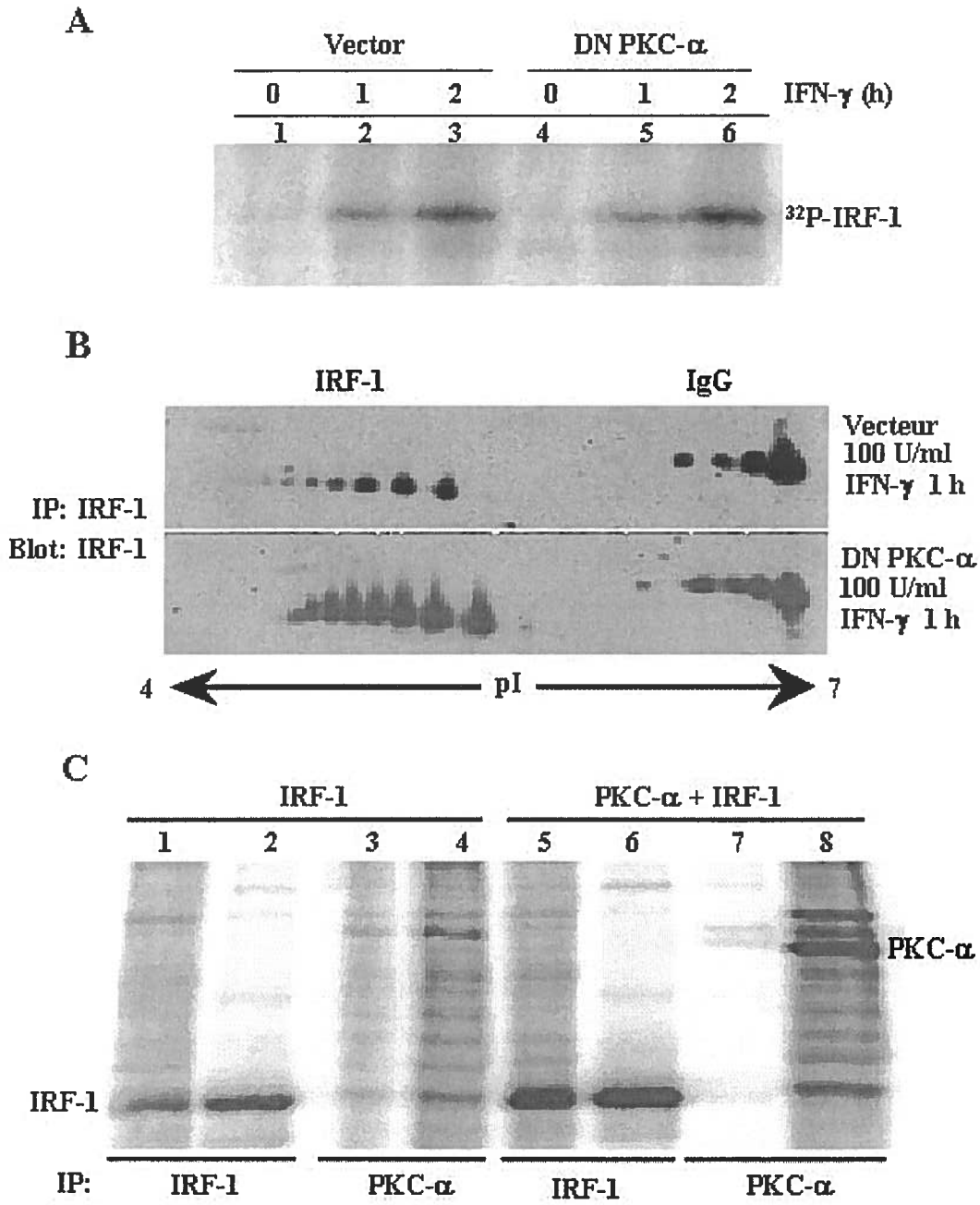


Figure 6. Role of PKC- α in the modulation of IFN- γ -induced IRF-1 posttranslational modifications



Résumé de la troisième publication

«The inhibition of IFN- γ -induced Class II transactivator expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages correlates with the inhibition of protein kinase C- α nuclear translocation, *Manuscript* »

Des études antérieures ont démontré que le parasite intracellulaire *Leishmania donovani* inhibe l'expression du CMH de classe II induite par l'IFN- γ mais le mécanisme menant à cette inhibition reste encore mal connu. La série d'expériences présentée ici avait pour but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels *L. donovani* altère l'expression du CMH II. Tel qu'observé dans d'autres études, l'accumulation d'ARNm du CMH II est diminuée chez les macrophages murins infectés avec la forme amastigote de *L. donovani*. L'expression induite par l'IFN- γ de CIITA est également inhibée suite à l'infection. Par contre, cette inhibition n'est pas associée à une déficience ni de l'activation de la voie des JAK-STAT, ni de l'expression d'IRF-1. Récemment, nous avons constaté que PKC- α transloque au noyau en réponse à l'IFN- γ et que l'activation de PKC- α est un évènement important dans la modulation de l'expression de CIITA induite par l'IFN- γ . Cette observation nous a subséquemment conduit à démontrer une forte inhibition de la translocation nucléaire de PKC- α chez les macrophages infectés par *L. donovani*. L'ensemble des données obtenues suggère que *L. donovani* pourrait interférer avec l'activation de PKC- α pour moduler l'activité transcriptionnelle de CIITA induite par l'IFN- γ menant ainsi à l'inhibition spécifique de l'expression du CMH II.

**The inhibition of IFN- γ -induced Class II transactivator expression in
Leishmania donovani-infected macrophages correlates with the
inhibition of protein kinase C- α nuclear translocation.**

Mélanie Giroux and Albert Descoteaux

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

Running title: Leishmania amastigotes and IFN- γ -induced MHC class II expression

Address correspondence to:

Albert Descoteaux

INRS- Institut Armand-Frappier

Université du Québec

531 boul. des Prairies

Laval, QC

Canada H7V 1B7

Tel: 450-687-5010 ext 4465

Fax: 450-686-5301

Email: albert.descoteaux@inrs-iaf.quebec.ca

Keywords: Macrophages; MHC; Antigen presentation; *Leishmania donovani*; Gene Regulation

Abstract

The mechanism by which the intracellular protozoan parasite *Leishmania donovani* inhibits IFN- γ -induced MHC-II expression in macrophages remains poorly understood. In the present study, we performed a series of experiments to provide a better understanding of the molecular mechanisms by which *Leishmania donovani* alters IFN- γ -induced MHC-II expression. Similarly to previous studies, we observed that the accumulation of IFN- γ -induced MHC-II mRNA was reduced in *L. donovani* amastigotes-infected murine macrophages. It appears that IFN- γ -induced expression of MHC class II transactivator (CIITA), a transcriptional coactivator essential for MHC-II expression, was decreased subsequently to the infection. However, this inhibition is not due to an attenuation of IFN- γ -induced activation of JAK-STAT pathway or IRF-1 expression. We have recently demonstrated that PKC- α translocates to the nucleus in response to IFN- γ and that PKC- α activation is an important event in IFN- γ -induced CIITA expression. In the present study, we observed a strong inhibition of IFN- γ -induced PKC- α nuclear translocation in *L. donovani*-infected macrophages. Based on these observations we suggest that *L. donovani* possibly targets PKC- α activation to modulate IFN- γ -induced CIITA transcriptional activity leading to a specific inhibition of MHC-II expression.

Introduction

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* are responsible for a wide spectrum of diseases termed leishmaniasis, which afflict millions of people world-wide. During their life-cycle, these pathogens alternate between the flagellated promastigote form, which lives extracellularly in the midgut of the sandfly vector, and a non-motile amastigote form, which replicates in the phagolysosomal compartment of mammalian host macrophages (1). The establishment of a protective anti-*Leishmania* immune response requires the presentation of appropriate antigens by APCs, the induction and expansion of CD4⁺ Th1-lymphocytes, and the activation of macrophages for efficient killing of the parasites (2).

To promote their intracellular survival within the host, *Leishmania* parasites have developed several strategies (3-6). One such strategy consists in evading recognition by T-lymphocytes possibly by interfering with antigen-presentation by host cells. For example, infection of murine macrophages with *L. amazonensis* amastigotes and *L. major* impairs intracellular loading of MHC-II molecules with antigenic peptides (7, 8). It has also been reported that amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana* may contribute to the inhibition of Ag presentation by the endocytosis and the degradation of MHC-II and H-2M molecules (9). In the case of *L. donovani*, infection significantly reduced IFN- γ -induced MHC-II expression by macrophages and it has been suggested that this inhibition is mediated at the level of MHC-II mRNA induction (10, 11). However, the actual mechanism leading to this inhibition remains unclear.

MHC class II transactivator (CIITA), a non-DNA binding transcriptional coactivator, is the major regulator for both constitutive and IFN- γ -inducible MHC-II expression. Thus, CIITA plays a fundamental role in the regulation of immune response (12, 13). Therefore, as shown in many studies (14-17), CIITA and its inducible pathway are a major prey for infectious agents to generate a specific down-regulation of MHC-II expression (17). Regulation of IFN- γ -induced CIITA expression occurs primarily at the transcriptional level and the key players involved in its signalling cascade have been

previously identified (18). In this regard, we have recently published data suggesting a novel regulatory mechanism for IFN- γ -induced MHC-II expression, whereby PKC- α regulates CIITA gene transcription by modulating the transactivating activity of IRF-1 (19).

Based on our recent observations (19), we proposed to explore the possibility that *L. donovani* amastigotes may interfere with the IFN- γ -induced CIITA transcription pathway to alter the expression of MHC-II gene. Thus, we obtained evidence that *L. donovani* has a significant effect on IFN- γ -induced CIITA gene transcription and interestingly, on PKC- α intracellular localization. These data suggest that PKC- α represents a logical target for *L. donovani* to directly interfere with IFN- γ -induced CIITA and MHC-II expression and thereby provide further knowledge on the strategy evolved by *Leishmania donovani* to prevent the development of a protective adaptative immune response.

Materials and Methods

Macrophages. The murine macrophage cell line RAW 264.7 was cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in DMEM with glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada), containing 10% heat-inactivated FBS (HyClone, Logan, UT), 10 mM Hepes pH 7.3, antibiotics. Bone marrow-derived macrophages (BMM) were obtained as described previously (20). Briefly, bone marrow cells obtained from femurs of 6- to 8-wk-old female BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec) were freed of RBC by osmotic shock and resuspended in complete medium with 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium. After 1 day in culture (37°C, 5% CO₂), nonadherent cells were transferred into new culture dishes and then allowed to differentiate and adhere for 6 days. BMM were made quiescent by culturing them in CSF-1-free medium for 18h before being used.

Parasites. Amastigotes of the 1S2D strain of *Leishmania donovani* were isolated from the spleens of female Golden Syrian hamsters (Charles River, St-Constant, Québec) infected 6 to 8 weeks earlier with 10⁸ amastigotes by intra-abdominal injection. Briefly, spleens were homogenized, centrifuged 10 min at 800 RPM (3 times) and then the supernatant was centrifuged 10 min at 2800 RPM. Amastigotes found in the pellet were freed of RBC by osmotic shock and resuspended in complete medium. For infections, cells were incubated at 37°C for 18 h with *L. donovani* amastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 15:1. Infection levels were assessed by microscopic examination of Diff-Quick-stained cover slips placed in some wells.

Western blot analyses. Western blot analyses were performed as described previously (21). Rabbit polyclonal antisera against IRF-1 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, #SC-640X). Tyrosine phosphorylation on total cell extracts was analyzed using the mouse anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (4G10: Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

Immunoprecipitations and immunoblotting. Adherent RAW 264.7 cells (8×10^6 /100-mm tissue culture dish) were infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18 h, washed twice with serum-free DMEM and then stimulated with 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Cells were washed once with PBS, homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitors, and protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Immunoprecipitations and immunoblottings were performed as described previously (22). Anti-STAT1 or anti-JAK2 antibodies were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Tyrosine phosphorylation was analyzed using the mouse anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (4G10) (Upstate.

RT-PCR reactions. Total RNA was prepared as described previously (21, 23). The relative quantities of mRNA for CIITA, MHC class II (H-2 IA- α ; *d* haplotype), MHC class I, IRF-1 and hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), were determined by RT-PCR. For cDNA synthesis, 3 μ g of total RNA, 1 μ l of oligo-d(T) primer (Amersham Pharmacia Biotech), and RNase-free water were added to a sterile microcentrifuge tube to obtain a total volume of 14 μ l. This reaction mixture was heated at 70 C for 10 min, placed on ice for 1 min and the following components were added: 2 μ l 10X synthesis buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 1 μ g/ μ l BSA), 1 μ l 10 mM dNTP mix (Amersham Pharmacia Biotech), 2 μ l 0.1 M DTT, and 1 μ l of AMV reverse transcriptase (Amersham Pharmacia Biotech, 20 U/ μ l). Samples were then incubated at room temperature for 10 min, 42 C for 50 min, and 70 C for 15 min. For PCR reactions, samples were amplified under the following conditions: 30 sec at 94 C, 1 min at 55 C, and 1 min at 72 C (30 cycles). After the PCR amplification reaction, 20 μ l of PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1.3% agarose gel.

The primer pairs used for the amplification of each genes are the following:

<i>CIITA</i> (472-bp)	AD-157 (forward) 5'-CAAGTCCCTGAAGGATGTGGA-3' AD-158 (reverse) 5'-ACGTCCATCACCCGGAGGGAC-3'
type IV <i>CIITA</i> (340-bp)	AD-267 (forward) 5'-ACAGCCACAGCCGCGACCATA-3' AD-268 (reverse) 5'-CTCTGCTCCAATGTGCTCCTA-3'
MHC class I (H2-K <i>d</i>) (518-bp)	AD-92 (forward) 5'-GGAATTTCGATTACATCGCCCTGAACG-3' AD-93 (reverse) 5'-GGAATTCAATTCAAGGACAACCAGAACAGCAATG-3'
MHC class II (IA- α ; haplotype <i>d</i>) (591-bp)	AD-70 (forward) 5'-GGAATTCTGGGAATCTCAGGTTCCCAGTG-3' AD-71 (reverse) 5'-GGAATTCTGAACACCATGCTCAGCCTCTG-3'
IRF-1 (207-bp)	AD-134 (forward) 5'-CAGAGGAAAGAGAGAAAGTCC-3' AD-135 (reverse) 5'-CACACGGTGACAGTGCTGG-3'
HPRT (164-bp)	AD-55 (forward) 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' AD-56 (reverse) 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3'

Translocation of PKC- α . Adherent RAW 264.7 cells were transfected using Gene Porter (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) with 0.6 μ g of the hPKC- α -GFP construct (provided by C. Quittau-Prévostel, INSERM, France). Cells were seeded (1×10^5 /well) in 24-well plates containing microscope coverslips (Fisher Scientific) for 6 h, transfected with 250 μ l DNA/Gene Porter mix for 5 h, and further incubated in medium for 18 h. Cells were then infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 15:1 for 10 h, washed 2 times with cold DMEM and then, stimulated for 2 h with 100 U/ml IFN- γ , fixed with 2% formaldehyde, incubated with 5 μ M DRAQ5 (BioStatus Ltd., UK) 5 min at room temperature, permeabilized with ice-cold PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% BSA for 10 min at room temperature and then, incubated with Alexa Fluor 568 phalloidin (Molecular Probes, Oregon, USA). Coverslips were washed six times with PBS and mounted with Fluoromount-G

(Interscience, Markham, Ontario). Analyses were performed using a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) installed on an Eclipse E800 microscope. Phalloidin fluorescence and translocation of PKC- α -GFP were analyzed using an argon/krypton laser respectively at 568 nm and 488 nm both with a Plan Apo Nikon 60x (NA 1.4) oil immersion lens. DRAQ5 fluorescence was analyzed using a 638 nm diode laser at 650 nm long-pass with a Plan Apo Nikon 60x (NA 1.4) oil immersion lens. At least 35-40 cells from each of two independent experiments were examined under each experimental conditions. Images were acquired in the normal scanning mode with a Kalman filter of 10 using the LaserSharp software.

Results

Selective inhibition of IFN- γ -induced gene expression in Leishmania donovani amastigotes-infected macrophages.

Previous studies revealed that IFN- γ -induced MHC-II gene expression is impaired in *L. donovani*-infected macrophages (10, 11). To further investigate the impact of *L. donovani* on IFN- γ -induced responses, we compared the expression of MHC II, CIITA, MHC I and IRF-1 in uninfected and *L. donovani*-infected mouse bone marrow-derived macrophages (BMM) as well as in the mouse macrophage cell line RAW 264.7. IFN- γ -induced MHC-II mRNA levels increase over time in uninfected cells (Fig. 1A, lanes 1-3) but consistent with previous reports (10, 11) are significantly reduced in *L. donovani* amastigotes-infected cells (Fig. 1A, lanes 4-6). CIITA plays an essential role in both inducible and constitutive expression of MHC-II (13, 24). Following the addition of IFN- γ , total CIITA mRNA levels increase over time in uninfected macrophages (Fig. 1A, lanes 1-3). Similar to MHC-II expression, infection with *L. donovani* amastigotes significantly inhibited total CIITA mRNA levels induced by IFN- γ (Fig. 1A, lanes 4-6), suggesting that *L. donovani* impairs IFN- γ -induced MHC II gene expression by interfering with CIITA expression. In macrophages, promoter IV is one of the main promoter responsible for the CIITA expression induced by IFN- γ (25-27). IFN- γ -induced CIITA type IV expression was inhibited in *L. donovani* amastigotes-infected macrophages (Fig. 1A, lanes 4-6) indicating that *L. donovani* modulates IFN- γ -induced CIITA expression at the level of promoter IV. In contrast to MHC II and CIITA, IFN- γ -induced expression of both MHC I and IRF-1 genes was normal in *L. donovani* amastigotes-infected macrophages (Fig. 1B, lanes 1-3 vs 4-6), indicating that *L. donovani* amastigotes selectively inhibit IFN- γ -induced responses. Consistent with IRF-1 mRNA, IFN- γ -induced IRF-1 protein levels were similar in uninfected and amastigotes-infected macrophages (Fig. 2, lanes 2 and 4).

Integrity of the JAK-STAT pathway is not affected by Leishmania donovani amastigotes

IFN- γ modulates gene expression through activation of the JAK-STAT pathway and protein tyrosine phosphorylation (28, 29). It has been reported that *L. donovani* infection induces a general tyrosine dephosphorylation in infected macrophages, which impairs proper function of the JAK-STAT signaling pathway (30). Since IFN- γ -induced MHC I and IRF-1 expression were normal in *L. donovani* amastigotes-infected macrophages (Fig. 1B), we investigated whether IFN- γ -induced general protein tyrosine phosphorylation and STAT1 and JAK2 tyrosine phosphorylation levels were affected in our experimental system. In contrast to previous studies (30, 31), we observed similar levels of STAT1 and JAK2 tyrosine phosphorylation following IFN- γ stimulation in uninfected and *L. donovani* amastigotes-infected macrophages (Fig. 3A). Moreover, protein tyrosine phosphorylation patterns were similar in uninfected and *L. donovani* amastigotes-infected macrophages (Fig. 3B). These observations suggested that *L. donovani* amastigotes inhibit CIITA expression by a mechanism occurring downstream of STAT1 activation.

Effect of L. donovani infection on nuclear translocation of PKC- α

We recently showed that PKC- α translocates to the nucleus in response to IFN- γ and that PKC- α regulates IFN- γ -induced CIITA expression through the modulation of IRF-1 transactivating activity (19). We determined whether *L. donovani* infection alters IFN- γ -induced intracellular localization of PKC- α , in RAW 264.7 macrophages transiently transfected with a PKC- α -GFP expression vector. IFN- γ induced the nuclear translocation of PKC- α -GFP in uninfected RAW 264.7 cells (Fig 4A). However, IFN- γ -induced nuclear translocation of PKC- α was strongly inhibited in *L. donovani* amastigotes-infected macrophages (Fig. 4B). As demonstrated in Figure 4C, % of nuclear translocation which is expressed as a ratio of nuclear PKC- α -GFP positive cells / total cells is significantly reduced in *L. donovani* amastigotes-infected macrophages (Fig.4C, *Uninfected 0*: 10.7%, *Uninfected 2h*: 58.1%, *Infected 0*: 0%, *Infected 2h*: 3.7%).

Discussion

Failure to establish an appropriate adaptive immune response may contribute to ensure the survival and replication of the *Leishmania* parasites within the mammalian host (2). Therefore, previous studies suggest that intracellular *Leishmania* parasites could possibly avoid the stimulation of CD4⁺ T lymphocytes by interfering with antigen-presentation by the host cells (7-9, 32, 33). As reported previously (11), our data demonstrate that *L. donovani* inhibits IFN- γ -induced MHC class II gene expression. To better understand the underlying mechanism responsible of this inhibition, we have investigated the effect of *L. donovani* amastigotes on IFN- γ -induced CIITA expression and on its signalling pathway. The major finding reported within clearly indicates that *L. donovani* amastigotes inhibit IFN- γ -induced MHC class II expression at the transcriptional level by being involved in IFN- γ -induced CIITA gene expression. Our results suggest also that the modulation of IFN- γ -induced CIITA expression by *L. donovani* amastigotes possibly occurs through a PKC- α -dependent mechanism.

CIITA, as the major physiological controller of the coordinated expression of MHC-II genes, plays a crucial role in the regulation of adaptive immune responses (12, 13). Accumulating evidence indicates that inhibition of CIITA expression and/or function by various microorganisms appears to be a very clever way leading to a specific impairment of MHC class II gene expression (reviewed in (17)). Consistently, we observed that *L. donovani* amastigotes significantly reduced IFN- γ -induced CIITA type IV mRNA accumulation providing evidence that *L. donovani* regulates MHC-II expression at the level of CIITA gene transcription. Different studies implicated STAT1 in the control of CIITA expression (34, 35) and recently its mode of action on IFN- γ -induced CIITA gene transcription has also been addressed (24). It has been previously demonstrated that *L. donovani* amastigotes attenuate IFN- γ -induced Jak-Stat tyrosine phosphorylation in human monocytes (31). Furthermore, infection with *L. donovani* promastigotes in a murine macrophage cell line is associated with JAK2 tyrosine dephosphorylation (30).

These observations raised the possibility that *L. donovani* directly targets the activation of the Jak-Stat pathway to inhibit IFN- γ -induced CIITA transcription. In this regard, down-regulation of CIITA expression in *T. gondii*-infected murine macrophages occurs via interference with nuclear translocation of STAT1 (36). However, in contrast with these previous findings, our results revealed that kinetics and extent of IFN- γ -induced tyrosine phosphorylation of both STAT1 and JAK2 were similar in uninfected as well as in *L. donovani* amastigotes-infected murine macrophages. These data indicated that the selective inhibition of IFN- γ -induced CIITA expression by *L. donovani* amastigotes may be mediated by a pathway occurring downstream of these early signalling events. This was expected because *L. donovani* infection is not associated with a general suppression of IFN- γ -induced responses as we observed that IFN- γ -induced expression of MHC-I and IRF-1 as well as IFN- γ -induced global tyrosine phosphorylation of proteins were normal in amastigotes-infected macrophages.

Recently, we proposed a novel regulatory mechanism for IFN- γ -induced MHC-II expression, whereby PKC- α regulates CIITA expression by selectively modulating the transcriptional activity of IRF-1 (19). This was supported by the fact that the constitutively active PKC- α expression vector enhanced the ability of IRF-1 to transactivate CIITA promoter IV activity and by the observation of a direct interaction between IRF-1 and PKC- α (19). We observed that *L. donovani* amastigotes have no significant effect on both IFN- γ -induced IRF-1 gene and protein expression in murine macrophages. But interestingly, IFN- γ -induced PKC- α nuclear translocation was strongly inhibited in *L. donovani* amastigotes-infected macrophages, indicating that apparently *Leishmania* parasites affect the activation of PKC- α . In this regard, a considerable number of studies have reported that *Leishmania* impairs PKC-dependent processes (20, 37, 38) by synthesizing glycolipids endowed with potent inhibitory activity toward PKC (39-43). Collectively, these findings led us to suggest that *L. donovani* interferes with PKC- α activity to inhibit CIITA gene transcription leading to a specific down-modulation of MHC II expression. Additional studies of the effect of *L. donovani* amastigotes on the interaction between PKC- α and IRF-1 and on the modulation of IFN-

γ -induced IRF-1-transactivating capacity would be quite interesting to further understand the strategy of *L. donovani* to inhibit MHC II gene expression.

Host immunity to *Leishmania* protozoan parasites is dependent mainly on the activation of CD4⁺ Th1-lymphocytes which requires appropriate presentation of *Leishmania* antigens in the context of MHC class II (2). The efficiency of T cell activation is stringently and quantitatively dependent upon the density of surface MHC class II molecules on APCs (44, 45). In this regard, the observation that IFN- γ -induced MHC-II mRNA in *L. donovani* amastigotes-infected murine macrophages was down-modulated deserves further investigation to determine its biological consequence on MHC-II protein expression as well as on Ag presentation process. Nevertheless, our data support the notion that *L. donovani* promote their persistence within the host by compromising the antigen presentation process through interference with IFN- γ -induced signalling pathway leading to MHC-II expression. Future studies may reveal whether PKC is targeted by other pathogens to down-regulate IFN- γ -induced CIITA and MHC-II gene transcription.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. C. Quittau-Prévostel for providing the PKC- α -GFP expression vector. We thank M. Desrosiers for his technical expertise in confocal microscopy.

References

1. Alexander, J., and D. G. Russell. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol* 31:175.
2. Solbach, W., and T. Laskay. 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Adv Immunol* 74:275.
3. Bogdan, C., A. Gessner, W. Solbach, and M. Rollinghoff. 1996. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 8:517.
4. Bogdan, C., and M. Rollinghoff. 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today* 15:22.
5. Buates, S., and G. Matlashewski. 2001. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* 166:3416.
6. Prive, C., and A. Descoteaux. 2000. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol* 30:2235.
7. 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* 151:2050.
8. Fruth, U., N. Solioz, and J. A. Louis. 1993. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol* 150:1857.
9. 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.
10. Reiner, N. E., W. Ng, and W. R. McMaster. 1987. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* 138:1926.

11. Reiner, N. E., W. Ng, T. Ma, and W. R. McMaster. 1988. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in Leishmania-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4330.
12. Harton, J. A., and J. P. Ting. 2000. Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol Cell Biol* 20:6185.
13. Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106.
14. De Lerma Barbaro, A., G. Tosi, M. T. Valle, A. M. Megiovanni, S. Sartoris, A. D'Agostino, O. Soro, M. C. Mingari, G. W. Canonica, F. Manca, and R. S. Accolla. 1999. Distinct regulation of HLA class II and class I cell surface expression in the THP-1 macrophage cell line after bacterial phagocytosis. *Eur J Immunol* 29:499.
15. Wojciechowski, W., J. DeSanctis, E. Skamene, and D. Radzioch. 1999. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene. *J Immunol* 163:2688.
16. Zhong, G., T. Fan, and L. Liu. 1999. Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J Exp Med* 189:1931.
17. Accolla, R. S., A. De Lerma Barbaro, S. Mazza, C. Casoli, A. De Maria, and G. Tosi. 2001. The MHC class II transactivator: prey and hunter in infectious diseases. *Trends Immunol* 22:560.
18. O'Keefe, G. M., V. T. Nguyen, L. L. Ping Tang, and E. N. Benveniste. 2001. IFN-gamma regulation of class II transactivator promoter IV in macrophages and microglia: involvement of the suppressors of cytokine signaling-1 protein. *J Immunol* 166:2260.
19. Giroux, M., M. Schmidt, and A. Descoteaux. 2003. IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha. *J Immunol* 171:4187.

20. Descoteaux, A., and G. Matlashewski. 1989. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol Cell Biol* 9:5223.
21. St-Denis, A., F. Chano, P. Tremblay, Y. St-Pierre, and A. Descoteaux. 1998. Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 273:32787.
22. Breton, A., and A. Descoteaux. 2000. Protein kinase C-alpha participates in FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 276:472.
23. Descoteaux, A., and G. Matlashewski. 1990. Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor. *J Immunol* 145:846.
24. Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Berardino, L. A. Otten, and B. Mach. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8:157.
25. Muhlethaler-Mottet, A., L. A. Otten, V. Steimle, and B. Mach. 1997. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *Embo J* 16:2851.
26. Pai, R. K., D. Askew, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2002. Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J Immunol* 169:1326.
27. Waldburger, J. M., T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2001. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med* 194:393.
28. Bach, E. A., M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15:563.
29. Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227.
30. Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K. A. Siminovitch, and M. Olivier. 1999. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine

- phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol* 29:3737.
31. Nandan, D., and N. E. Reiner. 1995. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect Immun* 63:4495.
 32. Prina, E., T. Lang, N. Glaichenhaus, and J. C. Antoine. 1996. Presentation of the protective parasite antigen LACK by *Leishmania*-infected macrophages. *J Immunol* 156:4318.
 33. Kima, P. E., L. Soong, C. Chicharro, N. H. Ruddle, and D. McMahon-Pratt. 1996. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 26:3163.
 34. Meraz, M. A., J. M. White, K. C. Sheehan, E. A. Bach, S. J. Rodig, A. S. Dighe, D. H. Kaplan, J. K. Riley, A. C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R. N. DuBois, R. Clark, M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84:431.
 35. Lee, Y. J., and E. N. Benveniste. 1996. Stat1 alpha expression is involved in IFN-gamma induction of the class II transactivator and class II MHC genes. *J Immunol* 157:1559.
 36. Luder, C. G., W. Walter, B. Beuerle, M. J. Maeurer, and U. Gross. 2001. *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. *Eur J Immunol* 31:1475.
 37. Buchmuller-Rouiller, Y., and J. Mael. 1987. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect Immun* 55:587.
 38. Olivier, M., R. W. Brownsey, and N. E. Reiner. 1992. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7481.

39. McNeely, T. B., G. Rosen, M. V. Londner, and S. J. Turco. 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem J* 259:601.
40. Descoteaux, A., G. Matlashewski, and S. J. Turco. 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 149:3008.
41. Descoteaux, a. a. S. J. T. 1993. The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol Today* 9:468.
42. McNeely, T. B., and S. J. Turco. 1987. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 148:653.
43. Turco, S. J., and A. Descoteaux. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 46:65.
44. Unanue, E. R., and P. M. Allen. 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236:551.
45. Pieters, J. 2000. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv Immunol* 75:159.

Footnotes

*This work was supported by grant MT-12933 from the Canadian Institutes of Health Research (to A.D). M.G. is the recipient of a studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). A.D. is chercheur-boursier of the FRSQ and the holder of a Canada Research Chair.

§ Address correspondence to Dr Albert Descoteaux, INRS- Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval QC, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010 ext 4465; Fax: (450) 686-5301; Email: albert.descoteaux@inrs-iaf.quebec.ca

Figure Legends

Figure 1. Selective inhibition of IFN- γ -induced gene expression in *Leishmania donovani* amastigotes-infected macrophages. Adherent cells (RAW 264.7 or BMM) were infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18 h and then stimulated with 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR with specific primers (see *Materials and Methods*) for (A), *MHC II*, *CIITA* and *HPRT* and (B), *MHC I*, *IRF-1* and *HPRT*.

Figure 2. IFN- γ -induced IRF-1 protein expression is normal in cells infected with *Leishmania donovani* amastigotes. Adherent cells (RAW 264.7 and BMM) were infected 18 h with freshly isolated *L. donovani* amastigotes and then incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for 4 h. Cell extracts were prepared for Western Blot analyses as described in *Materials and Methods*.

Figure 3. Effect of *Leishmania donovani* amastigotes on IFN- γ -induced activation of JAK-STAT pathway. Adherent cells (RAW 264.7 and BMM) were infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18 h and then stimulated with 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. A, Total cells extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-STAT1 and anti-JAK2 Abs, and then the levels of tyrosine phosphorylation were determined with anti-phosphotyrosine (4G10) mAb as described in *Materials and Methods*. B, Levels of tyrosine phosphorylation on total cell extracts were determined by Western Blot analyses using an anti-phosphotyrosine (4G10) mAb as described in *Materials and Methods*.

Figure 4. Effect of *Leishmania donovani* amastigotes on PKC- α nuclear translocation induced by IFN- γ . Adherent RAW 264.7 cells were transfected with hPKC- α -GFP, infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 10 h, stimulated with 100 U/ml

IFN- γ for 2 h and prepared for confocal microscopy as described in *Materials and Methods*. (A), In uninfected/unstimulated cells, hPKC- α -GFP is located in the cytoplasm and undergoes nuclear translocation following activation with 100 U/ml IFN- γ . (B), Nuclear translocation is not observed in infected cells following stimulation with IFN- γ . *L. donovani* amastigotes were detected by a coloration with DRAQ5 as described in *Materials and Methods*. Amastigotes contained in phagosomes are indicated by arrows. In the histogram, % of nuclear translocation is expressed as a ratio of nuclear PKC- α -GFP positive cells / total cells. Similar results were obtained in two separate experiments.

Figure 1. Selective inhibition of IFN- γ -induced gene expression in *Leishmania donovani* amastigotes-infected macrophages

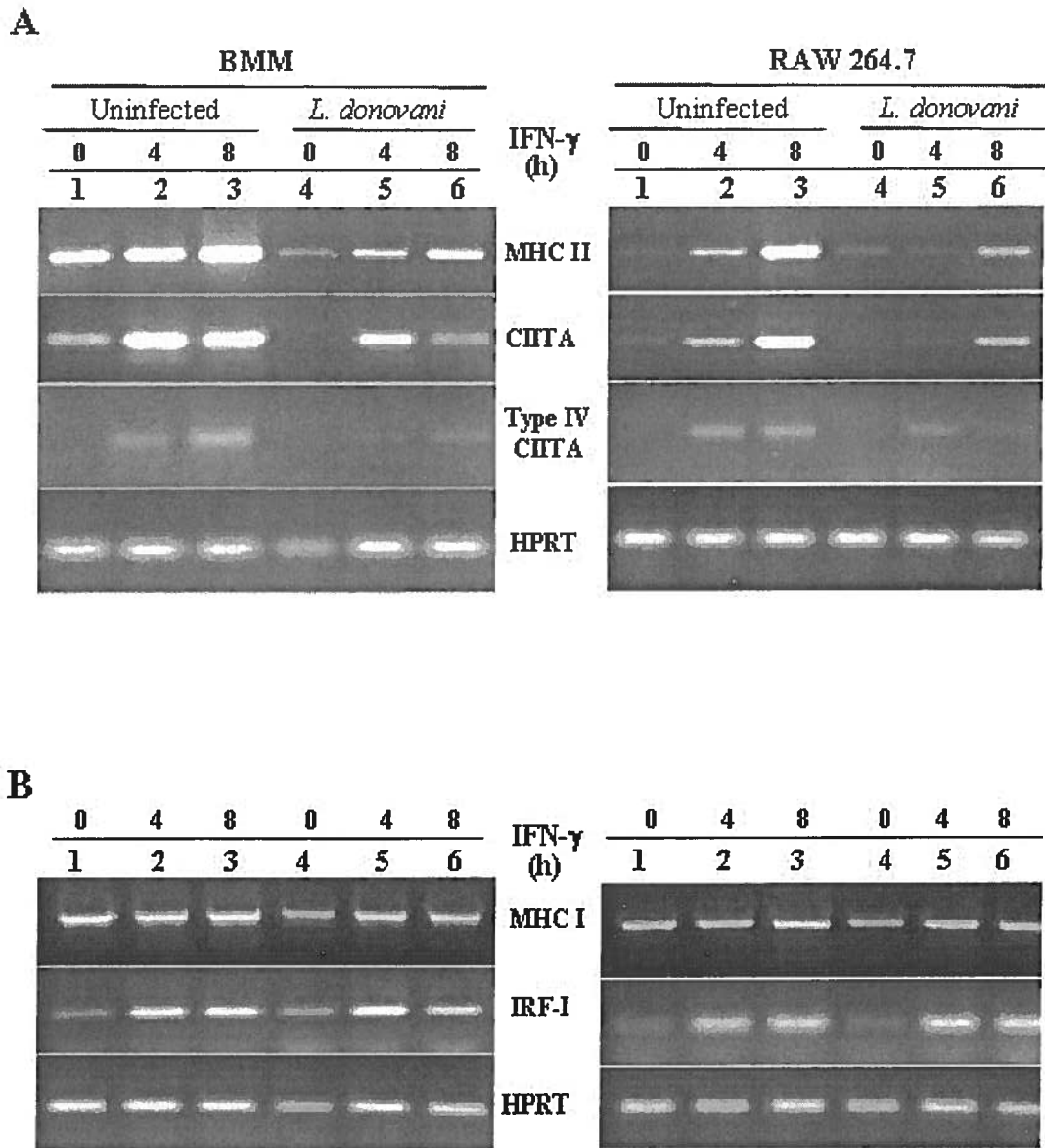


Figure 2. IFN- γ -induced IRF-1 protein expression is normal in cells infected with *Leishmania donovani* amastigotes.

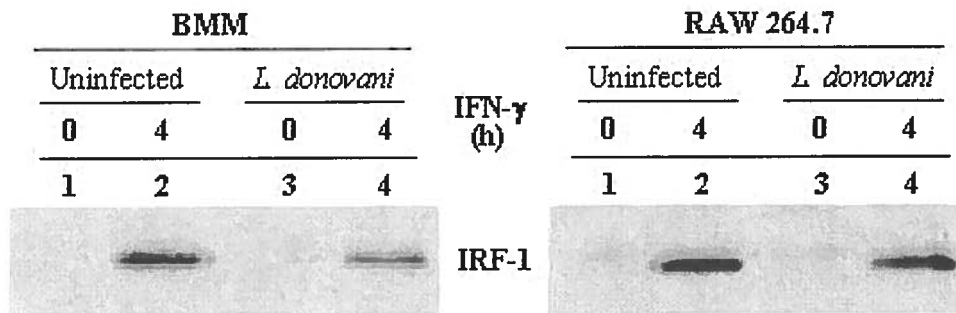
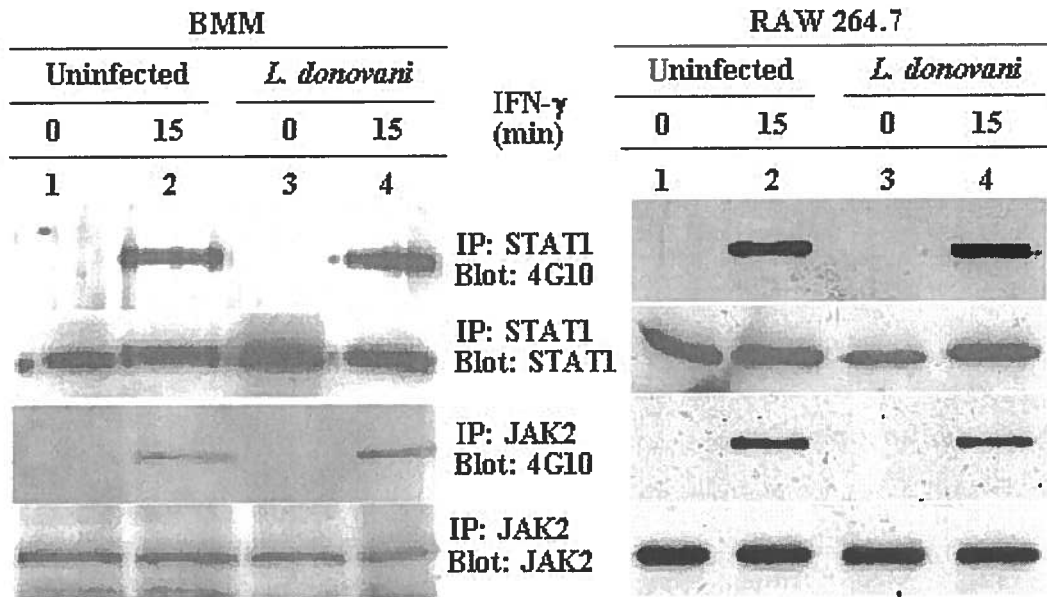


Figure 3. Effect of *Leishmania donovani* amastigotes on IFN- γ -induced activation of JAK-STAT pathway

A



B

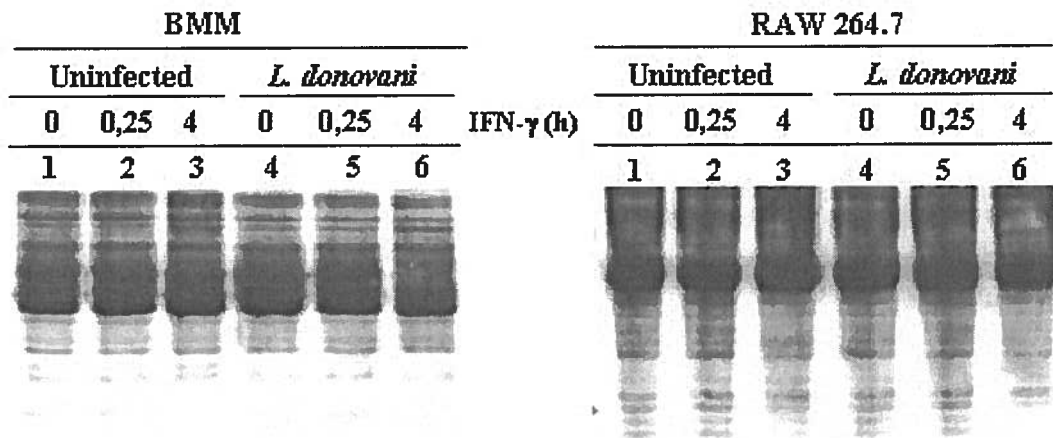
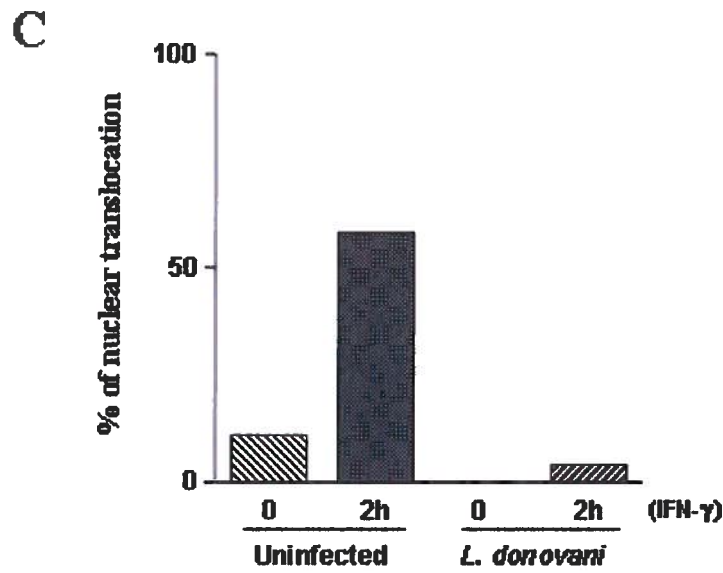
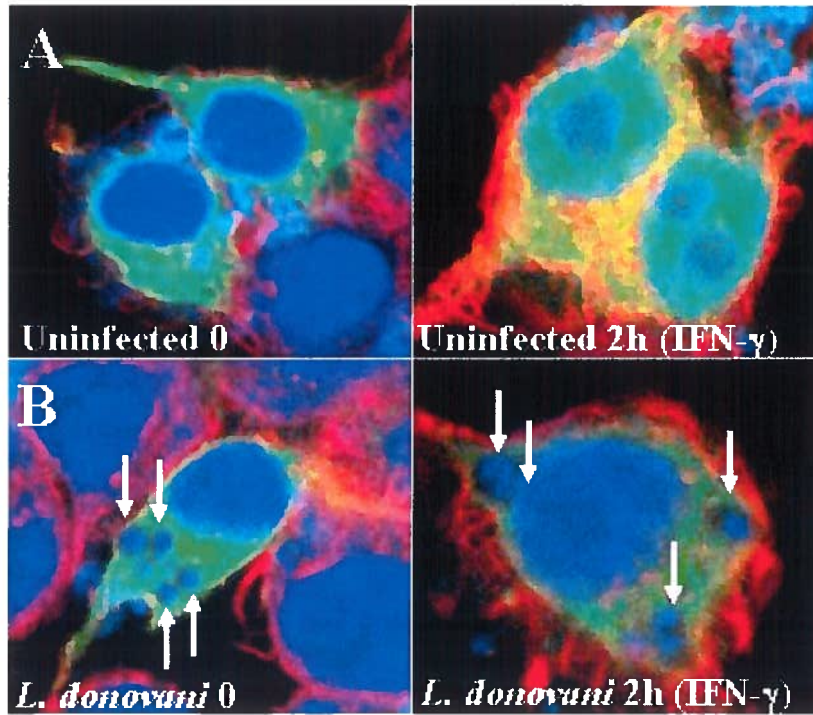


Figure 4. Effect of *Leishmania donovani* amastigotes on PKC- α nuclear translocation induced by IFN- γ



DISCUSSION

Bien que nous soyons continuellement exposés à une grande variété de microorganismes pathogènes, dans la majorité des cas, nous ne succombons pas aux infections. La capacité qu'ont les vertébrés à résister à plusieurs infections dépend de leur système de défense spécialisé, lequel comprend la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. Parmi les cellules immunitaires, le macrophage représente un élément-clé du système de défense de l'hôte tant par son implication dans l'immunité innée que dans l'immunité adaptative. D'une part, il est responsable de la reconnaissance et l'internalisation de microorganismes et sécrète de nombreux médiateurs qui régulent la réponse inflammatoire. D'autre part, il contribue à déclencher et orchestrer le développement de la réponse immune adaptative par sa capacité à présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T (Adams and Hamilton, 1984; Adams and Hamilton, 1987).

Une régulation précise des voies de signalisation qui conduisent à l'activation des fonctions du macrophage est cruciale afin d'éviter l'apparition, au niveau des réponses immunitaires, d'abberations ou encore de déficiences qui risquent de conduire à différents types de pathologies (Tan and Parker, 2003). Des analyses génétiques et biochimiques indiquent que la famille des PKC occupe une place importante dans la modulation des réponses immunitaires par leur implication centrale au niveau de l'activation de diverses fonctions cellulaires (Tan and Parker, 2003). D'ailleurs, de plus en plus d'évidences directes et indirectes suggèrent que la régulation des fonctions du macrophage, notamment l'inflammation (Chano and Descoteaux, 2002; Chen et al., 1998; Diaz-Guerra et al., 1996; St-Denis et al., 1998) et la phagocytose (Allen and Aderem, 1995; Breton and Descoteaux, 2000) implique des mécanismes dépendants de PKC. Tel que mentionné précédemment, sept isoenzymes de PKC sont exprimés chez le macrophage (α , β I et β II, ϵ , δ , η , ζ) (Nishizuka, 1992). Or, malgré un intérêt croissant quant à la compréhension du rôle respectif de chacun des isoenzymes de PKC, nos connaissances de la signalisation intracellulaire conduisant à l'activation des fonctions du macrophage restent encore à préciser.

Globalement, cette étude avait pour but de poursuivre l'élucidation des mécanismes moléculaires qui modulent deux fonctions principales du macrophage : l'inflammation et la présentation antigénique. Ainsi, nos résultats ont permis de démontrer l'implication de PKC- α dans la régulation de l'expression de COX-2, supportant ainsi le rôle de cette isoenzyme dans la modulation des réponses inflammatoires. De plus, nos données nous ont également permis d'élucider le mécanisme par lequel PKC- α module l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ . Finalement, les résultats obtenus dans la dernière partie du projet suggèrent que la stratégie utilisée par le parasite *L. donovani* pour inhiber spécifiquement l'expression du CMH II implique possiblement un mécanisme dépendant de PKC- α .

L'ensemble de ces observations :

- i)* démontre l'importance de PKC- α au niveau de la signalisation intracellulaire du macrophage en contribuant à moduler l'expression de gènes essentiels aux réponses inflammatoires et à la présentation antigénique.
- ii)* permet de mettre en évidence que PKC- α constitue un facteur déterminant de l'immunité globale du macrophage en influençant aussi bien ses fonctions immunitaires innées qu'adaptatives.

1. Rôle de PKC- α dans la régulation de l'expression de COX-2 et dans la synthèse des PGE₂

Les NSAIDs, qui incluent entre autre l'aspirine et l'ibuprofène, sont recommandés depuis une centaine d'années pour traiter plusieurs conditions pathophysiologiques. Ils sont par exemple spécialement utilisés pour soulager les maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et également comme traitement prophylactique contre les maladies cardiovasculaires (Dubois et al., 1998; Lipsky and Isakson, 1997). En 1971, une étude publiée par Vane démontrait que les principales cibles pharmacologiques des NSAIDs étaient COX-1 et COX-2 (Vane, 1971).

Un des inconvénients majeurs des NSAIDs repose sur le fait qu'ils ne sont pas suffisamment spécifiques (Pennisi, 1998). Les effets bénéfiques proviennent de l'inhibition de COX-2 tandis que les effets indésirables comme l'irritation de l'estomac et les problèmes rénaux découlent plutôt de l'inhibition de COX-1 (Vane, 1994). Depuis quelques années, une attention particulière a été apportée dans le milieu scientifique et pharmaceutique afin de développer des inhibiteurs spécifiques de COX-2 qui soient efficaces pour soulager les symptômes tout en diminuant les effets secondaires indésirables (Cowley, 1998). Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires précis qui modulent l'expression et l'activité de COX-2 est essentielle à l'amélioration des présents traitements.

Des études précédentes basées sur l'utilisation d'inhibiteurs et d'activateurs suggèrent que PKC joue un rôle dans la synthèse de PGE₂ chez le macrophage, possiblement en régulant l'expression de COX-2 (Burch, 1987; Pfannkuche et al., 1986). De plus, la surexpression de PKC- α au niveau des cellules de l'épiderme chez la souris augmente l'expression induite par les phorbols esters de médiateurs pro-inflammatoires spécifiques, tels que COX-2, MIP-2 et TNF- α . Ces observations suggèrent que PKC- α joue un rôle au niveau de l'inflammation cutanée (Wang and Smart, 1999). Récemment, la génération de souris PKC- $\epsilon^{-/-}$ a également permis de démontrer un rôle pour cet isoenzyme dans la réponse inflammatoire. La sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, incluant les

PGE₂, est fortement atténuée chez des macrophages PKC- $\epsilon^{-/-}$ stimulés au LPS et à l'IFN- γ (Castrillo et al., 2001). Par ailleurs, des résultats obtenus antérieurement dans le laboratoire indiquent que l'activation de PKC- α est requise pour la modulation des réponses inflammatoires chez le macrophage (Chano and Descoteaux, 2002; St-Denis et al., 1998). Afin de caractériser davantage l'implication de PKC- α dans la réponse inflammatoire, nous avons proposé d'élucider son rôle au niveau de l'expression de COX-2 et de la sécrétion des PGE₂ en réponse au LPS et à l'IFN- γ . Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser des clones de la lignée de macrophages murins RAW 264.7 surexprimant un mutant DN PKC- α (St-Denis et al., 1998).

1.1 Expression de COX-2 en réponse au LPS

Dans un premier temps, nous avons observé que l'expression du gène ainsi que de la protéine COX-2 diminuent de façon significative chez les cellules exprimant le mutant DN PKC- α (Chapitre I, Article I, Figure 1A et B) (Giroux and Descoteaux, 2000), indiquant que PKC- α est impliquée dans la modulation de l'expression de COX-2. De plus, des expériences de transfections transitoires démontrent que l'activité promotrice de COX-2 est inhibée chez les mutants DN de PKC- α (Giroux et Descoteaux, résultats non-publiés) et également que la surexpression d'une forme sauvage de PKC- α influence positivement l'activité promotrice de COX-2 induite par le LPS (Chapitre I, Article I, Figure 2) (Giroux and Descoteaux, 2000). Ces dernières observations apportent un argument supplémentaire en faveur du fait que PKC- α joue un rôle direct dans l'expression de COX-2 en réponse au LPS.

1.1.1 Transcription du gène COX-2 induite par le LPS

Les stimuli, les voies de signalisation ainsi que les facteurs de transcription qui médient l'expression du gène COX-2 sont très diversifiés et spécifiques à chaque type cellulaire. Parmi les nombreuses séquences régulatrices qui composent son promoteur, le gène COX-2 contient des séquences de liaison spécifiques pour NF- κ B et NF-IL6 (Inoue

et al., 1995; Kosaka et al., 1994), deux importants médiateurs intracellulaires des réponses induites par le LPS (Sweet and Hume, 1996).

Des résultats obtenus antérieurement dans le laboratoire démontrent qu'en réponse au LPS, ni l'activation, ni la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B ne sont affectées par la surexpression du mutant DN PKC- α (St-Denis et al., 1998). Cette observation indique que l'inhibition de l'expression du gène COX-2 induite par le LPS chez les macrophages surexprimant le mutant DN PKC- α est possiblement associée à la déficience d'un facteur de transcription autre que NF- κ B. D'ailleurs, malgré que NF- κ B soit impliqué dans la transcription du gène COX-2 chez différents types cellulaires (D'Acquisto et al., 1997; Hwang et al., 1997; Inoue and Tanabe, 1998), des études démontrent qu'il n'est pas requis chez le macrophage, le fibroblaste et l'ostéoblaste (Ogasawara et al., 2001; Wadleigh et al., 2000; Xie et al., 1994).

Diverses observations attribuent une fonction importante à NF-IL6 (c/EBP β) dans l'expression du gène COX-2. Chez des chondrocytes de lapin, des mutations au niveau du promoteur de COX-2 démontrent que c/EBP β et c/EBP δ contribuent à la transcription de COX-2 en réponse à l'IL-1 β (Thomas et al., 2000). Le rôle essentiel de NF-IL6 dans la régulation transcriptionnelle de COX-2 a également été mis en évidence chez des macrophages c/EBP β ^{-/-} dans lesquels l'induction de l'ARNm ainsi que l'activité promotrice du gène COX-2 sont sévèrement altérées en réponse au LPS (Caivano et al., 2001; Gorgoni et al., 2001). Dans le laboratoire, nous avons montré que l'activité transcriptionnelle de NF-IL6 ainsi que sa capacité à lier l'ADN sont déficientes chez le mutant DN PKC- α (Chano and Descoteaux, 2002). En considérant la fonction essentielle de NF-IL6 dans la modulation de l'activité du promoteur de COX-2, ces données suggèrent qu'en réponse au LPS, PKC- α contrôle la transcription du gène COX-2 en participant à l'activation de NF-IL6. Ce dernier est essentiel pour l'induction de plusieurs gènes en réponse au LPS, incluant iNOS, G-CSF et IL-1 (Dlaska and Weiss, 1999; Tanaka et al., 1995; Yang et al., 2000), trois gènes dont l'expression est également inhibée par le mutant DN PKC- α (Chano and Descoteaux, 2002; St-Denis et al., 1998).

Globalement, ces résultats appuient l'hypothèse suggérant qu'une déficience dans l'activité transcriptionnelle de NF-IL6 chez les macrophages surexprimant le mutant DN PKC- α entraîne l'inhibition de l'expression de gènes dont la transcription est essentiellement contrôlée par ce médiateur intracellulaire.

1.2 Expression de COX-2 en réponse à l'IFN- γ

L'expression de COX-2 est induite par l'IFN- γ (Arias-Negrete et al., 1995; Barrios-Rodiles and Chadee, 1998; Blanco et al., 2000), par contre l'implication de PKC dans ce processus n'est pas bien connue.

Contrairement à l'expression de COX-2 induite par le LPS, nous observons que les niveaux d'ARNm de COX-2 induits par l'IFN- γ sont plus élevés chez les cellules surexprimant le mutant DN PKC- α (Chapitre I, Article I, Figure 3A) (Giroux and Descoteaux, 2000). Cette observation indique que comparativement à son rôle de régulateur positif en réponse au LPS, PKC- α agit plutôt comme un régulateur négatif de l'expression de COX-2 en réponse à l'IFN- γ . Conséquemment, l'effet combiné du LPS et de l'IFN- γ induit des niveaux d'expression d'ARNm ainsi que de protéine COX-2 comparables entre les macrophages témoins et les macrophages surexprimant le mutant DN PKC- α (Chapitre I, Article I, Figure 3A et B) (Giroux and Descoteaux, 2000).

1.2.1 Stabilité de l'ARNm de COX-2 en réponse à l'IFN- γ

La stabilisation des transcrits d'ARNm de COX-2 est un mécanisme de régulation post-transcriptionnel important en réponse à divers stimuli (Radzioch and Varesio, 1991; Srivastava et al., 1994). D'ailleurs, l'ARNm de COX-2 contient une région non-traduite localisée à l'extrémité 3' (3'UTR) composée de plusieurs séquences AUUUA répétées (Appleby et al., 1994; Kosaka et al., 1994), également retrouvées au niveau de d'autres espèces d'ARNm possédant une courte demi-vie, tel que le GM-CSF (Shaw and Kamen, 1986). Ces séquences sont déterminantes pour la stabilité et la traduction des transcripts

d'ARNm (Hel et al., 1998; Newton et al., 1998).

Considérant ces observations, il est possible que l'influence de PKC- α sur la stabilité des transcripts d'ARNm de COX-2 représente un des mécanismes qui module l'expression de COX-2 en réponse à l'IFN- γ . D'ailleurs, chez le macrophage, l'expression de l'ARNm de *c-fos* est inhibée par l'IFN- γ via un mécanisme post-transcriptionnel (Radzioch and Varesio, 1991). Or, nos expériences démontrent que le mutant DN PKC- α n'a aucun effet significatif sur les temps de demi-vies (2.34 hres pour les cellules témoins vs 2.4 hres pour le mutant DN PKC- α , Annexe I, Figure 8) ainsi que sur la stabilité de l'ARNm de COX-2 en réponse à l'IFN- γ (Annexe I, Figure 9). Par ailleurs, malgré que les temps de demi-vies soient similaires entre les cellules témoins et le mutant DN PKC- α , on remarque qu'à partir de 4h suivant le traitement au DEX la dégradation de l'ARNm de COX-2 observée chez les cellules témoins se démarque de celles observées chez le mutant DN PKC- α , cette démarcation devenant plus évidente 8h après le traitement au DEX (Annexe I, Figure 8). Cette observation suggère que des mécanismes de dégradation de l'ARNm de COX-2 induite par l'IFN- γ peuvent être affectés par la surexpression du DN de PKC- α .

1.2.2 Transcription du gène COX-2 induite par l'IFN- γ

Des expériences de transcription *in vitro* (nuclear run-on) montrent que les niveaux élevés d'ARNm induits par l'IFN- γ chez le mutant DN PKC- α coïncident avec une augmentation de la transcription du gène COX-2 (Annexe I, Figure 10). Cette observation apporte une évidence quant à la contribution de PKC- α dans la modulation de la transcription du gène COX-2. Par contre, le mécanisme précis demeure encore mal connu.

La présence de deux séquences ISRE localisées dans le promoteur de COX-2 suggère que certaines protéines de la famille des IRFs (Mamane et al., 1999) soient d'importants médiateurs intracellulaires initiant la transcription de COX-2 (Blanco et al., 2000).

Principalement retrouvé chez le macrophage et les cellules de la lignée lymphocytaire, ICSBP est un membre de la famille des IRFs dont l'expression est induite en réponse à l'IFN- γ . Des données précédentes confèrent à ce facteur de transcription un rôle de régulateur négatif des réponses induites par l'IFN- γ (Kantakamalakul et al., 1999; Politis et al., 1994). Bien que l'accumulation d'ARNm de ICSBP induite par l'IFN- γ soit inhibée par des inhibiteurs de PKC (Politis et al., 1992), nous avons observé que le mutant DN PKC- α n'a aucun effet significatif sur l'expression (Chapitre II, Article II, Figure 1B) (Giroux et al., 2003) ainsi que sur la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN de ICSBP (Annexe I, Figure 11). Ces résultats indiquent que le mécanisme par lequel PKC- α influence la transcription de COX-2 est indépendant de ICSBP.

Récemment, l'expression de COX-2 a été étudiée chez des macrophages provenant de souris IRF-1^{-/-} et IRF-2^{-/-} et les résultats obtenus démontrent que IRF-1 est un activateur tandis que IRF-2 est un répresseur de l'expression de COX-2 (Blanco et al., 2000). Des expériences de transfections transitoires supportent également un rôle pour IRF-1 dans l'activation transcriptionnelle de COX-2 (Taniguchi et al., 1997). Des changements drastiques au niveau des concentrations intracellulaires d'IRF-1 et IRF-2 influencent le ratio IRF-1/IRF-2 ce qui a pour effet d'altérer la transcription de différents gènes dépendante de l'un ou l'autre de ces facteurs de transcription (Harada et al., 1993). En réponse à l'IFN- γ , l'expression de IRF-1 et IRF-2 (Chapitre II, Article II, Figure 1B et 4A) (Giroux et al., 2003) est normale chez les macrophages exprimant le mutant DN PKC- α , indiquant que l'augmentation de l'expression de COX-2 chez le mutant DN PKC- α n'est pas associée à une modification des concentrations intracellulaires de ces deux protéines. De plus, à ce jour, aucune évidence claire ne supporte un rôle pour PKC- α dans la modulation de la transcription de COX-2 dépendante de IRF-1 et IRF-2.

Jusqu'à tout récemment, NF-IL6 était surtout considéré comme un important médiateur intracellulaire des réponses induites par le LPS (Sweet and Hume, 1996). Or, différentes observations obtenues chez la lignée de macrophages murins RAW 264.7 suggèrent maintenant que NF-IL6 est impliqué dans les voies de signalisation induites par l'IFN- γ et ces observations considèrent également NF-IL6 comme un gène induit par

cette cytokine (Roy et al., 2000). Il a été démontré que NF-IL6 activerait l'expression de certains gènes induits par l'IFN- γ en se liant à une nouvelle séquence d'ADN récemment identifiée dans le promoteur du gène p48 murin connue sous le nom de GATE (Weihua et al., 1997). Considérant le rôle essentiel de NF-IL6 dans la transcription du gène COX-2 en réponse au LPS et son implication potentielle dans l'expression des gènes induits par l'IFN- γ , il serait particulièrement intéressant de connaître l'impact de la surexpression d'un mutant DN PKC- α sur l'expression, l'activation et la liaison à l'ADN de NF-IL6 en réponse à l'IFN- γ . Ces résultats pourraient mener à l'élucidation d'un nouveau mécanisme de transcription du gène COX-2 en réponse à l'IFN- γ . Par contre, même si plusieurs évidences suggèrent qu'en réponse au LPS, PKC- α module l'expression de COX-2 via un mécanisme impliquant NF-IL6 (Chano and Descoteaux, 2002), il est tout à fait possible que le mécanisme transcriptionnel responsable de l'expression de COX-2 en réponse à l'IFN- γ soit complètement distinct.

1.3 Sécrétion des PGE₂ en réponse au LPS et à l'IFN- γ

En réponse à l'IFN- γ , la sécrétion des PGE₂ coïncide avec l'augmentation de l'expression de la protéine COX-2 (Chapitre I, Article I, Figure 6B) (Giroux and Descoteaux, 2000). Par contre, en réponse au LPS, la diminution de COX-2 n'est pas suffisante pour entraîner une baisse significative de la sécrétion de PGE₂ chez les macrophages exprimant le mutant DN PKC- α (Chapitre I, Article I, Figure 6A) (Giroux and Descoteaux, 2000). Cette observation indique que l'inhibition de l'expression de COX-2 active possiblement, chez les mutants DN PKC- α , un mécanisme qui compense la synthèse des PGE₂ induite par le LPS. L'inhibiteur spécifique de COX-2, NS-398, prévient complètement la synthèse de PGE₂ mais on observe toutefois que l'inhibition de COX-1 par le valéryl salicylate entraîne une réduction partielle des niveaux de PGE₂ (Chapitre I, Article I, Table I) (Giroux and Descoteaux, 2000). Ces données confirment que l'activation de COX-2 est essentielle pour la production de PGE₂ mais suggèrent que COX-1 peut également contribuer à la production d'une certaine quantité de PGE₂ en réponse au LPS. D'ailleurs, des fibroblastes COX-1^{-/-} et COX-2^{-/-} sont capables de

compenser la sécrétion des PGE₂ en modifiant l'expression et l'activité de l'isoenzyme COX fonctionnel ainsi que de la PLA₂ (Kirtikara et al., 1998). Connaître l'impact de la diminution de COX-2 sur l'expression (et surtout l'activité) de COX-1 et de la PLA₂ chez les mutants DN PKC- α permettrait possiblement de mieux comprendre les mécanismes qui modulent la sécrétion des PGE₂ en réponse au LPS.

L'ensemble des résultats présentés dans cette première partie démontrent que l'expression de COX-2 ainsi que la synthèse des PGE₂ impliquent des mécanismes complexes qui varient en fonction du stimulus. D'ailleurs, la génération de souris COX(1/2)^{-/-} indique clairement que les fonctions physiologiques de ces isoenzymes sont étroitement associées au type cellulaire et au stimulus. Également, le phénotype respectif de ces souris indique que des mécanismes d'adaptation peuvent compenser l'absence de l'un ou l'autre des isoenzymes (Langenbach et al., 1995; Morham et al., 1995). Par conséquent, plus nos connaissances concernant les mécanismes spécifiques qui contrôlent la sécrétion des PGE₂ se préciseront, plus l'efficacité des thérapies anti-inflammatoires pourra être améliorée.

2. Localisation intracellulaire de PKC- α en réponse à l'IFN- γ

Suivant une stimulation, PKC- α transloque généralement vers la membrane mais peut également transloquer du cytoplasme vers différents compartiments intracellulaires spécialisés, incluant le noyau (Nakashima, 2002). Ceci suggère qu'une modification de la localisation de PKC- α peut être considérée comme un mécanisme étroitement associé à la transduction des signaux intracellulaires (Buchner, 1995).

La localisation intracellulaire de PKC- α a été étudiée chez des fibroblastes NIH-3T3 en utilisant la protéine PKC- α couplée à la GFP (Wagner et al., 2000). Par conséquent, en transfectant un vecteur d'expression pour la protéine de fusion hPKC- α -GFP, chez des macrophages RAW 264.7 nous avons démontré par microscopie confocale que l'IFN- γ induit la translocation nucléaire de PKC- α (Chapitre II, Article II, Figure 1A) (Giroux et al., 2003). Cette observation suggère que PKC- α transloque au noyau pour interagir

directement avec des protéines nucléaires influençant ainsi la transcription de différents gènes induits par l'IFN- γ . Elle démontre également que PKC- α est activée en réponse à l'IFN- γ par un mécanisme qui reste toutefois à être élucidé.

Dans la lignée de cellules épithéliales humaines NCI-H292 l'expression d'ICAM-1 induite par l'IFN- γ implique un mécanisme dépendant de la protéine tyrosine kinase c-Src dans lequel la PLC γ 2 et la PKC- α joue un rôle important (Chang et al., 2002; Chang et al., 2004). Des données récentes indiquent que la phosphorylation du facteur de transcription PU.1 via l'activation de PKC- α et/ou β I contribue à la l'expression de gp91^{phox} induite par l'IFN- γ chez des monocytes humains (Mazzi et al., 2004). Par contre, des expériences additionnelles seront nécessaires afin de déterminer le mécanisme impliqué dans l'activation de PKC- α chez le macrophage stimulé à l'IFN- γ .

2.1 Expression de différents gènes en réponse à l'IFN- γ

En plus de réguler l'expression de COX-2 en réponse à l'IFN- γ , PKC- α contribue également à moduler l'expression des gènes du CMH II (Giroux et al., 2003). Contrairement à l'augmentation de l'expression de COX-2 observée chez le mutant DN PKC- α , l'accumulation d'ARNm du CMH II est nettement diminuée en réponse à l'IFN- γ (Chapitre II, Article II, Figure 1B) (Giroux et al., 2003). Par ailleurs, PKC- α ne participe pas à l'expression des gènes ICSBP, IRF-1, CMH-I, IP-10 et iNOS induits par l'IFN- γ (Chapitre II, Article II, Figure 1B) (Giroux et al., 2003). Globalement, ces résultats indiquent que PKC- α régule de façon sélective l'expression des gènes induits par l'IFN- γ en agissant soit comme un régulateur négatif (COX-2) ou encore comme un régulateur positif (CMH II). L'analyse de l'expression de l'ensemble du génome chez le mutant DN PKC- α permettrait ultimement de mieux comprendre la fonction globale de PKC- α dans les réponses induites par l'IFN- γ chez le macrophage.

3. Modulation de l'expression du CMH II

Les molécules du CMH II occupent une place centrale dans le développement et le contrôle des réponses immunitaires par leur capacité à présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4⁺. Par conséquent, la régulation précise de leur expression est cruciale pour assurer une réponse immune adaptative adéquate. Notre étude a permis de préciser les événements moléculaires qui contribuent à l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ ainsi que dans le contexte d'une infection par *L. donovani* chez le macrophage.

3.1 Mécanismes moléculaires par lesquels PKC- α module l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ

Nos connaissances quant à l'implication de PKC dans l'expression du CMH II sont relativement restreintes et reposent surtout sur des évidences indirectes (Lee et al., 1995; Politis and Vogel, 1990; Smith et al., 1992). Tout d'abord, tel que mentionné précédemment, nous avons démontré que PKC- α est impliquée dans l'accumulation d'ARNm du CMH II en réponse à l'IFN- γ (Chapitre II, Article II, Figure 1B) (Giroux et al., 2003). Étant donné que les étapes de la voie de signalisation menant à l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ sont bien caractérisées (Revue de littérature, Figure 6) (Muhlethaler-Mottet et al., 1998), l'effet du mutant DN PKC- α a été déterminé dans chacune de ces étapes. Globalement, nos travaux démontrent que PKC- α régule l'expression de CIITA en modulant l'activité transcriptionnelle d'IRF-1 et ainsi ils suggèrent un nouveau mécanisme de régulation pour l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ (Giroux et al., 2003).

3.1.1 Transcription de CIITA

CIITA est considéré comme le facteur de transcription majeur pour l'expression constitutive et inductible des molécules du CMH II. L'importance de CIITA dans la transcription du CMH II est d'ailleurs mise en évidence chez des souris CIITA^{-/-} qui ne

possèdent que de faibles quantités de cellules T CD4⁺ résultant d'une déficience dans l'expression des molécules du CMH II (Chang et al., 1996).

L'inhibition de l'accumulation d'ARNm du gène CIITA de type IV observée chez les macrophages exprimant le mutant DN PKC- α (Chapitre II, Article II, Figure 3A-B) (Giroux et al., 2003) indique que l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ est régulée au niveau de l'expression de CIITA par PKC- α . De plus, des expériences de transfections transitoires montrent que l'expression d'une forme constitutivement active (CA) de PKC- α augmente significativement l'activité du promoteur IV de CIITA (Chapitre II, Article II, Figure 3C) (Giroux et al., 2003). Ce résultat supporte également un rôle pour PKC- α dans l'activité transcriptionnelle de CIITA en réponse à l'IFN- γ .

3.1.1.1 Rôle de la voie des Jak-Stat

Plusieurs travaux attribuent une fonction essentielle à la voie des Jak-Stat dans la transcription de CIITA en réponse à l'IFN- γ (Chang et al., 1994; Meraz et al., 1996). Tel que démontré antérieurement (O'Keefe et al., 2001), on remarque que l'activité du promoteur IV de CIITA est affectée de façon significative par une mutation au niveau de la région GAS (Chapitre II, Article II, Figure 3C) (Giroux et al., 2003), supportant l'importance de Stat1 dans la transcription du gène CIITA.

Contrairement à de récentes évidences qui démontrent que PKC- δ et PKC- ϵ contribuent à la phosphorylation de Stat1 (Deb et al., 2003; Ivaska et al., 2003), nos résultats indiquent que PKC- α ne participe pas à l'activation de la voie des Jak-Stat. Effectivement, les niveaux de phosphorylation de Jak2 et Stat1 sur résidus tyrosine ainsi que la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN de Stat1 sont comparables entre les cellules témoins et les mutants DN PKC- α (Chapitre II, Article II, Figure 2A-B)(Giroux et al., 2003). Or, les résultats présentés dans ces deux figures ont été obtenus à des temps plutôt courts et malgré qu'en réponse à l'IFN- γ , Stat1 se lie très rapidement au pIV de CIITA, une stimulation soutenue est nécessaire pour assurer la synthèse de IRF-1 et ainsi

promouvoir la transcription maximale de CIITA (Eason and Blanck, 2001; Morris et al., 2002). À noter que la phosphorylation de Jak2 et Stat1 a été analysée jusqu'à 4h suivant la stimulation à l'IFN- γ tandis que la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN de Stat1 jusqu'à 5h. Les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus à des temps plus courts (Giroux et Descoteaux, résultats non-publiés). Ces observations indiquent que PKC- α régule l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ en modulant la transcription de CIITA par un mécanisme situé en aval de Stat1. Ainsi, en agissant sur les événements précoces de signalisation, PKC- ϵ et PKC- δ ont un impact global sur la transcription des gènes induits par l'IFN- γ contrairement à PKC- α qui ne participe pas à l'activation de Stat1. D'ailleurs, étant donné que le mutant DN PKC- α ne cause pas de déficience généralisée dans l'expression de divers gènes induits par l'IFN- γ (Chapitre II, Article II, Figure 1B) (Giroux et al., 2003), ceci est également un argument favorisant un rôle plus spécifique pour PKC- α dans la modulation des réponses induites par l'IFN- γ .

3.1.1.2 Rôle de IRF-1

IRF-1 et IRF-2 sont deux membres de la famille des IRFs impliqués dans la transcription de CIITA (Koenig Merediz et al., 2000; Muhlethaler-Mottet et al., 1998). Essentiellement, nous observons que PKC- α n'est impliquée ni dans l'expression de IRF-1, ni dans celle de IRF-2 (Chapitre II, Article II, Figure 4A) (Giroux et al., 2003). De plus, on remarque que la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN de IRF-1 semblent aussi être des événements indépendants de PKC- α (Chapitre II, Article II, Figure 4B) (Giroux et al., 2003). À noter qu'il serait particulièrement intéressant de comparer, par une méthode de *in vivo* «genomic footprinting», la capacité de liaison à l'ADN de IRF-1 entre les cellules témoins et les mutants DN PKC- α . Effectuée dans des conditions plus physiologiques, cette expérience permettrait assurément de confirmer et ainsi de mieux comprendre l'implication de PKC- α dans les mécanismes qui mènent à l'activation, la translocation nucléaire ou l'interaction de IRF-1 avec le promoteur de CIITA. Par ailleurs, des expériences de transfections transitoires démontrent clairement que l'expression de la forme CA de PKC- α augmente l'activité basale et induite par l'IFN- γ

du promoteur IV de CIITA médiée par IRF-1 sans affecter celle médiée par IRF-2 (Chapitre II, Article II, Figure 5) (Giroux et al., 2003). Ceci indique que PKC- α module de façon sélective l'activité de transactivation de IRF-1 pour induire la transcription de CIITA de type IV en réponse à l'IFN- γ .

La préoccupation majeure en ce qui a trait à la régulation des gènes est de comprendre de quelle façon on réussit à atteindre la spécificité requise au contrôle de l'expression génique malgré l'évidence d'un nombre limité de facteur de transcription (Maniatis et al., 1987). La théorie actuelle est basée sur des mécanismes impliquant une synergie précise entre une variété de protéines régulatrices et d'éléments régulateurs sur l'ADN qui permettrait l'assemblage d'un complexe nucléoprotéique appelé «enhanceosome». Ultimement, cette structure agit comme une plateforme servant à stabiliser la machinerie transcriptionnelle de base et favoriser son interaction avec le promoteur (Carey, 1998; Merika and Thanos, 2001).

Chez les macrophages exprimant le mutant DN PKC- α , les niveaux de phosphorylation totale d'IRF-1 ne sont apparemment pas affectés. Par contre, on observe un retard au niveau de la migration du complexe protéique IRF-1 suggérant que PKC- α participe aux modifications post-transcriptionnelles de IRF-1 pour médier la transcription de CIITA (Chapitre II, Article II, Figure 6A-B)(Giroux et al., 2003). Cette possibilité est également supportée par l'observation que PKC- α interagit directement avec IRF-1 (Chapitre II, Article II, Figure #C) (Giroux et al., 2003). En plus de contribuer à la transcription du gène CIITA, la génération de souris IRF-1^{-/-} a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de IRF-1 dans la transcription des gènes iNOS et CMH I (Jarosinski and Massa, 2002; Kamijo et al., 1994; Martin et al., 1994), lequel sont exprimés normalement chez le mutant DN PKC- α en réponse à l'IFN- γ (Chapitre II, Article II, Figure 1B) (Giroux et al., 2003). Ainsi, en se basant sur la théorie de synergie transcriptionnelle, il est possible que les modifications post-transcriptionnelles de IRF-1 dépendantes de PKC- α soient requises pour assurer le fonctionnement adéquat de «l'enhanceosome» spécifiquement dans le contexte du promoteur IV de CIITA. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en reprenant les expériences de transfection transitoires

décrites plus haut pour étudier le rôle de PKC- α dans la transcription dépendante de IRF-1 de gènes comme iNOS et CMH I.

En se basant sur l'ensemble des observations montrées dans l'Article II (Giroux et al., 2003), il apparaît évident que PKC- α module la transcription du gène CIITA par un mécanisme, impliquant le facteur de transcription IRF-1, situé en aval de l'activation de Stat1. Par contre, la fonction exacte de PKC- α reste encore à préciser et il n'est pas exclu que cet enzyme soit impliqué dans un mécanisme contribuant à favoriser la liaison à l'ADN du facteur de transcription IRF-1 plutôt que d'agir directement sur l'activation de la protéine. Par exemple, des travaux récents démontrent que l'IFN- γ induit une augmentation de l'acétylation des histones localisées au pIV de CIITA. Cette modification semble se produire avant la liaison de IRF-1 et l'accumulation des transcrits d'ARNm de CIITA. Ces résultats suggèrent que tout en favorisant l'ouverture et le relâchement de la chromatine, l'acétylation permettrait l'assemblage complet des facteurs au niveau du promoteur ainsi que la stabilisation de l'ensemble de ces facteurs (Morris et al., 2002). Des analyses *in vitro* montrent également que IRF-1 interagit directement avec PCAF, une histone acétylase induite par les phorbol esters, ce qui a pour effet de favoriser sa liaison à la séquence ISRE augmentant ainsi l'activité promotrice dépendante de IRF-1 (Masumi and Ozato, 2001). Le fait que l'expression de PCAF est induite par les phorbol esters suggèrent l'implication de PKC dans ces événements moléculaires. Par conséquent, déterminer l'impact d'un mutant DN PKC- α sur l'expression et/ou l'activité de diverses histone acétylases (ex : PCAF, p300, CBP, etc...) est une alternative qui mérite d'être explorée et qui éventuellement pourrait mener à élucider un modèle plus précis des mécanismes transcriptionnels qui mènent à l'expression de CIITA.

3.2 Régulation de l'expression du CMH II par *L. donovani*

Une des caractéristiques de la plupart des microorganismes pathogènes consiste en leur capacité à survivre et à persister à l'intérieur de l'hôte. Par exemple, *Mycobacterium bovis*, *Toxoplasma gondii* et plusieurs espèces de *Leishmania* ont tous développé des stratégies variées pour éviter la reconnaissance par les cellules T en interférant avec la

présentation antigénique (Antoine et al., 1999; Luder et al., 2001; Wojciechowski et al., 1999). Tel qu'observé antérieurement (Reiner et al., 1988), l'accumulation d'ARNm du CMH II induite par l'IFN- γ diminue considérablement chez des macrophages infectés avec la forme amastigote du parasite *L. donovani* (Chapitre II, Article III, Figure 1A). Par contre, le mécanisme actuel menant à cette inhibition est encore relativement obscur. Conséquemment, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui modulent l'expression du CMH II en réponse à l'IFN- γ (Giroux et al., 2003) nous a permis de caractériser davantage la stratégie utilisée par *L. donovani* menant à l'inhibition du CMH II (Chapitre II, Article III).

À cause de son importance dans l'expression des gènes du CMH II, CIITA possède un rôle fondamental dans la régulation des réponses immunes. De ce fait, l'inhibition de l'expression et/ou de la fonction de CIITA dans le contexte d'une infection s'avère une stratégie efficace afin de générer une baisse considérable de l'expression des molécules du CMH II et ainsi prévenir le développement d'une réponse immunitaire adaptative dirigée contre le microorganisme pathogène (Accolla et al., 2001). D'ailleurs, chez les macrophages humains, la phagocytose de bactéries à Gram négatif et de mycobactéries entraîne une inhibition de la transcription de CIITA accompagnée par la diminution de l'expression constitutive et induite par l'IFN- γ du CMH II (De Lerma Barbaro et al., 1999). Nos résultats indiquent que l'inhibition de l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ chez les macrophages infectés avec la forme amastigote de *L. donovani* est également associée à une baisse de l'accumulation d'ARNm de CIITA de type IV (Chapitre II, Article III, Figure #1A).

Des études antérieures ont démontré que les formes amastigotes et promastigotes de *L. donovani* atténuent la phosphorylation sur résidus tyrosine des protéines Jak et Stat (Blanchette et al., 1999; Nandan and Reiner, 1995). Ces résultats suggèrent que *L. donovani* cible directement l'activation de la voie des Jak-Stat pour inhiber la transcription de CIITA induite par l'IFN- γ . Contrairement à ces observations, nous observons que l'activation de la voie des Jak-Stat induite par l'IFN- γ n'est pas affectée chez des macrophages murins infectés avec la forme amastigote de *L. donovani* (Chapitre

II, Article III, Figure 3A) (Giroux et al., 2003). Les différences que nous observons entre nos résultats et ceux obtenus par ces différents groupes semblent être principalement d'ordre expérimental. Dans un premier cas, des macrophages murins B10R sont infectés 6h avec la forme promastigote de *L. donovani* (Blanchette et al., 1999) et dans le deuxième cas, des cellules humaines différenciées au PMA sont infectées avec la forme amastigote de *L. donovani* (Nandan and Reiner, 1995). De plus, ces groupes suggèrent que le parasite *L. donovani* pourrait persister dans l'hôte en interférant avec l'activation de la voie des Jak-Stat, une voie de signalisation centrale en réponse à l'IFN- γ . Par conséquent, il aurait été particulièrement intéressant que ces précédents travaux soient supportés par des évidences démontrant l'impact spécifique d'une telle déficience, par exemple au niveau de l'expression d'IRF-1 ou encore du CMH II, deux gènes dont la transcription est dépendante de Stat-1. Néanmoins, les données que nous obtenons sont consistantes avec le fait qu'une infection à *L. donovani* n'est pas associée à une déficience généralisée des réponses induites par l'IFN- γ . Nous remarquons effectivement que les patrons de phosphorylation totale sur résidus tyrosine induits par l'IFN- γ ainsi que l'expression de IRF-1 et du CMH I ne sont visiblement pas affectés suite à l'infection de macrophages murins avec la forme amastigote de *L. donovani* (Chapitre II, Article III, Figure 3B et 1B) (Giroux et al., 2003). Ainsi, l'ensemble de nos observations conduisent vraisemblablement à la conclusion que l'inhibition sélective de l'expression de CIITA en réponse à l'IFN- γ dépend d'un mécanisme agissant en aval de ces événements moléculaires précoces.

3.2.1 Inhibition de PKC

Un nombre considérable de travaux démontrent que *Leishmania* altère certains mécanismes PKC-dépendants (Buchmuller-Rouiller and Mael, 1987; Descoteaux and Matlashewski, 1989; Olivier et al., 1992) en synthétisant des glycolipides qui inhibent l'activité de PKC (Descoteaux, 1993; Turco and Descoteaux, 1992). Nous observons d'ailleurs que la translocation nucléaire de PKC- α induite par l'IFN- γ est considérablement affectée chez les macrophages infectés avec *L. donovani* (Chapitre II, Article III, Figure 4B-C) comparativement à celle observée chez les macrophages non-

infectés (Chapitre II, Article III, Figure 4A). En se basant sur les conclusions apportées dans l'Article II (Giroux et al., 2003) soulignant un rôle pour PKC- α dans la transcription de CIITA médiée par le facteur de transcription IRF-1, nous proposons l'hypothèse que *L. donovani* inhibe l'expression de CIITA en interférant avec un mécanisme dépendant de PKC- α . Par contre des analyses supplémentaires servant à déterminer l'impact de *L. donovani* sur la modulation de l'activité de IRF-1 ainsi que sur l'interaction directe entre PKC- α et IRF-1 seront primordiales pour clarifier cette hypothèse.

D'autres pathogènes, telle la bactérie *Legionella pneumophila*, ciblent PKC- α (Jacob et al., 1994). Ainsi, une meilleure caractérisation de la stratégie utilisée par *L. donovani* pour inhiber l'expression du CMH II conduira éventuellement à déterminer si elle est utilisée par d'autres types de microorganismes.

3.3 Signification biologique de la diminution de l'expression du CMH II

Le développement d'une réponse immunitaire adéquate contre plusieurs types de pathogènes, incluant *L. donovani*, dépend de l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Ainsi, la présentation de peptides antigéniques liés aux molécules du CMH II exprimés à la surface des macrophages est l'étape pivot entre la réponse innée et adaptative. Le facteur limitant l'efficacité de l'activation des cellules T CD4⁺ dans le contexte du système de présentation de classe II est la densité de molécules de CMH II à la surface des CPAs.

L'ensemble des résultats présentés dans les Articles II (Giroux et al., 2003) et III indiquent tout d'abord que PKC- α contribue à orchestrer le développement de la réponse immune adaptative par son implication dans la modulation de la transcription du CMH II. De plus, ils suggèrent que *L. donovani* favorise sa survie à l'intérieur de l'hôte en compromettant sa reconnaissance par les cellules T en inhibant l'expression du CMH II. Néanmoins, des expériences additionnelles seront nécessaires pour déterminer si les baisses d'accumulation d'ARNm de CMH II observées chez les macrophages exprimant le mutant DN PKC- α ainsi que chez les macrophages infectés par *L. donovani* ont une

conséquence biologique directe sur l'expression des molécules du CMH II à la surface du macrophage ainsi que sur la présentation antigénique.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus tout au long de ce projet de doctorat supporte un rôle important pour PKC- α dans la signalisation intracellulaire du macrophage et par conséquent, dans l'expression de gènes essentiels au contrôle de certaines fonctions, notamment l'inflammation et la présentation antigénique. Inspirée de ces observations, la Figure 12 illustre l'implication globale de PKC- α chez le macrophage.

1) En réponse au LPS, PKC- α influence l'expression de COX-2 en modulant l'activité transcriptionnelle de NF-IL6. L'expression des gènes IL-1 α/β , iNOS et GM-CSF est également sous le contrôle de NF-IL6 et ce sont des gènes dont l'expression est également inhibée par le mutant DN PKC- α (Chano and Descoteaux, 2002; St-Denis et al., 1998). Par contre, bien que PKC- α module l'expression de COX-2, la synthèse des PGE₂ induite par le LPS semble toutefois contrôlée par un mécanisme additionnel. Ainsi, la contribution précise de PLA₂ et de COX-1 dans notre système reste encore à déterminer.

2) PKC- α régule de façon sélective les réponses induites par l'IFN- γ . Cette protéine contribue à l'expression du gène du CMH II en médiant l'activité transcriptionnelle de CIITA dépendante de IRF-1. Malgré que PKC- α semble interagir directement avec IRF-1, des expériences additionnelles permettront de déterminer le mécanisme exact par lequel PKC- α module l'activité de IRF-1. Contrairement à l'expression du CMH II, l'expression de COX-2 et la sécrétion des PGE₂ sont régulées négativement par PKC- α . Le mécanisme impliqué dans l'activation de PKC- α en réponse à l'IFN- γ ainsi que le mécanisme transcriptionnel par lequel PKC- α module l'expression du gène COX-2 en réponse à l'IFN- γ restent encore à préciser.

3) La forme amastigote du parasite *L. donovani* altère spécifiquement l'expression du CMH II en inhibant la transcription de CIITA induite par l'IFN- γ . La translocation nucléaire de PKC- α est également affectée chez les macrophages infectés. Ces résultats suggèrent que la modulation transcriptionnelle de CIITA implique possiblement un mécanisme dépendant de PKC- α . Étudier l'effet précis de *L. donovani* sur la transcription de CIITA médiée par IRF-1 assurera une meilleure compréhension de ce mécanisme.

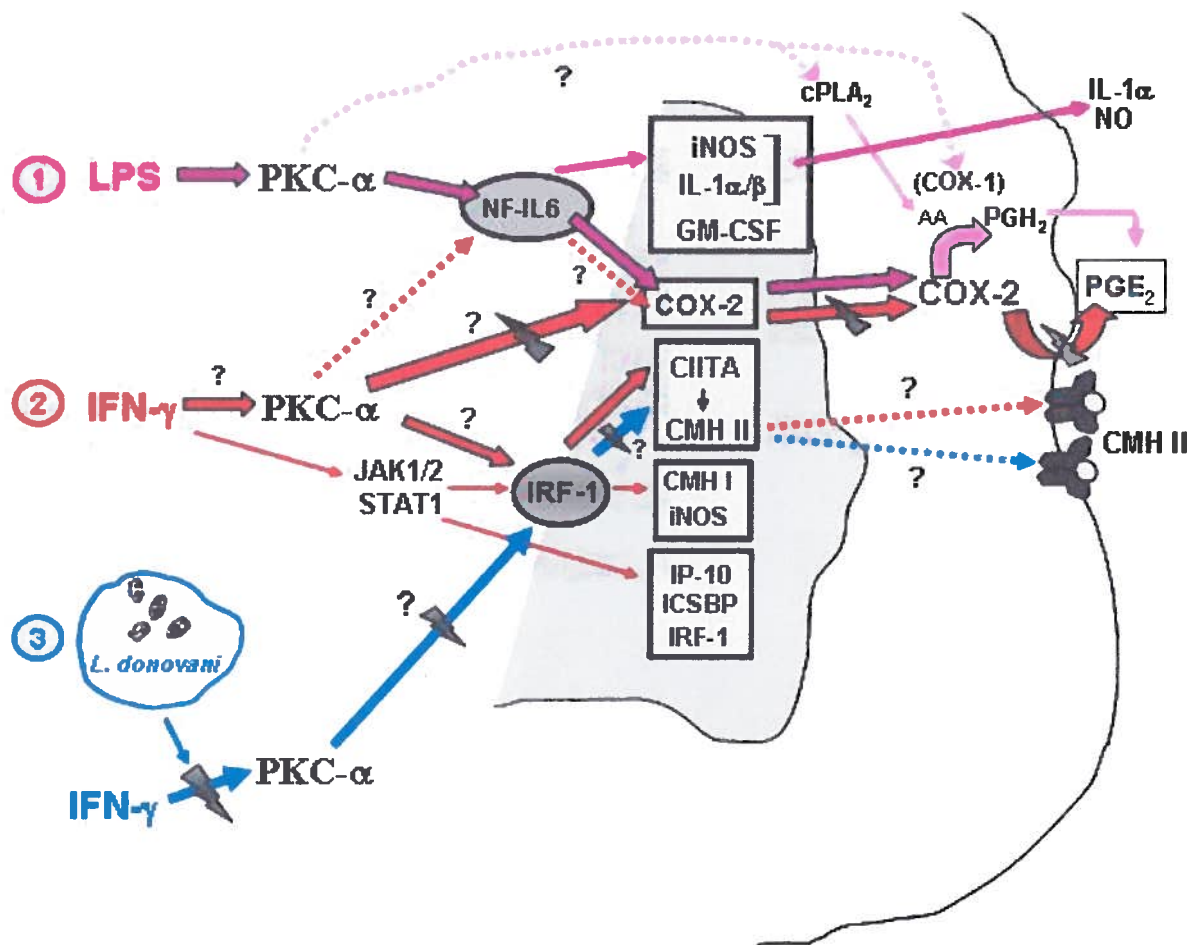


Figure 12 : Schéma illustrant l'ensemble des résultats présentés dans cette thèse. Voir texte pour plus de détails.

REMERCIEMENTS

Chacun de vous, avez été pour moi une source d'inspiration et de motivation.

Tous, à votre façon, vous avez su m'encourager et m'aider à persévérer.

Je ne peux terminer cette thèse sans vous témoigner toute ma reconnaissance

et sans vous dire à tous et chacun

MERCI !!!

Albert,

Merci pour ton support, ta confiance et ta rigueur tout au long de ces 6 années.

L'expérience que j'ai acquise dans le labo au cours de ces 6 dernières années a été très enrichissante et restera toujours pour moi extrêmement précieuse.

Papa, Maman, Benoît, Hans-Da, Gene, Jo et Gwenie,

Merci pour votre compréhension. Je sais que je vous aie tous négligé un peu durant toutes ces années mais une chose est certaine je ne vous aie jamais oubliés.

M. et Mme Lucas, Grand-Maman, Vincent,

Merci pour toutes les petites attentions et pour votre grande générosité. Merci pour votre joie de vivre **contagieuse**... Vous m'avez souvent redonné le sourire dans les moments les plus difficiles.

Dédé,

Merci pour ta grande sensibilité et pour tous les moments précieux passés en ta compagnie durant ces 6 dernières années...

Fredo,

Tout au long de ces années, j'ai découvert en toi un véritable ami. Tu as toujours su trouver les mots pour m'encourager et tu as toujours su être là pour moi. Merci Fredo !!!

JF & Isa, Ben & Bri, So & Steve, Frank, Martin, Eddy, Eric,

Merci d'avoir pris bien soin de mon **divertissement** (!!!) durant ces 6 dernières années !!! Soyez assuré que je ne me suis jamais ennuyée avec vous !!!

Marie-No,

Merci à toi aussi d'avoir compris que la plupart du temps les gens que l'on délaisse le plus ne sont certainement pas ceux qui compte le moins pour nous. Tu es pour moi une personne extrêmement importante et saches que tu as eu (plus que tu ne le crois) une influence déterminante dans ce cheminement. Je te remercie de ta grande compréhension...

Tous les membres du labo (de 1998 à 2004),

Je tiens à vous remercier parce que, de près ou de loin, chacun à votre façon, vous avez tous contribué à l'accomplissement de ce projet.

Et le dernier, mais certainement pas le moindre, Martin (Babe pour les intimes!!!)

Merci pour tout, tout, tout !!! Je ne pourrai jamais trouver de mots assez justes pour t'exprimer toute ma reconnaissance. Et tu ne pourras jamais réaliser que sans toi je n'aurais probablement jamais pu voir la fin. Merci pour ta grande PATIENCE, ton SUPPORT, ta CONFIANCE, tous tes ENCOURAGEMENTS QUOTIDIENS, ta COMPLICITÉ, ta COMPRÉHENSION, etc, etc... !!! Je t'adore!!!

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A.K., Murphy, K.M. and Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787-793.
- Accolla, R.S., De Lerna Barbaro, A., Mazza, S., Casoli, C., De Maria, A. and Tosi, G. (2001) The MHC class II transactivator: prey and hunter in infectious diseases. *Trends Immunol*, 22, 560-563.
- Adams, D.O. and Hamilton, T.A. (1984) The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol*, 2, 283-318.
- Adams, D.O. and Hamilton, T.A. (1987) Molecular transductional mechanisms by which IFN gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol Rev*, 97, 5-27.
- Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406, 782-787.
- Aderem, A. and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593-623.
- Aderem, A.A., Wright, S.D., Silverstein, S.C. and Cohn, Z.A. (1985) Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J Exp Med*, 161, 617-622.
- Akarasreenont, P. and Thiemermann, C. (1996) The induction of cyclo-oxygenase-2 in human pulmonary epithelial cell culture (A549) activated by IL-1beta is inhibited by tyrosine kinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 220, 181-185.
- Akira, S. (1999) Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*, 17, 138-146.
- Akira, S. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol*, 78, 1-56.

- Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2, 675-680.
- Alexander, J. and Russell, D.G. (1992) The interaction of Leishmania species with macrophages. *Adv Parasitol*, 31, 175-254.
- Alexander, W.S., Starr, R., Fenner, J.E., Scott, C.L., Handman, E., Sprigg, N.S., Corbin, J.E., Cornish, A.L., Darwiche, R., Owczarek, C.M., Kay, T.W., Nicola, N.A., Hertzog, P.J., Metcalf, D. and Hilton, D.J. (1999) SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*, 98, 597-608.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. and Flavell, R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-738.
- Allen, L.A. and Aderem, A. (1996) Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol*, 8, 36-40.
- Allen, L.H. and Aderem, A. (1995) A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med*, 182, 829-840.
- Anderson, P., Yip, Y.K. and Vilcek, J. (1983) Human interferon-gamma is internalized and degraded by cultured fibroblasts. *J Biol Chem*, 258, 6497-6502.
- Antoine, J.C., Lang, T., Prina, E., Courret, N. and Hellio, R. (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.

- Appleby, S.B., Ristimaki, A., Neilson, K., Narko, K. and Hla, T. (1994) Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J*, 302 (Pt 3), 723-727.
- Arias-Negrete, S., Keller, K. and Chadee, K. (1995) Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 208, 582-589.
- Auger, M.J., Ross J.A. (1993) The biology of the macrophage. In C.E. Lewis and J. O'D. Mc Gee, e. (ed.), *The Macrophage*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 3-30.
- Ayala, A., Ertel, W. and Chaudry, I.H. (1996) Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock*, 5, 79-90.
- Bach, E.A., Aguet, M. and Schreiber, R.D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, 15, 563-591.
- Bach, E.A., Tanner, J.W., Marsters, S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Shaw, A.S. and Schreiber, R.D. (1996) Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. *Mol Cell Biol*, 16, 3214-3221.
- Bachwich, P.R., Chensue, S.W., Larrick, J.W. and Kunkel, S.L. (1986) Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 136, 94-101.
- Barrios-Rodiles, M. and Chadee, K. (1998) Novel regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by IFN-gamma in human macrophages. *J Immunol*, 161, 2441-2448.

- Bazan, J.F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6934-6938.
- Bazer, F.W., Spencer, T.E. and Ott, T.L. (1997) Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol*, 37, 412-420.
- Bazil, V., Baudys, M., Hilgert, I., Stefanova, I., Low, M.G., Zbrozek, J. and Horejsi, V. (1989) Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. *Mol Immunol*, 26, 657-662.
- Benoist, C. and Mathis, D. (1990) Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol*, 8, 681-715.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361, 315-325.
- Biedermann, T., Zimmermann, S., Himmelrich, H., Gummy, A., Egeter, O., Sakrauski, A.K., Seegmuller, I., Voigt, H., Launois, P., Levine, A.D., Wagner, H., Heeg, K., Louis, J.A. and Rocken, M. (2001) IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol*, 2, 1054-1060.
- Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K.A. and Olivier, M. (1999) *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol*, 29, 3737-3744.
- Blanco, J.C., Contursi, C., Salkowski, C.A., DeWitt, D.L., Ozato, K. and Vogel, S.N. (2000) Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J Exp Med*, 191, 2131-2144.

- Bliss, S.K., Marshall, A.J., Zhang, Y. and Denkers, E.Y. (1999) Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol*, 162, 7369-7375.
- Blobe, G.C., Stribling, S., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (1996) Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv*, 27, 213-248.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15, 749-795.
- Bogdan, C., Moll, H., Solbach, W. and Rollinghoff, M. (1990) Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol*, 20, 1131-1135.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M. and Diefenbach, A. (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*, 173, 17-26.
- Boss, J.M. (1997) Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr Opin Immunol*, 9, 107-113.
- Bovolenta, C., Driggers, P.H., Marks, M.S., Medin, J.A., Politis, A.D., Vogel, S.N., Levy, D.E., Sakaguchi, K., Appella, E., Coligan, J.E. and et al. (1994) Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 5046-5050.
- Breitner, J.C. (1996) The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu Rev Med*, 47, 401-411.

- Breton, A. and Descoteaux, A. (2000) Protein kinase C- α participates in Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 276, 472-476.
- Brown, A.M., Wright, K.L. and Ting, J.P. (1993) Human major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene promoter. Functional analysis and in vivo protein/DNA interactions of constitutive and IFN- γ -induced expression. *J Biol Chem*, 268, 26328-26333.
- Buates, S. and Matlashewski, G. (2001) General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J Immunol*, 166, 3416-3422.
- Buchmuller-Rouiller, Y. and Mauel, J. (1987) Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect Immun*, 55, 587-593.
- Buchner, K. (1995) Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur J Biochem*, 228, 211-221.
- Burch, R.M. (1987) Protein kinase C mediates endotoxin and zymosan-induced prostaglandin synthesis. *Eur J Pharmacol*, 142, 431-435.
- Burstein, H.J., Tepper, R.I., Leder, P. and Abbas, A.K. (1991) Humoral immune functions in IL-4 transgenic mice. *J Immunol*, 147, 2950-2956.
- Caivano, M., Gorgoni, B., Cohen, P. and Poli, V. (2001) The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) and C/EBP delta transcription factors. *J Biol Chem*, 276, 48693-48701.

- Camcioglu, Y., Picard, C., Lacoste, V., Dupuis, S., Akcakaya, N., Cokura, H., Kaner, G., Demirkesen, C., Plancoulaine, S., Emile, J.F., Gessain, A. and Casanova, J.L. (2004) HHV-8-associated Kaposi sarcoma in a child with IFN γ R1 deficiency. *J Pediatr*, 144, 519-523.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, 383, 443-446.
- Carey, M. (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*, 92, 5-8.
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.H., Beavis, A., Koezuka, Y. and Bendelac, A. (1999) Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*, 163, 4647-4650.
- Carrera, L., Gazzinelli, R.T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R. and Sacks, D.L. (1996) Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med*, 183, 515-526.
- Carroll, M.C. (1998) The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*, 16, 545-568.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*, 257, 7847-7851.
- Castrillo, A., Pennington, D.J., Otto, F., Parker, P.J., Owen, M.J. and Bosca, L. (2001) Protein kinase C ϵ is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med*, 194, 1231-1242.

- Celada, A. and Schreiber, R.D. (1987) Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. *J Immunol*, 139, 147-153.
- Chadban, S.J., Tesch, G.H., Foti, R., Lan, H.Y., Atkins, R.C. and Nikolic-Paterson, D.J. (1998) Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. *Immunology*, 94, 72-78.
- Chang, C.H. and Flavell, R.A. (1995) Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J Exp Med*, 181, 765-767.
- Chang, C.H., Fontes, J.D., Peterlin, M. and Flavell, R.A. (1994) Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J Exp Med*, 180, 1367-1374.
- Chang, C.H., Guerder, S., Hong, S.C., van Ewijk, W. and Flavell, R.A. (1996) Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity*, 4, 167-178.
- Chang, Y.J., Holtzman, M.J. and Chen, C.C. (2002) Interferon-gamma-induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway. *J Biol Chem*, 277, 7118-7126.
- Chang, Y.J., Holtzman, M.J. and Chen, C.C. (2004) Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon-gamma-induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase Cgamma, c-Src, and STAT1. *Mol Pharmacol*, 65, 589-598.

- Chano, F. and Descoteaux, A. (2002) Modulation of lipopolysaccharide-induced NF-IL6 activation by protein kinase C-alpha in a mouse macrophage cell line. *Eur J Immunol*, 32, 2897-2904.
- Chen, C.C., Wang, J.K. and Lin, S.B. (1998) Antisense oligonucleotides targeting protein kinase C-alpha, -beta I, or -delta but not -eta inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *J Immunol*, 161, 6206-6214.
- Chin, K.C., Li, G.G. and Ting, J.P. (1997) Importance of acidic, proline/serine/threonine-rich, and GTP-binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: generation of transdominant-negative mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2501-2506.
- Chin, K.C., Mao, C., Skinner, C., Riley, J.L., Wright, K.L., Moreno, C.S., Stark, G.R., Boss, J.M. and Ting, J.P. (1994) Molecular analysis of G1B and G3A IFN gamma mutants reveals that defects in CIITA or RFX result in defective class II MHC and Ii gene induction. *Immunity*, 1, 687-697.
- Clark, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N. and Knopf, J.L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, 65, 1043-1051.
- Courret, N., Prina, E., Mougneau, E., Saraiva, E.M., Sacks, D.L., Glaichenhaus, N. and Antoine, J.C. (1999) Presentation of the Leishmania antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur J Immunol*, 29, 762-773.

- Coutelier, J.P., Van Broeck, J. and Wolf, S.F. (1995) Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse. *J Virol*, 69, 1955-1958.
- Cowley, G. (1998) Getting a grip on pain. A new drug may revolutionize arthritis care. *Newsweek*, 132, 66.
- D'Acquisto, F., Iuvone, T., Rombola, L., Sautebin, L., Di Rosa, M. and Carnuccio, R. (1997) Involvement of NF-kappaB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett*, 418, 175-178.
- Daeron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*, 15, 203-234.
- Danial, N.N., Pernis, A. and Rothman, P.B. (1995) Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science*, 269, 1875-1877.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264, 1415-1421.
- David, M., Chen, H.E., Goelz, S., Larner, A.C. and Neel, B.G. (1995a) Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol*, 15, 7050-7058.
- David, M., Petricoin, E., 3rd, Benjamin, C., Pine, R., Weber, M.J. and Larner, A.C. (1995b) Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science*, 269, 1721-1723.
- Davies, E.G., Isaacs, D. and Levinsky, R.J. (1982) Defective immune interferon production and natural killer activity associated with poor neutrophil mobility and delayed umbilical cord separation. *Clin Exp Immunol*, 50, 454-460.

- De Lerma Barbaro, A., Tosi, G., Valle, M.T., Megiovanni, A.M., Sartoris, S.,
D'Agostino, A., Soro, O., Mingari, M.C., Canonica, G.W., Manca, F. and Accolla,
R.S. (1999) Distinct regulation of HLA class II and class I cell surface expression
in the THP-1 macrophage cell line after bacterial phagocytosis. *Eur J Immunol*,
29, 499-511.
- Deb, D.K., Sassano, A., Lekmine, F., Majchrzak, B., Verma, A., Kambhampati, S.,
Uddin, S., Rahman, A., Fish, E.N. and Plataniias, L.C. (2003) Activation of
protein kinase C delta by IFN-gamma. *J Immunol*, 171, 267-273.
- Decker, T. and Kovarik, P. (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*, 19,
2628-2637.
- Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M. and Kovarik, P. (2002) IFNs
and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest*, 109, 1271-1277.
- Deffrennes, V., Vedrenne, J., Stolzenberg, M.C., Piskurich, J., Barbieri, G., Ting, J.P.,
Charron, D. and Alcaide-Loridan, C. (2001) Constitutive expression of MHC
class II genes in melanoma cell lines results from the transcription of class II
transactivator abnormally initiated from its B cell-specific promoter. *J Immunol*,
167, 98-106.
- Defrance, T., Carayon, P., Billian, G., Guillemot, J.C., Minty, A., Caput, D. and Ferrara,
P. (1994) Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med*, 179, 135-143.
- Descoteaux, A. and Matlashewski, G. (1989) c-fos and tumor necrosis factor gene
expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol Cell Biol*, 9,
5223-5227.

- Descoteaux, A., Matlashewski, G. and Turco, S.J. (1992) Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol*, 149, 3008-3015.
- Descoteaux, A. and Turco, S.J. (2002) Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect*, 4, 975-981.
- Descoteaux, A., Turco, S.J., Sacks, D.L. and Matlashewski, G. (1991) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol*, 146, 2747-2753.
- Descoteaux, a.a.S.J.T. (1993) The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol Today*, 9, 468.
- Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes : the kiss and run hypothesis. *Trends in cell biology*, 5, 183-186.
- Desjardins, M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol*, 3, 280-291.
- Desjardins, M. and Descoteaux, A. (1998) Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages. *Res Immunol*, 149, 689-692.
- Diaz-Guerra, M.J., Bodelon, O.G., Velasco, M., Whelan, R., Parker, P.J. and Bosca, L. (1996) Up-regulation of protein kinase C-epsilon promotes the expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 cells. *J Biol Chem*, 271, 32028-32033.
- Dinarello, C.A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87, 2095-2147.
- Dinarello, C.A. (1999) IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*, 103, 11-24.

- Dlaska, M. and Weiss, G. (1999) Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol*, 162, 6171-6177.
- Dobrovolskaia, M.A. and Vogel, S.N. (2002) Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*, 4, 903-914.
- Doffinger, R., Helbert, M.R., Barcenas-Morales, G., Yang, K., Dupuis, S., Ceron-Gutierrez, L., Espitia-Pinzon, C., Barnes, N., Bothamley, G., Casanova, J.L., Longhurst, H.J. and Kumararatne, D.S. (2004) Autoantibodies to interferon-gamma in a patient with selective susceptibility to mycobacterial infection and organ-specific autoimmunity. *Clin Infect Dis*, 38, e10-14.
- Doherty, T.M. and Coffman, R.L. (1999) Ability of macrophage subsets to transfer resistance to murine leishmaniasis is dependent on IL-12 production. *Eur J Immunol*, 29, 522-529.
- Dominguez, M. and Torano, A. (1999) Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of Leishmania infection. *J Exp Med*, 189, 25-35.
- Dong, Y., Rohn, W.M. and Benveniste, E.N. (1999) IFN-gamma regulation of the type IV class II transactivator promoter in astrocytes. *J Immunol*, 162, 4731-4739.
- Dorn, A., Bollekens, J., Staub, A., Benoist, C. and Mathis, D. (1987) A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell*, 50, 863-872.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B. and Lipsky, P.E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J*, 12, 1063-1073.

- Durand, B., Sperisen, P., Emery, P., Barras, E., Zufferey, M., Mach, B. and Reith, W. (1997) RFXAP, a novel subunit of the RFX DNA binding complex is mutated in MHC class II deficiency. *Embo J*, 16, 1045-1055.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. and Levy, D.E. (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, 84, 443-450.
- Eason, D.D. and Blanck, G. (2001) High level class II trans-activator induction does not occur with transient activation of the IFN-gamma signaling pathway. *J Immunol*, 166, 1041-1048.
- Endo, T., Ogushi, F. and Sone, S. (1996) LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by IL-13, but not by IFN-gamma. *J Immunol*, 156, 2240-2246.
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S. and Yoshimura, A. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387, 921-924.
- English, B.K., Orlicek, S.L., Mei, Z. and Meals, E.A. (1997) Bacterial LPS and IFN-gamma trigger the tyrosine phosphorylation of vav in macrophages: evidence for involvement of the hck tyrosine kinase. *J Leukoc Biol*, 62, 859-864.
- Erb, K.J., Holschke, T., Muth, K., Horak, I. and Schimpl, A. (1994) T cell subset distribution and B cell hyperreactivity in mice expressing interleukin-4 under the

- control of major histocompatibility complex class I regulatory sequences. *Eur J Immunol*, 24, 1143-1147.
- Erbe, D.V., Collins, J.E., Shen, L., Graziano, R.F. and Fanger, M.W. (1990) The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Mol Immunol*, 27, 57-67.
- Fan, X.D., Goldberg, M. and Bloom, B.R. (1988) Interferon-gamma-induced transcriptional activation is mediated by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5122-5125.
- Farrar, M.A., Campbell, J.D. and Schreiber, R.D. (1992) Identification of a functionally important sequence in the C terminus of the interferon-gamma receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 11706-11710.
- Farrar, M.A., Fernandez-Luna, J. and Schreiber, R.D. (1991) Identification of two regions within the cytoplasmic domain of the human interferon-gamma receptor required for function. *J Biol Chem*, 266, 19626-19635.
- Farrar, M.A. and Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 11, 571-611.
- Finkelman, F.D., Katona, I.M., Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1988) IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol*, 140, 1022-1027.
- Finlay, B.B. and Cossart, P. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*, 276, 718-725.
- Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith,

- D.E., Sims, J.E., Bird, T.A. and O'Neill, L.A. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413, 78-83.
- Flaishon, L., Hershkovich, R., Lantner, F., Lider, O., Alon, R., Levo, Y., Flavell, R.A. and Shachar, I. (2000) Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J Exp Med*, 192, 1381-1388.
- Fontes, J.D., Jabrane-Ferrat, N. and Peterlin, B.M. (1997) Assembly of functional regulatory complexes on MHC class II promoters in vivo. *J Mol Biol*, 270, 336-345.
- Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (2000) Brucella abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol*, 165, 5202-5210.
- Frankenburg, S., Leibovici, V., Mansbach, N., Turco, S.J. and Rosen, G. (1990) Effect of glycolipids of Leishmania parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J Immunol*, 145, 4284-4289.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J. and Koyasu, S. (2001) IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*, 22, 556-560.
- Fruth, U., Solioz, N. and Louis, J.A. (1993) Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol*, 150, 1857-1864.
- Fujihara, M., Connolly, N., Ito, N. and Suzuki, T. (1994) Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. *J Immunol*, 152, 1898-1906.

- Fujimoto, M., Naka, T., Nakagawa, R., Kawazoe, Y., Morita, Y., Tateishi, A., Okumura, K., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2000) Defective thymocyte development and perturbed homeostasis of T cells in STAT-induced STAT inhibitor-1/suppressors of cytokine signaling-1 transgenic mice. *J Immunol*, 165, 1799-1806.
- Giroux, M. and Descoteaux, A. (2000) Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C-alpha. *J Immunol*, 165, 3985-3991.
- Giroux, M., Schmidt, M. and Descoteaux, A. (2003) IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha. *J Immunol*, 171, 4187-4194.
- Glimcher, L.H. and Kara, C.J. (1992) Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol*, 10, 13-49.
- Go, N.F., Castle, B.E., Barrett, R., Kastelein, R., Dang, W., Mosmann, T.R., Moore, K.W. and Howard, M. (1990) Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med*, 172, 1625-1631.
- Goh, K.C., Haque, S.J. and Williams, B.R. (1999) p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *Embo J*, 18, 5601-5608.
- Golab, J., Zagozdzon, Stoklosal, T., Kaminski, R., Kozar, K. and Jakobisiak, M. (2000) Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far? *Immunol Lett*, 72, 153-157.

- Gordon, S. (1998) The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol*, 149, 685-688.
- Gordon, S. (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111, 927-930.
- Gorgoni, B., Caivano, M., Arizmendi, C. and Poli, V. (2001) The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J Biol Chem*, 276, 40769-40777.
- Greenberg, S. (1995) Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol*, 5, 93-99.
- Greenberg, S., and S.C. Silverstein. (1993) Phagocytosis. In W.E. Paul, W.E.P. (ed.), *In Fundamental Immunology*. Raven Press, Ltd, New York, pp. 941-964.
- Greenberg, S., Chang, P. and Silverstein, S.C. (1993) Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med*, 177, 529-534.
- Guardiola, J. and Maffei, A. (1993) Control of MHC class II gene expression in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *Crit Rev Immunol*, 13, 247-268.
- Gurniak, C.B. and Berg, L.J. (1996) Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood*, 87, 3151-3160.
- Gutierrez-Ramos, J.C. and Bluethmann, H. (1997) Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol Today*, 18, 329-334.
- Hake, S.B., Masternak, K., Kammerbauer, C., Janzen, C., Reith, W. and Steimle, V. (2000) CIITA leucine-rich repeats control nuclear localization, in vivo recruitment to the major histocompatibility complex (MHC) class II

- enhanceosome, and MHC class II gene transactivation. *Mol Cell Biol*, 20, 7716-7725.
- Handman, E. and Bullen, D.V. (2002) Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol*, 18, 332-334.
- Hannun, Y.A. and Bell, R.M. (1986) Phorbol ester binding and activation of protein kinase C on triton X-100 mixed micelles containing phosphatidylserine. *J Biol Chem*, 261, 9341-9347.
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R. and Bell, R.M. (1985) Activation of protein kinase C by Triton X-100 mixed micelles containing diacylglycerol and phosphatidylserine. *J Biol Chem*, 260, 10039-10043.
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R. and Bell, R.M. (1986) Protein kinase C activation in mixed micelles. Mechanistic implications of phospholipid, diacylglycerol, and calcium interdependencies. *J Biol Chem*, 261, 7184-7190.
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T. and Taniguchi, T. (1989) Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF- 2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell*, 58, 729-739.
- Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M. and Taniguchi, T. (1993) Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science*, 259, 971-974.
- Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., Johnson, L.L., Swain, S.L. and Lund, F.E. (2000) Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*, 1, 475-482.

- Harton, J.A. and Ting, J.P. (2000) Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol Cell Biol*, 20, 6185-6194.
- Haspel, R.L. and Darnell, J.E., Jr. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10188-10193.
- Hawn, T.R., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Buckner, F.S., Akira, S. and Aderem, A. (2002) Leishmania major activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes Infect*, 4, 763-771.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103.
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R. and Goyert, S.M. (1988) The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol*, 141, 547-552.
- Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C.L. and Goyert, S.M. (1996) Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*, 4, 407-414.
- Hel, Z., Di Marco, S. and Radzioch, D. (1998) Characterization of the RNA binding proteins forming complexes with a novel putative regulatory region in the 3'-UTR of TNF-alpha mRNA. *Nucleic Acids Res*, 26, 2803-2812.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 740-745.

- Herwaldt, B.L. (1999) Leishmaniasis. *Lancet*, 354, 1191-1199.
- Hinson, R.M., Williams, J.A. and Shacter, E. (1996) Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4885-4890.
- Hla, T. and Neilson, K. (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 7384-7388.
- Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J. and Halloran, P.F. (1997) IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *J Immunol*, 158, 4260-4269.
- Hornig, T., Barton, G.M. and Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*, 2, 835-841.
- Horvath, C.M. and Darnell, J.E. (1997) The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 233-239.
- House, C. and Kemp, B.E. (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*, 238, 1726-1728.
- Huang, K.P. (1989) The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci*, 12, 425-432.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M. and Aguet, M. (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*, 259, 1742-1745.
- Hug, H. and Sarre, T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J*, 291 (Pt 2), 329-343.

- Hwang, D., Jang, B.C., Yu, G. and Boudreau, M. (1997) Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol*, 54, 87-96.
- Ihle, J.N. and Kerr, I.M. (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*, 11, 69-74.
- Ilg, T., Stierhof, Y.D., McConville, M.J. and Overath, P. (1995) Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Cell Biol*, 66, 205-215.
- Inoue, H. and Tanabe, T. (1998) Transcriptional role of the nuclear factor kappa B site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 244, 143-148.
- Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y. and Tanabe, T. (1995) Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem*, 270, 24965-24971.
- Isaacs, A., Lindermann J. (1957) Virus Interference. 1. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 147, 258-267.
- Ivashkiv, L.B., Ayres, A. and Glimcher, L.H. (1994) Inhibition of IFN-gamma induction of class II MHC genes by cAMP and prostaglandins. *Immunopharmacology*, 27, 67-77.

- Ivaska, J., Bosca, L. and Parker, P.J. (2003) PKCepsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat Cell Biol*, 5, 363-369.
- Jabrane-Ferrat, N., Fontes, J.D., Boss, J.M. and Peterlin, B.M. (1996) Complex architecture of major histocompatibility complex class II promoters: reiterated motifs and conserved protein-protein interactions. *Mol Cell Biol*, 16, 4683-4690.
- Jacob, T., Escallier, J.C., Sanguedolce, M.V., Chicheportiche, C., Bongrand, P., Capo, C. and Mege, J.L. (1994) Legionella pneumophila inhibits superoxide generation in human monocytes via the down-modulation of alpha and beta protein kinase C isotypes. *J Leukoc Biol*, 55, 310-312.
- Janeway, C.A., Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 13, 11-16.
- Jarosinski, K.W. and Massa, P.T. (2002) Interferon regulatory factor-1 is required for interferon-gamma-induced MHC class I genes in astrocytes. *J Neuroimmunol*, 122, 74-84.
- Jonasch, E. and Haluska, F.G. (2001) Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*, 6, 34-55.
- Kaibuchi, K., Fukumoto, Y., Oku, N., Takai, Y., Arai, K. and Muramatsu, M. (1989) Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J Biol Chem*, 264, 13489-13496.
- Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K. and Akira, S. (2001) Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol*, 166, 5688-5694.

- Kamal, M., Katira, A. and Gordon, J. (1991) Stimulation of B lymphocytes via CD72 (human Lyb-2). *Eur J Immunol*, 21, 1419-1424.
- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S.I., Kimura, T., Green, S.J. and et al. (1994) Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science*, 263, 1612-1615.
- Kantakamalakul, W., Politis, A.D., Marecki, S., Sullivan, T., Ozato, K., Fenton, M.J. and Vogel, S.N. (1999) Regulation of IFN consensus sequence binding protein expression in murine macrophages. *J Immunol*, 162, 7417-7425.
- Kaplan, D.H., Greenlund, A.C., Tanner, J.W., Shaw, A.S. and Schreiber, R.D. (1996) Identification of an interferon-gamma receptor alpha chain sequence required for JAK-1 binding. *J Biol Chem*, 271, 9-12.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11, 115-122.
- Kawamura, M., McVicar, D.W., Johnston, J.A., Blake, T.B., Chen, Y.Q., Lal, B.K., Lloyd, A.R., Kelvin, D.J., Staples, J.E., Ortaldo, J.R. and et al. (1994) Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6374-6378.
- Kemp, B.E. and Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci*, 15, 342-346.
- Kemp, M. (1997) Regulator and effector functions of T-cell subsets in human Leishmania infections. *APMIS Suppl*, 68, 1-33.

- Kern, I., Steimle, V., Siegrist, C.A. and Mach, B. (1995) The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes. *Int Immunol*, 7, 1295-1299.
- Kima, P.E., Soong, L., Chicharro, C., Ruddle, N.H. and McMahon-Pratt, D. (1996) Leishmania-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*, 26, 3163-3169.
- Kimura, T., Kadokawa, Y., Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Tarutani, M., Tan, R.S., Takasugi, T., Matsuyama, T., Mak, T.W., Noguchi, S. and Taniguchi, T. (1996) Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. *Genes Cells*, 1, 115-124.
- Kirtikara, K., Morham, S.G., Raghow, R., Lauderkind, S.J., Kanekura, T., Goorha, S. and Ballou, L.R. (1998) Compensatory prostaglandin E2 biosynthesis in cyclooxygenase 1 or 2 null cells. *J Exp Med*, 187, 517-523.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1980) Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem*, 255, 2273-2276.
- Koenig Merediz, S.A., Schmidt, M., Hoppe, G.J., Alfken, J., Meraro, D., Levi, B.Z., Neubauer, A. and Wittig, B. (2000) Cloning of an interferon regulatory factor 2 isoform with different regulatory ability. *Nucleic Acids Res*, 28, 4219-4224.
- Koerner, T.J., Hamilton, T.A. and Adams, D.O. (1987) Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA. *J Immunol*, 139, 239-243.

- Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O., Takahashi, E. and Tanabe, T. (1994) Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem*, 221, 889-897.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Muthukumaran, G., Cook, J.R., Garotta, G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N. and et al. (1995) Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J Biol Chem*, 270, 20915-20921.
- Krolewski, J.J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T.B. and Dalla-Favera, R. (1990) Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene*, 5, 277-282.
- Kubin, M., Chow, J.M. and Trinchieri, G. (1994) Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 83, 1847-1855.
- Kwan, W.C., McMaster, W.R., Wong, N. and Reiner, N.E. (1992) Inhibition of expression of major histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism. *Infect Immun*, 60, 2115-2120.
- Landmann, S., Muhlethaler-Mottet, A., Bernasconi, L., Suter, T., Waldburger, J.M., Masternak, K., Arrighi, J.F., Hauser, C., Fontana, A. and Reith, W. (2001) Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J Exp Med*, 194, 379-391.

- Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D. and et al. (1995) Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*, 83, 483-492.
- Lederer, J.A., Perez, V.L., DesRoches, L., Kim, S.M., Abbas, A.K. and Lichtman, A.H. (1996) Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J Exp Med*, 184, 397-406.
- Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D. and Hwang, D. (1992) Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 267, 25934-25938.
- Lee, Y.J., Panek, R.B., Huston, M. and Benveniste, E.N. (1995) Role of protein kinase C and tyrosine kinase activity in IFN-gamma- induced expression of the class II MHC gene. *Am J Physiol*, 268, C127-137.
- Leonard, W.J. and O'Shea, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 16, 293-322.
- Lien, E. and Ingalls, R.R. (2002) Toll-like receptors. *Crit Care Med*, 30, S1-S11.
- Lipsky, P.E. and Isakson, P.C. (1997) Outcome of specific COX-2 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 24 Suppl 49, 9-14.
- Liu, M.K., Herrera-Velit, P., Brownsey, R.W. and Reiner, N.E. (1994) CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and

- p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 153, 2642-2652.
- Luder, C.G., Walter, W., Beuerle, B., Maeurer, M.J. and Gross, U. (2001) Toxoplasma gondii down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. *Eur J Immunol*, 31, 1475-1484.
- Luderitz, O.F.M.G.C.L.V.R.E.S.T. (1982) Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. In Razin S, R.S.e. (ed.), *Current topics in membranes and transport*. Academic, New York, Vol. 17, pp. 79-151.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M. and O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*, 154, 5071-5079.
- Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E. and Reith, W. (1996) Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol*, 14, 301-331.
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M.J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R. and Hiscott, J. (1999) Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*, 237, 1-14.
- Maniatis, T., Goodbourn, S. and Fischer, J.A. (1987) Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236, 1237-1245.
- Mantovani, R. (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*, 239, 15-27.

- Marine, J.C., Topham, D.J., McKay, C., Wang, D., Parganas, E., Stravopodis, D., Yoshimura, A. and Ihle, J.N. (1999) SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*, 98, 609-616.
- Marnett, L.J., Rowlinson, S.W., Goodwin, D.C., Kalgutkar, A.S. and Lanzo, C.A. (1999) Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem*, 274, 22903-22906.
- Martin, E., Nathan, C. and Xie, Q.W. (1994) Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med*, 180, 977-984.
- Masternak, K., Barras, E., Zufferey, M., Conrad, B., Corthals, G., Aebersold, R., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F., Mach, B. and Reith, W. (1998) A gene encoding a novel RFX-associated transactivator is mutated in the majority of MHC class II deficiency patients. *Nat Genet*, 20, 273-277.
- Masumi, A. and Ozato, K. (2001) Coactivator p300 acetylates the interferon regulatory factor-2 in U937 cells following phorbol ester treatment. *J Biol Chem*, 276, 20973-20980.
- Matte, C., Maion, G., Mourad, W. and Olivier, M. (2001) Leishmania donovani-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol*, 23, 177-184.
- Mazzi, P., Donini, M., Margotto, D., Wientjes, F. and Dusi, S. (2004) IFN-gamma induces gp91(phox) expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1. *J Immunol*, 172, 4941-4947.

- McBride, K.M., McDonald, C. and Reich, N.C. (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *Embo J*, 19, 6196-6206.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A. and Sacks, D.L. (1992) Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Embo J*, 11, 3593-3600.
- McDowell, M.A. and Sacks, D.L. (1999) Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. *Curr Opin Microbiol*, 2, 438-443.
- McNeely, T.B., Rosen, G., Londner, M.V. and Turco, S.J. (1989) Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem J*, 259, 601-604.
- McNeely, T.B. and Turco, S.J. (1987) Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun*, 148, 653-657.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-397.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M. and Schreiber, R.D. (1996) Targeted disruption of the

- Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84, 431-442.
- Merika, M. and Thanos, D. (2001) Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 205-208.
- Mestre, J.R., Mackrell, P.J., Rivadeneira, D.E., Stapleton, P.P., Tanabe, T. and Daly, J.M. (2001) Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells. *J Biol Chem*, 276, 3977-3982.
- Meydan, N., Grunberger, T., Dadi, H., Shahar, M., Arpaia, E., Lapidot, Z., Leeder, J.S., Freedman, M., Cohen, A., Gazit, A., Levitzki, A. and Roifman, C.M. (1996) Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature*, 379, 645-648.
- Migone, T.S., Lin, J.X., Cereseto, A., Mulloy, J.C., O'Shea, J.J., Franchini, G. and Leonard, W.J. (1995) Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*, 269, 79-81.
- Miller, B.W., Baier, L.D. and Morrison, A.R. (1997) Overexpression of protein kinase C-zeta isoform increases cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol*, 273, C130-136.
- Mischak, H., Kolch, W., Goodnight, J., Davidson, W.F., Rapp, U., Rose-John, S. and Mushinski, J.F. (1991) Expression of protein kinase C genes in hemopoietic cells is cell-type- and B cell-differentiation stage specific. *J Immunol*, 147, 3981-3987.
- Moore, K.J., Labrecque, S. and Matlashewski, G. (1993) Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *J Immunol*, 150, 4457-4465.

- Moreno, C.S., Beresford, G.W., Louis-Pence, P., Morris, A.C. and Boss, J.M. (1999) CREB regulates MHC class II expression in a CIITA-dependent manner. *Immunity*, 10, 143-151.
- Moreno, C.S., Emery, P., West, J.E., Durand, B., Reith, W., Mach, B. and Boss, J.M. (1995) Purified X2 binding protein (X2BP) cooperatively binds the class II MHC X box region in the presence of purified RFX, the X box factor deficient in the bare lymphocyte syndrome. *J Immunol*, 155, 4313-4321.
- Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D., Tiano, H.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, C.A. and et al. (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*, 83, 473-482.
- Morris, A.C., Beresford, G.W., Mooney, M.R. and Boss, J.M. (2002) Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol Cell Biol*, 22, 4781-4791.
- Morrison, D.C. and Ryan, J.L. (1987) Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med*, 38, 417-432.
- Mosser, D.M. and Brittingham, A. (1997) Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, 115 Suppl, S9-23.
- Mosser, D.M. and Rosenthal, L.A. (1993) Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol*, 4, 315-322.
- Mowen, K. and David, M. (2000) Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1. *Mol Cell Biol*, 20, 7273-7281.

- Muhlethaler-Mottet, A., Di Berardino, W., Otten, L.A. and Mach, B. (1998) Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity*, 8, 157-166.
- Muhlethaler-Mottet, A., Krawczyk, M., Masternak, K., Spilianakis, C., Kretsovali, A., Papamatheakis, J. and Reith, W. (2004) The S box of major histocompatibility complex class II promoters is a key determinant for recruitment of the transcriptional co-activator CIITA. *J Biol Chem*, 279, 40529-40535.
- Muhlethaler-Mottet, A., Otten, L.A., Steimle, V. and Mach, B. (1997) Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *Embo J*, 16, 2851-2860.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M. and Aguet, M. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264, 1918-1921.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K. and Modolell, M. (2001) Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground. *Immunol Lett*, 75, 159-160.
- Nagarajan, U.M., Louis-Plence, P., DeSandro, A., Nilsen, R., Bushey, A. and Boss, J.M. (1999) RFX-B is the gene responsible for the most common cause of the bare lymphocyte syndrome, an MHC class II immunodeficiency. *Immunity*, 10, 153-162.
- Nakashima, S. (2002) Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function. *J Biochem (Tokyo)*, 132, 669-675.

- Nandan, D. and Reiner, N.E. (1995) Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect Immun*, 63, 4495-4500.
- Nelson, N., Marks, M.S., Driggers, P.H. and Ozato, K. (1993) Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol Cell Biol*, 13, 588-599.
- Netea, M.G., van Deuren, M., Kullberg, B.J., Cavaiillon, J.M. and Van der Meer, J.W. (2002) Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol*, 23, 135-139.
- Newton, R., Seybold, J., Kuitert, L.M., Bergmann, M. and Barnes, P.J. (1998) Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem*, 273, 32312-32321.
- Nguyen, H., Hiscott, J. and Pitha, P.M. (1997) The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8, 293-312.
- Nguyen, H., Ramana, C.V., Bayes, J. and Stark, G.R. (2001) Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem*, 276, 33361-33368.
- Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334, 661-665.

- Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258, 607-614.
- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J*, 9, 484-496.
- Novotney, M., Chang, Z.L., Uchiyama, H. and Suzuki, T. (1991) Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines. *Biochemistry*, 30, 5597-5604.
- Ogasawara, A., Arakawa, T., Kaneda, T., Takuma, T., Sato, T., Kaneko, H., Kumegawa, M. and Hakeda, Y. (2001) Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP beta, cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem*, 276, 7048-7054.
- O'Keefe, G.M., Nguyen, V.T., Ping Tang, L.L. and Benveniste, E.N. (2001) IFN-gamma regulation of class II transactivator promoter IV in macrophages and microglia: involvement of the suppressors of cytokine signaling-1 protein. *J Immunol*, 166, 2260-2269.
- Olivier, M., Brownsey, R.W. and Reiner, N.E. (1992) Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 7481-7485.
- Otten, L.A., Steimle, V., Bontron, S. and Mach, B. (1998) Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator CIITA. *Eur J Immunol*, 28, 473-478.

- Paglia, P., Girolomoni, G., Robbiati, F., Granucci, F. and Ricciardi-Castagnoli, P. (1993) Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses in vivo. *J Exp Med*, 178, 1893-1901.
- Pai, R.K., Askew, D., Boom, W.H. and Harding, C.V. (2002) Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J Immunol*, 169, 1326-1333.
- Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, A. (1986) The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science*, 233, 853-859.
- Patrono, C., Patrignani, P. and Garcia Rodriguez, L.A. (2001) Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J Clin Invest*, 108, 7-13.
- Pearl, J.E., Saunders, B., Ehlers, S., Orme, I.M. and Cooper, A.M. (2001) Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. *Cell Immunol*, 211, 43-50.
- Pearson, R.D. and Sousa, A.Q. (1996) Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 22, 1-13.
- Pennisi, E. (1998) Building a better aspirin. *Science*, 280, 1191-1192.
- Perera, P.Y., Vogel, S.N., Detore, G.R., Haziot, A. and Goyert, S.M. (1997) CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. *J Immunol*, 158, 4422-4429.

- Perussia, B., Dayton, E.T., Fanning, V., Thiagarajan, P., Hoxie, J. and Trinchieri, G. (1983) Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J Exp Med*, 158, 2058-2080.
- Pfannkuche, H.J., Kaefer, V. and Resch, K. (1986) A possible role of protein kinase C in regulating prostaglandin synthesis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 139, 604-611.
- Phipps, R.P., Stein, S.H. and Roper, R.L. (1991) A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today*, 12, 349-352.
- Pimenta, P.F., Modi, G.B., Pereira, S.T., Shahabuddin, M. and Sacks, D.L. (1997) A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115 (Pt 4), 359-369.
- Piskurich, J.F., Linhoff, M.W., Wang, Y. and Ting, J.P. (1999) Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol*, 19, 431-440.
- Platanias, L.C., Uddin, S., Bruno, E., Korkmaz, M., Ahmad, S., Alsayed, Y., Van Den Berg, D., Druker, B.J., Wickrema, A. and Hoffman, R. (1999) CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*, 27, 1315-1321.
- Platt, N., da Silva, R.P. and Gordon, S. (1998) Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*, 8, 365-372.

- Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T. and Gordon, S. (1996) Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12456-12460.
- Politis, A.D., Ozato, K., Coligan, J.E. and Vogel, S.N. (1994) Regulation of IFN-gamma-induced nuclear expression of IFN consensus sequence binding protein in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*, 152, 2270-2278.
- Politis, A.D., Sivo, J., Driggers, P.H., Ozato, K. and Vogel, S.N. (1992) Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine peritoneal macrophages. Induction by IFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha, dexamethasone, and protein kinase inhibitors. *J Immunol*, 148, 801-807.
- Politis, A.D. and Vogel, S.N. (1990) Pharmacologic evidence for the requirement of protein kinase C in IFN-induced macrophage Fc gamma receptor and Ia antigen expression. *J Immunol*, 145, 3788-3795.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.
- Prina, E., Lang, T., Glaichenhaus, N. and Antoine, J.C. (1996) Presentation of the protective parasite antigen LACK by Leishmania-infected macrophages. *J Immunol*, 156, 4318-4327.
- Prive, C. and Descoteaux, A. (2000) Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and

- extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol*, 30, 2235-2244.
- Puentes, S.M., Da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H. and Joiner, K.A. (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*, 145, 4311-4316.
- Quest, A.F., Bardes, E.S. and Bell, R.M. (1994) A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. Deletion analysis of the Cys2 domain defines a minimal 43-amino acid peptide. *J Biol Chem*, 269, 2961-2970.
- Radzioch, D. and Varesio, L. (1991) c-fos mRNA expression in macrophages is downregulated by interferon-gamma at the posttranscriptional level. *Mol Cell Biol*, 11, 2718-2722.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Han, Y., Ransohoff, R.M., Schreiber, R.D. and Stark, G.R. (2001) Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6674-6679.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D. and Stark, G.R. (2002) Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*, 23, 96-101.
- Ramana, C.V., Grammatikakis, N., Chernov, M., Nguyen, H., Goh, K.C., Williams, B.R. and Stark, G.R. (2000) Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *Embo J*, 19, 263-272.
- Rane, S.G. and Reddy, E.P. (1994) JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene*, 9, 2415-2423.

- Ravetch, J.V. and Clynes, R.A. (1998) Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol*, 16, 421-432.
- Reiner, N.E. (1994) Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today*, 15, 374-381.
- Reiner, N.E. and Malemud, C.J. (1984) Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (Donovani): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. *Cell Immunol*, 88, 501-510.
- Reiner, N.E. and Malemud, C.J. (1985) Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *J Immunol*, 134, 556-563.
- Reiner, N.E., Ng, W., Ma, T. and McMaster, W.R. (1988) Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 4330-4334.
- Reiner, S.L., Zheng, S., Wang, Z.E., Stowring, L. and Locksley, R.M. (1994) *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med*, 179, 447-456.
- Reith, W., Kobr, M., Emery, P., Durand, B., Siegrist, C.A. and Mach, B. (1994) Cooperative binding between factors RFX and X2bp to the X and X2 boxes of MHC class II promoters. *J Biol Chem*, 269, 20020-20025.
- Reith, W. and Mach, B. (2001) The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol*, 19, 331-373.

- Reith, W., Satola, S., Sanchez, C.H., Amaldi, I., Lisowska-Grospierre, B., Griscelli, C., Hadam, M.R. and Mach, B. (1988) Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lacks a specific HLA-DR promoter binding protein, RF-X. *Cell*, 53, 897-906.
- Riese, J., Hoff, T., Nordhoff, A., DeWitt, D.L., Resch, K. and Kaefer, V. (1994) Transient expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 during mouse macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 55, 476-482.
- Rietschel, E.T., Schade, U., Jensen, M., Wollenweber, H.W., Luderitz, O. and Greisman, S.G. (1982) Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia. *Scand J Infect Dis Suppl*, 31, 8-21.
- Rigaud, G., De Lerma Barbaro, A., Nicolis, M., Cestari, T., Ramarli, D., Riviera, A.P. and Accolla, R.S. (1996) Induction of CIITA and modification of in vivo HLA-DR promoter occupancy in normal thymic epithelial cells treated with IFN-gamma: similarities and distinctions with respect to HLA-DR-constitutive B cells. *J Immunol*, 156, 4254-4258.
- Riley, J.L., Westerheide, S.D., Price, J.A., Brown, J.A. and Boss, J.M. (1995) Activation of class II MHC genes requires both the X box region and the class II transactivator (CIITA). *Immunity*, 2, 533-543.
- Rittig, M.G. and Bogdan, C. (2000) Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*, 16, 292-297.
- Roth, G.J. and Calverley, D.C. (1994) Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood*, 83, 885-898.

- Roy, S.K., Wachira, S.J., Weihua, X., Hu, J. and Kalvakolanu, D.V. (2000)
CCAAT/enhancer-binding protein-beta regulates interferon-induced transcription
through a novel element. *J Biol Chem*, 275, 12626-12632.
- Russell, S.W. and Pace, J.L. (1984) Both the kind and magnitude of stimulus are
important in overcoming the negative regulation of macrophage activation by
PGE2. *J Leukoc Biol*, 35, 291-301.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J. and Beverley, S.M.
(2000) The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. *Proc Natl
Acad Sci U S A*, 97, 406-411.
- Sakamoto, H., Yasukawa, H., Masuhara, M., Tanimura, S., Sasaki, A., Yuge, K.,
Ohtsubo, M., Ohtsuka, A., Fujita, T., Ohta, T., Furukawa, Y., Iwase, S., Yamada,
H. and Yoshimura, A. (1998) A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-
gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood*, 92, 1668-
1676.
- Sakatsume, M., Igarashi, K., Winestock, K.D., Garotta, G., Lerner, A.C. and Finbloom,
D.S. (1995) The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta
(accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional
receptor unit capable of activating STAT transcription factors. *J Biol Chem*, 270,
17528-17534.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by
cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-
stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor
alpha. *J Exp Med*, 179, 1109-1118.

- Santos-Argumedo, L., Gordon, J., Heath, A.W. and Howard, M. (1994) Antibodies to murine CD40 protect normal and malignant B cells from induced growth arrest. *Cell Immunol*, 156, 272-285.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P. and Haslett, C. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14, 131-136.
- Scholl, P.R. and Geha, R.S. (1994) MHC class II signaling in B-cell activation. *Immunol Today*, 15, 418-422.
- Scholl, T., Mahanta, S.K. and Strominger, J.L. (1997) Specific complex formation between the type II bare lymphocyte syndrome-associated transactivators CIITA and RFX5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6330-6334.
- Schrag, J.D., Bergeron, J.J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D.Y. and Cygler, M. (2001) The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell*, 8, 633-644.
- Schreiber, R.D. and Farrar, M.A. (1993) The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol Jpn*, 28 Suppl 4, 88-94; discussion 95-86.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. and Hume, D.A. (2003) Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms, and functions. *J Leukoc Biol*.
- Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249, 1429-1431.
- Schwartz, R.H. (1986) Immune response (Ir) genes of the murine major histocompatibility complex. *Adv Immunol*, 38, 31-201.

- Seki, E., Tsutsui, H., Nakano, H., Tsuji, N., Hoshino, K., Adachi, O., Adachi, K., Futatsugi, S., Kuida, K., Takeuchi, O., Okamura, H., Fujimoto, J., Akira, S. and Nakanishi, K. (2001) Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J Immunol*, 166, 2651-2657.
- Shapira, L., Takashiba, S., Champagne, C., Amar, S. and Van Dyke, T.E. (1994) Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. *J Immunol*, 153, 1818-1824.
- Sharf, R., Meraro, D., Azriel, A., Thornton, A.M., Ozato, K., Petricoin, E.F., Lerner, A.C., Schaper, F., Hauser, H. and Levi, B.Z. (1997) Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J Biol Chem*, 272, 9785-9792.
- Sharfe, N., Dadi, H.K., O'Shea, J.J. and Roifman, C.M. (1997) Jak3 activation in human lymphocyte precursor cells. *Clin Exp Immunol*, 108, 552-556.
- Shaw, G. and Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46, 659-667.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 189, 1777-1782.

- Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D. and Darnell, J.E., Jr. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*, 76, 821-828.
- Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M. and Darnell, J.E., Jr. (1993) A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science*, 261, 1744-1746.
- Singer, II, Kawka, D.W., Schloemann, S., Tessner, T., Riehl, T. and Stenson, W.F. (1998) Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 115, 297-306.
- Smith, M.R., Ramsburg, E.A., Kung, H.F. and Durum, S.K. (1992) Components of the protein kinase C pathway induce Ia expression after injection into macrophages. *J Immunol*, 149, 1304-1310.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L. and Garavito, R.M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69, 145-182.
- Smith, W.L., Garavito, R.M. and DeWitt, D.L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 271, 33157-33160.
- Soderling, T.R. (1990) Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains. *J Biol Chem*, 265, 1823-1826.
- Soh, J., Donnelly, R.J., Kotenko, S., Mariano, T.M., Cook, J.R., Wang, N., Emanuel, S., Schwartz, B., Miki, T. and Pestka, S. (1994) Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. *Cell*, 76, 793-802.

- Solbach, W. and Laskay, T. (2000) The host response to Leishmania infection. *Adv Immunol*, 74, 275-317.
- Soos, J.M., Krieger, J.I., Stuve, O., King, C.L., Patarroyo, J.C., Aldape, K., Wosik, K., Slavín, A.J., Nelson, P.A., Antel, J.P. and Zamvil, S.S. (2001) Malignant glioma cells use MHC class II transactivator (CIITA) promoters III and IV to direct IFN-gamma-inducible CIITA expression and can function as nonprofessional antigen presenting cells in endocytic processing and CD4(+) T-cell activation. *Glia*, 36, 391-405.
- Srivastava, S.K., Tetsuka, T., Daphna-Iken, D. and Morrison, A.R. (1994) IL-1 beta stabilizes COX II mRNA in renal mesangial cells: role of 3'-untranslated region. *Am J Physiol*, 267, F504-508.
- Stahl, M.L., Ferenz, C.R., Kelleher, K.L., Kriz, R.W. and Knopf, J.L. (1988) Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature*, 332, 269-272.
- Stahl, P.D. and Ezekowitz, R.A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*, 10, 50-55.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67, 227-264.
- Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A. and Hilton, D.J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387, 917-921.

- St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F. and Descoteaux, A. (1999) Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J Immunol*, 163, 5505-5511.
- St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y. and Descoteaux, A. (1998) Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem*, 273, 32787-32792.
- Steimle, V., Durand, B., Barras, E., Zufferey, M., Hadam, M.R., Mach, B. and Reith, W. (1995) A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev*, 9, 1021-1032.
- Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M. and Mach, B. (1993) Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell*, 75, 135-146.
- Steimle, V., Siegrist, C.A., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B. and Mach, B. (1994) Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*, 265, 106-109.
- Strunk, R.C., Cole, F.S., Perlmutter, D.H. and Colten, H.R. (1985) gamma-Interferon increases expression of class III complement genes C2 and factor B in human monocytes and in murine fibroblasts transfected with human C2 and factor B genes. *J Biol Chem*, 260, 15280-15285.
- Subramaniam, P.S., Torres, B.A. and Johnson, H.M. (2001) So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine*, 15, 175-187.

- Sutterwala, F.S. and Mosser, D.M. (1999) The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*, 65, 543-551.
- Sutterwala, F.S., Noel, G.J., Clynes, R. and Mosser, D.M. (1997) Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med*, 185, 1977-1985.
- Sweet, M.J. and Hume, D.A. (1996) Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol*, 60, 8-26.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem*, 252, 7603-7609.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem*, 254, 3692-3695.
- Takaoka, A., Tanaka, N., Mitani, Y., Miyazaki, T., Fujii, H., Sato, M., Kovarik, P., Decker, T., Schlessinger, J. and Taniguchi, T. (1999) Protein tyrosine kinase Pyk2 mediates the Jak-dependent activation of MAPK and Stat1 in IFN-gamma, but not IFN-alpha, signaling. *Embo J*, 18, 2480-2488.
- Tan, S.L. and Parker, P.J. (2003) Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J*, 376, 545-552.
- Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N. and Kishimoto, T. (1995) Targeted disruption of

the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell*, 80, 353-361.

Taniguchi, H., Sakano, T., Hamasaki, T., Kashiwa, H. and Ueda, K. (1989) Effect of protein kinase C inhibitor (H-7) and calmodulin antagonist (W-7) on pertussis toxin-induced IL-1 production by human adherent monocytes. Comparison with lipopolysaccharide as a stimulator of IL-1 production. *Immunology*, 67, 210-215.

Taniguchi, T., Lamphier, M.S. and Tanaka, N. (1997) IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1333, M9-17.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. and Tanaka, N. (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*, 19, 623-655.

Tapping, R.I., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P.J. and Tobias, P.S. (2000) Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol*, 165, 5780-5787.

Taylor, S.S., Buechler, J.A. and Yonemoto, W. (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, 59, 971-1005.

Thomas, B., Berenbaum, F., Humbert, L., Bian, H., Bereziat, G., Crofford, L. and Olivier, J.L. (2000) Critical role of C/EBPdelta and C/EBPbeta factors in the stimulation of the cyclooxygenase-2 gene transcription by interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Eur J Biochem*, 267, 6798-6809.

- Ting, J.P. and Baldwin, A.S. (1993) Regulation of MHC gene expression. *Curr Opin Immunol*, 5, 8-16.
- Ting, J.P., Painter, A., Zeleznik-Le, N.J., MacDonald, G., Moore, T.M., Brown, A. and Schwartz, B.D. (1994) YB-1 DNA-binding protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes. *J Exp Med*, 179, 1605-1611.
- Ting, J.P. and Trowsdale, J. (2002) Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, 109 Suppl, S21-33.
- Trowsdale, J. (1993) Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genet*, 9, 117-122.
- Tsang, S.Y., Nakanishi, M. and Peterlin, B.M. (1990) Mutational analysis of the DRA promoter: cis-acting sequences and trans-acting factors. *Mol Cell Biol*, 10, 711-719.
- Turco, S.J. (1990) The leishmanial lipophosphoglycan: a multifunctional molecule. *Exp Parasitol*, 70, 241-245.
- Turco, S.J. and Descoteaux, A. (1992) The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol*, 46, 65-94.
- Uddin, S., Lekmine, F., Sassano, A., Rui, H., Fish, E.N. and Platanius, L.C. (2003) Role of Stat5 in type I interferon-signaling and transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 308, 325-330.
- Uddin, S., Sher, D.A., Alsayed, Y., Pons, S., Colamonici, O.R., Fish, E.N., White, M.F. and Platanius, L.C. (1997) Interaction of p59fyn with interferon-activated Jak kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, 235, 83-88.

- Ulevitch, R.J. and Tobias, P.S. (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*, 13, 437-457.
- Unanue, E.R. and Allen, P.M. (1987) The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, 236, 551-557.
- Underhill, D.M. and Ozinsky, A. (2002a) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, 20, 825-852.
- Underhill, D.M. and Ozinsky, A. (2002b) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, 14, 103-110.
- van den Broek, M.F., Muller, U., Huang, S., Zinkernagel, R.M. and Aguet, M. (1995) Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev*, 148, 5-18.
- Vane, J. (1994) Towards a better aspirin. *Nature*, 367, 215-216.
- Vane, J.R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231, 232-235.
- Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J. and Willoughby, D.A. (1994) Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2046-2050.
- Vassalli, P. (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 10, 411-452.
- Verbsky, J.W., Bach, E.A., Fang, Y.F., Yang, L., Randolph, D.A. and Fields, L.E. (1996) Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non-lymphoid and non-myeloid cells. *J Biol Chem*, 271, 13976-13980.

- Vilen, B.J., Penta, J.F. and Ting, J.P. (1992) Structural constraints within a trimeric transcriptional regulatory region. Constitutive and interferon-gamma-inducible expression of the HLA-DRA gene. *J Biol Chem*, 267, 23728-23734.
- Viret, C. and Janeway, C.A., Jr. (1999) MHC and T cell development. *Rev Immunogenet*, 1, 91-104.
- Voet, D., and J.G. Voet. (1990) Arachidonate metabolism: prostaglandins, prostacyclins, thromboxanes, and leukotrienes. In sons, J.W.a. (ed.), *Biochemistry*, New York, pp. 658-665.
- Wadleigh, D.J., Reddy, S.T., Kopp, E., Ghosh, S. and Herschman, H.R. (2000) Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem*, 275, 6259-6266.
- Wagner, S., Harteneck, C., Hucho, F. and Buchner, K. (2000) Analysis of the subcellular distribution of protein kinase Calpha using PKC-GFP fusion proteins. *Exp Cell Res*, 258, 204-214.
- Waldburger, J.M., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H. and Reith, W. (2001) Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med*, 194, 393-406.
- Wang, H.Q. and Smart, R.C. (1999) Overexpression of protein kinase C-alpha in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF-alpha expression but not tumor promotion. *J Cell Sci*, 112 (Pt 20), 3497-3506.

- Watson, C.A., Petzelbauer, P., Zhou, J., Pardi, R. and Bender, J.R. (1995) Contact-dependent endothelial class II HLA gene activation induced by NK cells is mediated by IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*, 154, 3222-3233.
- Weihua, X., Kolla, V. and Kalvakolanu, D.V. (1997) Interferon gamma-induced transcription of the murine ISGF3gamma (p48) gene is mediated by novel factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 103-108.
- Wen, P.Z., Warden, C., Fletcher, B.S., Kujubu, D.A., Herschman, H.R. and Luscis, A.J. (1993) Chromosomal organization of the inducible and constitutive prostaglandin synthase/cyclooxygenase genes in mouse. *Genomics*, 15, 458-460.
- Wen, Z., Zhong, Z. and Darnell, J.E., Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82, 241-250.
- Whitton, J.L. (1998) An overview of antigen presentation and its central role in the immune response. *Curr Top Microbiol Immunol*, 232, 1-13.
- Wilks, A.F., Harpur, A.G., Kurban, R.R., Ralph, S.J., Zurcher, G. and Ziemiecki, A. (1991) Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol*, 11, 2057-2065.
- Wilson, M.E. and Pearson, R.D. (1986) Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol*, 136, 4681-4688.

- Wilson, M.E. and Pearson, R.D. (1988) Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun*, 56, 363-369.
- Wojciechowski, W., DeSanctis, J., Skamene, E. and Radzioch, D. (1999) Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the *Nramp1* gene. *J Immunol*, 163, 2688-2696.
- Wolfram, M., Ilg, T., Mottram, J.C. and Overath, P. (1995) Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells specific for amastigote cysteine proteinases requires intracellular killing of the parasites. *Eur J Immunol*, 25, 1094-1100.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. and Mathison, J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-1433.
- Wright, S.D. and Silverstein, S.C. (1983) Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med*, 158, 2016-2023.
- Xie, W., D. Robertson, and D. L. Simmons. (1992) Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Drug Dev Res.*, 25, 249-265.
- Xie, W., Fletcher, B.S., Andersen, R.D. and Herschman, H.R. (1994) v-src induction of the TIS10/PGS2 prostaglandin synthase gene is mediated by an ATF/CRE transcription response element. *Mol Cell Biol*, 14, 6531-6539.

- Xu, B., Bhattacharjee, A., Roy, B., Xu, H.M., Anthony, D., Frank, D.A., Feldman, G.M. and Cathcart, M.K. (2003) Interleukin-13 induction of 15-lipoxygenase gene expression requires p38 mitogen-activated protein kinase-mediated serine 727 phosphorylation of Stat1 and Stat3. *Mol Cell Biol*, 23, 3918-3928.
- Yang, Z., Wara-Aswapati, N., Chen, C., Tsukada, J. and Auron, P.E. (2000) NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether. *J Biol Chem*, 275, 21272-21277.
- Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J.N. and Yoshimura, A. (1999) The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J*, 18, 1309-1320.
- Yasukawa, H., Sasaki, A. and Yoshimura, A. (2000) Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol*, 18, 143-164.
- You, M., Yu, D.H. and Feng, G.S. (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol*, 19, 2416-2424.
- Young, H.A. (1996) Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, 16, 563-568.
- Yu, C.L., Jin, Y.J. and Burakoff, S.J. (2000) Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J Biol Chem*, 275, 599-604.
- Zhang, Q., Nowak, I., Vonderheid, E.C., Rook, A.H., Kadin, M.E., Nowell, P.C., Shaw, L.M. and Wasik, M.A. (1996) Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T

lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9148-9153.

Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C. and Chen-Kiang, S. (1995) Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science*, 267, 1990-1994.

Zhou, H. and Glimcher, L.H. (1995) Human MHC class II gene transcription directed by the carboxyl terminus of CIITA, one of the defective genes in type II MHC combined immune deficiency. *Immunity*, 2, 545-553.

Zhu, X.S., Linhoff, M.W., Li, G., Chin, K.C., Maity, S.N. and Ting, J.P. (2000) Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol Cell Biol*, 20, 6051-6061.

ANNEXE I

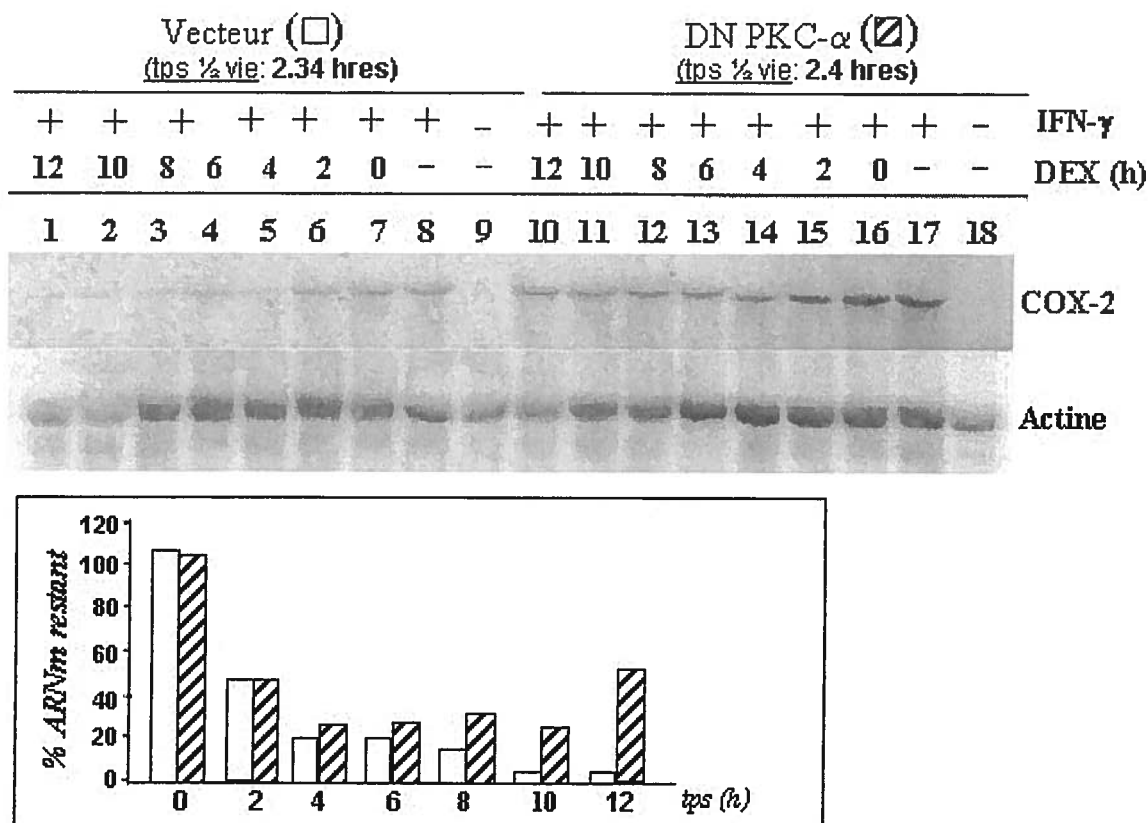


Figure 8 : La surexpression d'un mutant DN PKC- α n'affecte pas les temps de demi-vies de l'ARNm de COX-2 en réponse à l'IFN- γ .

Des macrophages RAW 264.7 naïfs ou pré-stimulés à l'IFN- γ (100 U/ml) ont été incubés 8 h en présence ou en absence d'IFN- γ (100 U/ml). Suivant un traitement au DEX (1 μ M), l'ARN a été extrait à différents temps. Les niveaux d'ARNm de COX-2 ont été quantifiés en utilisant un Phosphorimager et ensuite normalisés sur l'actine. Les résultats sont représentés dans le graphique sous forme de pourcentage d'ARNm restant (niveau d'ARNm avant ajout de DEX / niveau d'ARNm après DEX *100). ***Tps ½ vie (50% stabilité) = 2.34 hres pour le vecteur et 2.4 hres pour le mutant DN PKC- α .

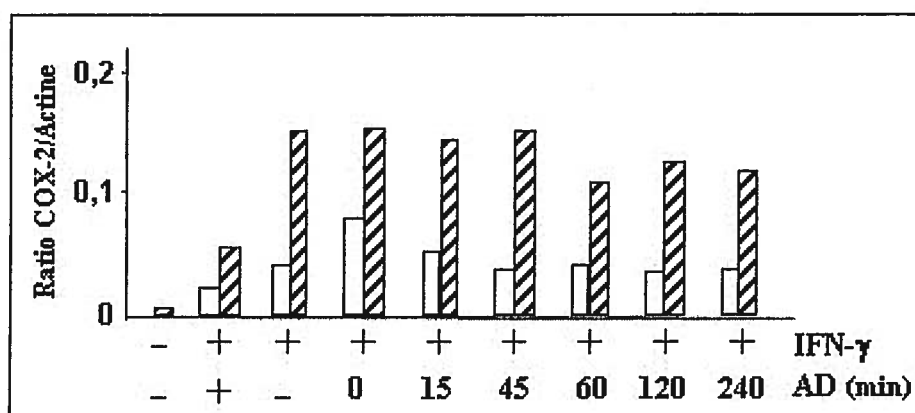
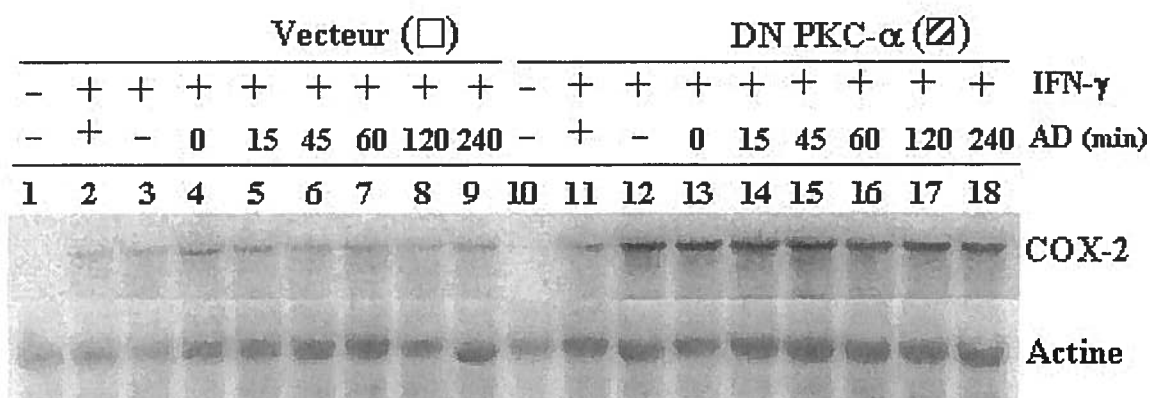


Figure 9 : PKC- α n'est pas impliquée dans la stabilité de l'ARNm de COX-2 en réponse à l'IFN- γ .

Des macrophages RAW 264.7 (Vecteur, Clone C2) naïfs ou pré-stimulés à l'IFN- γ (100 U/ml) ont été incubés 8 h en présence ou en absence d'IFN- γ (100 U/ml). Suivant un traitement à l'AD (10 μ g/ml), l'ARN a été extrait à différents temps. La stabilité de l'ARN a été analysée par *Northern Blot*. Les niveaux d'ARN ont été quantifiés en utilisant un Phosphorimager et les résultats présentés dans le graphique représentent le rapport entre les quantités d'ARN de COX-2 et d'actine.

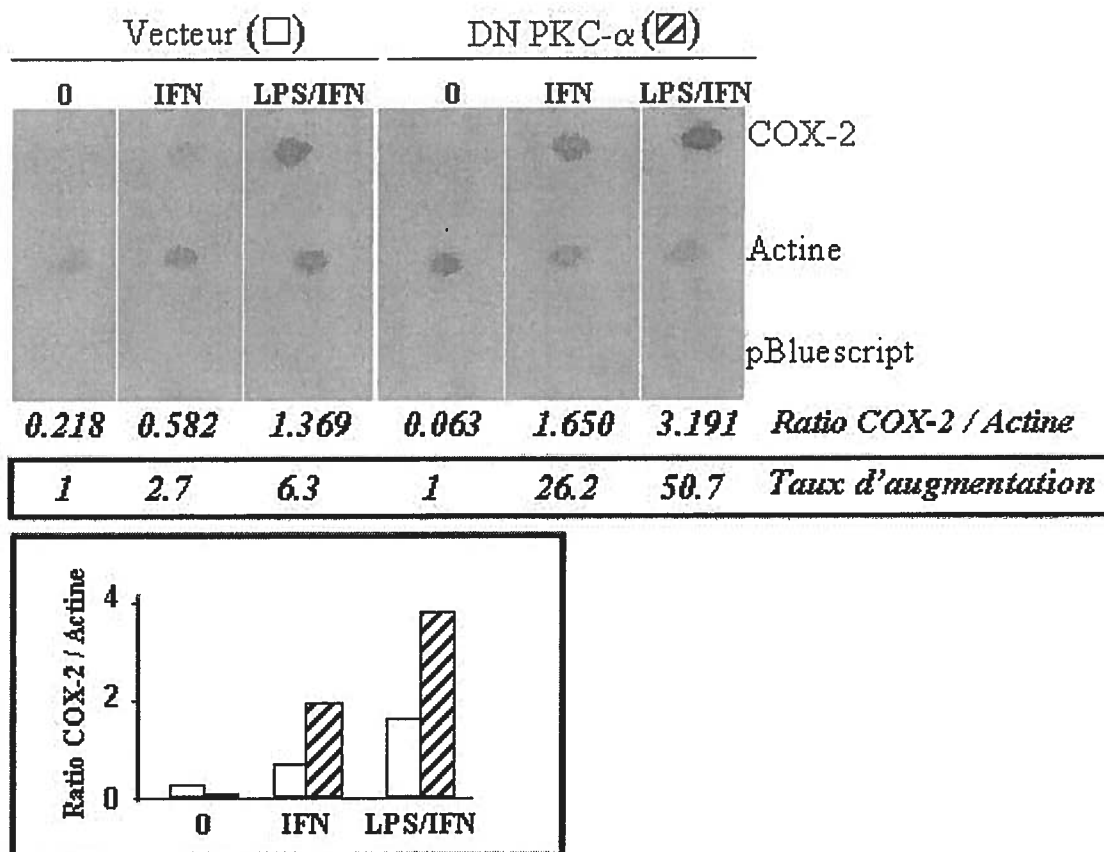


Figure 10 : PKC- α module la transcription de COX-2 induite par l'IFN- γ . Des macrophages RAW 264.7 (Vecteur, Clone C2) ont été incubés 8 h en absence ou en présence d'IFN- γ (100 U/ml) et d'une combinaison de LPS (100 ng/ml) et d'IFN- γ (100 U/ml). Les noyaux ont été isolés et suite à une étape de transcription *in vitro*, les ARNs nucléaires marqués au ^{32}P (5×10^4 CPM) ont été hybridés à 5 μg d'ADNc correspondant respectivement à COX-2 et l'actine. L'ADN du plasmide pBluecript est utilisé pour détecter le bruit de fond non-spécifique. La quantification a été fait en utilisant un Phosphorimager et les résultats présentés dans le graphique représentent le rapport des valeurs densitométriques entre COX-2 et l'actine. Ratio COX-2/Actine = niveau relatif de transcription.

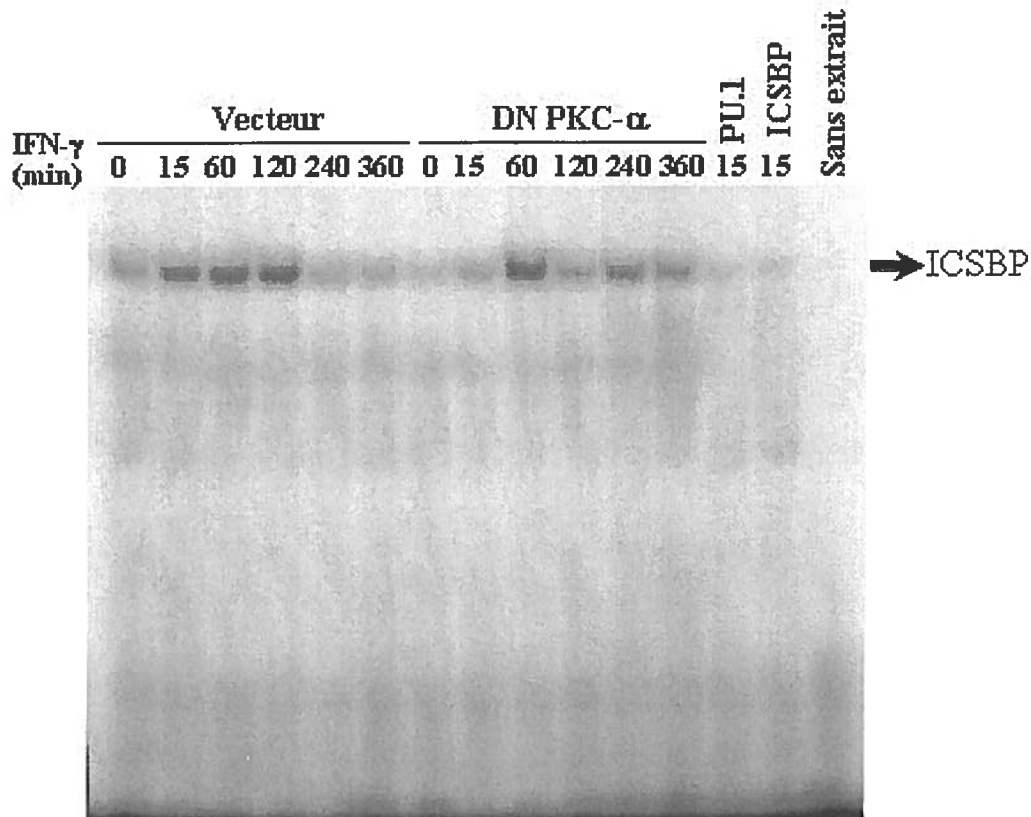


Figure 11 : La surexpression d'un mutant DN PKC- α n'affecte pas la translocation nucléaire ni la liaison à l'ADN du facteur de transcription ICSBP en réponse à l'IFN- γ .

Des macrophages RAW 264.7 (Vecteur, clone C2) ont été incubés en absence ou en présence d'IFN- γ (100 U/ml) pour différents temps. Les extraits nucléaires ont ensuite été préparés et la translocation nucléaire ainsi que la liaison à l'ADN d'ICSBP ont été analysés par gel électrophorétique de mobilité à décalage (Gel shift). Au niveau des puits 13 et 14, un excès de sonde correspondant aux séquences de liaison des facteurs de transcription PU.1 et ICSBP a été ajouté aux échantillons provenant des cellules témoins (Vecteur) stimulées 15 min à l'IFN- γ (100 U/ml).

ANNEXE II

Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages: Modulation by Protein Kinase C- α ¹

Mélanie Giroux and Albert Descoteaux²

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible enzyme responsible for high levels of PG production during inflammation and immune responses. Previous studies with pharmacological inhibitors suggested a role for protein kinase C (PKC) in PG production possibly by regulating COX-2 expression. In this study, we addressed the role of PKC- α in the modulation of COX-2 expression and PGE₂ synthesis by the overexpressing of a dominant-negative (DN) mutant of this isoenzyme in the mouse macrophage cell line RAW 264.7. We investigated the effect of various stimuli on COX-2 expression, namely, LPS, IFN- γ , and the intracellular parasite *Leishmania donovani*. Whereas LPS-induced COX-2 mRNA and protein expression were down-regulated in DN PKC- α -overexpressing clones, IFN- γ -induced COX-2 expression was up-regulated in DN PKC- α -overexpressing clones with respect to normal RAW 264.7 cells. Measurements of PGE₂ levels revealed a strong correlation between PGE₂ secretion and IFN- γ -induced COX-2 mRNA and protein levels in DN PKC- α -overexpressing clones. Taken together, these results suggest a role for PKC- α in the modulation of LPS- and IFN- γ -induced COX-2 expression, as well as in IFN- γ -induced PGE₂ secretion. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 3985–3991.

Prostaglandins are important mediators of inflammatory and immune responses. Their secretion is induced by various stimuli including LPS, phorbol esters, cytokines, and phagocytosis (1). PGE₂ is one of the main PGs secreted in large quantities by macrophages and acts as an autocrine regulator of their activity (2, 3). Cyclooxygenases (COX),³ the key enzymes responsible for the conversion of arachidonic acid to PGs, exist in two isoforms with different physiological functions. Whereas COX-1 is constitutively expressed in most cell types and is responsible for regulating normal physiological functions (3, 4), COX-2 is inducible in cells playing a role in inflammation such as macrophages, fibroblasts, and endothelial cells (5, 6). In human and murine macrophages, COX-2 expression is induced by LPS, IL-1, and phorbol esters (6–9). Studies with the murine macrophage cell line RAW 264.7 indicated that accumulation of COX-2 mRNA can be induced by a combination of IFN- γ and LPS but not by IFN- γ alone (10). In addition to soluble mediators, pathogens such as the intracellular parasite *Leishmania donovani* can increase synthesis of PGE₂, possibly by inducing alterations in the COX pathway (11, 12).

Previous studies using protein kinase C (PKC) inhibitors and activators suggested that PGE₂ synthesis requires the activation of PKC in the mouse macrophage cell line RAW 264.7, as well as in

peritoneal macrophages (1, 13). Twelve isoenzymes of PKC, a family of protein serine/threonine kinases, have been identified so far. Differences in their structure, requirement for activity, subcellular localization, and substrate specificity suggest that in a given cell, the various PKC isoenzymes may exert specific functions. Six of them are expressed in macrophages but their respective roles in the regulation of macrophage functions are poorly understood (14, 15). Using clones of the RAW 264.7 macrophage cell line overexpressing a dominant-negative (DN) mutant of PKC- α (DN PKC- α), we recently reported that PKC- α regulates selective LPS-induced responses, including inducible NO synthase (iNOS) and IL-1 α expression (16). This study led us to propose a role for PKC- α in the regulation of inflammatory responses. Previous studies based on selective depletion of PKC isoenzymes and their differential sensitivities to pharmacological inhibitors led to the suggestion that PKC- α regulates zymosan-stimulated arachidonic acid metabolism and eicosanoid synthesis in peritoneal macrophages (17). To further investigate the role of PKC- α in the regulation of COX-2 expression and PGE₂ secretion, we used DN PKC- α -overexpressing clones of the RAW 264.7 macrophage line (16). We obtained evidence that PKC- α modulates COX-2 expression in macrophages exposed to both LPS and IFN- γ , thereby providing additional evidence that PKC- α is involved in the regulation of macrophage inflammatory responses.

Materials and Methods

Cell lines

The murine macrophage cell line RAW 264.7 transfected with the expression vector pCIN-4, and the DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 (16) were cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in DMEM with glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada), containing 10% heat-inactivated FBS (HyClone, Logan, UT), 10 mM HEPES pH 7.3, and antibiotics supplemented with 200 μ g/ml G418 (Life Technologies).

Bone marrow-derived macrophages (BMM)

BMM were obtained as previously described (18). Briefly, bone marrow cells obtained from femurs of 6- to 8-wk-old female BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada), were freed of RBC by osmotic shock and resuspended in complete medium with 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium. After 1 day in culture (37°C, 5% CO₂), nonadherent cells were transferred into new culture dishes and then allowed to differentiate

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada

Received for publication November 17, 1999. Accepted for publication July 14, 2000.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grant MT-12933 from the Medical Research Council of Canada and from an establishment grant from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec. A.D. is a Medical Research Council Scholar.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Albert Descoteaux, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7. E-mail address: albert.descoteaux@iaf.quebec.ca

³ Abbreviations used in this paper: COX, cyclooxygenase; PKC, protein kinase C; BMM, bone marrow derived-macrophage(s); DN, dominant-negative; iNOS, inducible NO synthase; ICSP, IFN consensus sequence binding protein; L-NMMA, N^G-monomethyl-L-arginine monoacetate.

and adhere for 6 days. BMM were made quiescent by culturing them in CSF-1-free medium for 18 h before being used.

L. donovani

Promastigotes of *L. donovani* (Ethiopian strain LV9, obtained from G. Matlashewski, McGill University, Montréal, QC, Canada) were freshly derived from amastigotes isolated from the spleen of an infected hamster and were grown in at 26°C in RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 100 μ M adenine, 5 μ M hemin, 1 μ M biotin, 20 mM 2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid, pH 5.5, and antibiotics. For infections with *L. donovani*, 2.5×10^6 adherent macrophages were incubated with 2.5×10^7 parasites for 8 h.

Northern blot analyses

Total RNA preparation and Northern blot analyses were performed essentially as described previously (16, 19). The probe for murine COX-2 consisted of the 1.2-kb *EcoRI*/*ApaI* fragment from COX-2 cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-24 (5'-CCCCTTCCTGCGAAGTTTAATC-3') and AD-25 (5'-GCATCTGGACGAGGTTTTTCC-3').

Plasmids

The luciferase reporter vector (pTIS10L) containing the promoter region of the mouse COX-2 gene (20) (-963/+70 from the transcription initiation site) was provided by Harvey Herschman (University of California, Los Angeles, CA) and was used for transient transfections studies. The PKC- α expression vector (pCMV-PKC- α) was constructed by insertion of the human wild-type PKC- α cDNA (21) into the *HindIII* site of the expression vector pRcCMV (Invitrogen, San Diego, CA) and was used for overexpression analyses. The pRL-TK plasmid encoding the *Renilla* luciferase was obtained from Promega (Madison, WI).

Transient transfections

Adherent cells (2.5×10^5 /well) were transfected using GenePorter (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) with 0.25 μ g of COX-2 luciferase reporter plasmid, and either 0.65 μ g of pRcCMV (Invitrogen) or pCMV-PKC- α expression vector. All transfections included 0.1 μ g of pRL-TK (Promega) as transfection efficiency control. Cells were transfected with 250 μ l DNA/GenePorter mix for 5 h, and 1 ml of serum-free medium was added. Cells were treated 7 h later with 100 ng/ml LPS and harvested at 12 h in Reporter lysis buffer (Promega). Firefly and *Renilla* luciferase values were obtained by analyzing 20 μ l of cell extracts according to standard instructions provided in the Dual Luciferase kit (Promega) using a Lumat LB 9507 luminometer (EG & G Berthold, Nashua, NH). Statistically significant differences were identified using the unpaired Student's *t* test. Values of $p = 0.01$ were considered statistically significant.

Western blot analyses

Western blot analyses were performed as described previously (16). Anti-COX-2 mAbs were obtained from Transduction Laboratories (Lexington, KY).

PGE₂ production

PGE₂ levels in the supernatants of macrophage were measured by competitive immunoassay (EIA; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) after 8 h of incubation with different stimuli as recommended by the manufacturer. When indicated, the COX inhibitors NS398 (5 μ M) and valeryl salicylate (1 mM) (Cayman Chemicals) or the iNOS inhibitor *N*^G-monomethyl-L-arginine monoacetate (*L*-NMMA; 500 μ M) (Alexis, San Diego, CA) were used. Statistically significant differences were identified using the unpaired Student's *t* test. Values of $p = 0.01$ were considered statistically significant.

Results

Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced COX-2 expression

In macrophages, COX-2 expression is strongly induced by LPS, phorbol-ester, and several cytokines (22). To investigate the role of PKC- α in this process, we measured COX-2 mRNA accumulation and protein level expression in normal RAW 264.7 cells (containing the empty vector) and in DN PKC- α -overexpressing clones (B1 and C2; Ref. 16) after stimulation with LPS (10 and 100 ng/ml) for 8 h. In normal RAW 264.7 cells, LPS induced the expres-

sion of COX-2 mRNA accumulation and protein synthesis in a dose-dependent manner (Fig. 1, *A* and *B*, lanes 1–3). In DN PKC- α -overexpressing clones, LPS-induced COX-2 mRNA accumulation, and protein levels were significantly inhibited. Densitometric analyses revealed that in clone B1, COX-2 mRNA levels were reduced by 10- to 20-fold (Fig. 1*A*, lanes 4–6), and protein levels were reduced by ~4-fold (Fig. 1*B*, lanes 4–6) with respect to the levels observed in control cells. In clone C2, LPS-induced COX-2 mRNA levels were barely detectable (Fig. 1*A*, lanes 7–9), whereas COX-2 protein levels were reduced by ~3- to 5-fold with respect to control cells (Fig. 1*B*, lanes 7–9). Thus, similar to LPS-induced IL-1 α and iNOS expression (16), DN PKC- α overexpression strongly inhibited LPS-induced COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages.

Overexpression of PKC- α increases LPS-induced COX-2 promoter activity

The inhibition of LPS-induced COX-2 expression in DN PKC- α -overexpressing macrophages indicated that PKC- α plays a role in modulating COX-2 expression. To further demonstrate the involvement of PKC- α in the induction of COX-2 by LPS, we transiently transfected RAW 264.7 cells with a COX-2-luciferase reporter and a wild-type PKC- α expression vector. Overexpression of wild-type PKC- α had no effect on basal COX-2 promoter activity in untreated RAW 264.7 cells (Fig. 2). In contrast, PKC- α overexpression significantly increased LPS-stimulated COX-2 promoter activity by ~2-fold with respect to controls (Fig. 2, $p = 0.0001$, $n = 3$). These data are consistent with PKC- α playing a role in modulating COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages.

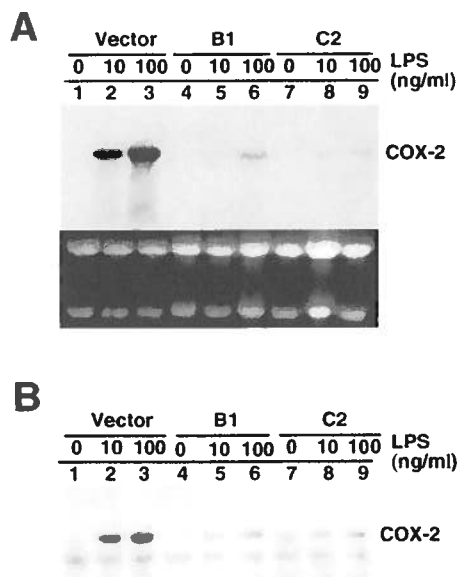


FIGURE 1. Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced COX-2 expression. Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence (lanes 1, 4, and 7) or in the presence of either 10 ng/ml (lanes 2, 5, and 8) or 100 ng/ml (lanes 3, 6, and 9) LPS for 8 h. Total RNA was extracted and Northern blot analyses was performed (*A*), and cell extracts were prepared for Western blot analyses (*B*) as described in *Materials and Methods*. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

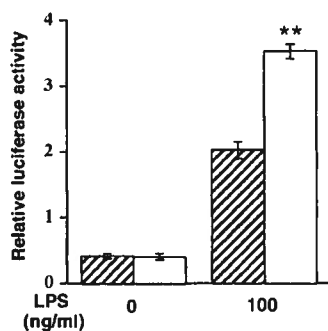


FIGURE 2. Overexpression of PKC- α increases LPS-induced COX-2 promoter activity in RAW 264.7 macrophages. Adherent RAW 264.7 cells were transiently transfected with the COX-2/Luc reporter construct and pRL-TK for 5 h along with either the control vector (▨) or the wild-type PKC- α expression vector (□). Cells were incubated for 7 h and then stimulated with 100 ng/ml LPS for 12 h. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in two separate experiments. **, $p = 0.0001$ as compared with LPS-stimulated cells transfected with control vector.

Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression following a stimulation with IFN- γ

IFN- γ is a potent regulator of macrophage function (23). In addition to inducing the expression of several genes, incubation of macrophages with IFN- γ enhances their responsiveness to LPS (10, 24). To determine whether PKC- α plays a role in the regulation of IFN- γ -induced responses, we have measured the induction of COX-2 mRNA accumulation and protein synthesis in control RAW 264.7 cells and in the DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 in response to 100 U/ml IFN- γ alone or in combination with 100 ng/ml LPS. Macrophages were primed with 100 U/ml IFN- γ for 18 h before the addition of either 100 U/ml IFN- γ or the combination of 100 U/ml IFN- γ and 100 ng/ml LPS. IFN- γ induced an important increase of COX-2 mRNA accumulation in DN PKC- α -overexpressing cells (20-fold for clone B1 and 60-fold for clone C2) (Fig. 3A, lanes 6 and 10) compared with control cells (Fig. 3A, lane 2). Similar results were obtained with the levels of COX-2 protein expression, as in clone B1 (Fig. 3B, lane 6) and in clone C2 (Fig. 3B, lane 10) COX-2 levels were increased by 2- and 4-fold, respectively, compared with the levels observed in control cells (Fig. 3B, lane 2). This significant increase in IFN- γ -induced COX-2 expression in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells suggested that PKC- α negatively modulates IFN- γ -induced COX-2 expression. When macrophages were exposed to a combination of both IFN- γ and LPS, high levels of COX-2 mRNA and protein were induced independently of DN PKC- α overexpression (Fig. 3, A and B, lanes 4, 8, and 12). Thus, DN PKC- α overexpression had little effect on the synergistic effect of LPS and IFN- γ on the induction of COX-2 mRNA accumulation and protein synthesis.

COX-2 expression following a phagocytic stimulation with *L. donovani* promastigotes

Infection with the intracellular protozoan *L. donovani* stimulates macrophages to secrete PGE₂, possibly by inducing COX-2 expression (11, 12). Thus we determined whether PKC- α was involved in this process by comparing the induction of COX-2 mRNA accumulation and protein synthesis in normal RAW 264.7 cells and in DN PKC- α -overexpressing clones following phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. For priming experiments,

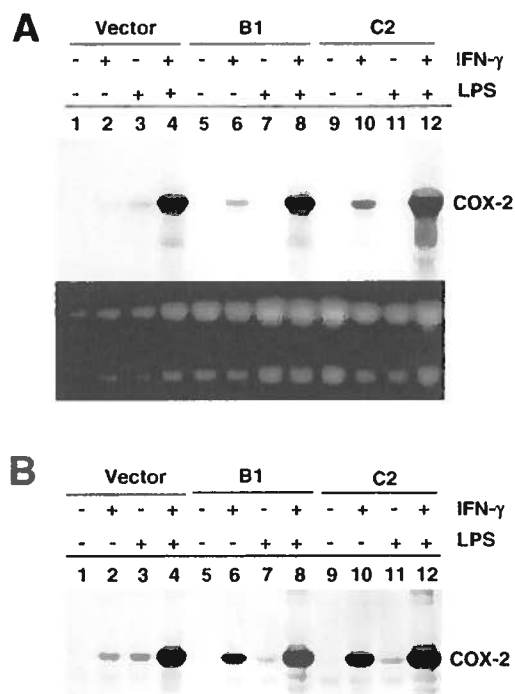


FIGURE 3. Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression induced by LPS and IFN- γ . Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence (lanes 1, 5, and 9) or in the presence of either 100 U/ml IFN- γ (lanes 2, 6, and 10), 100 ng/ml LPS (lanes 3, 7, and 11), or a combination of both (lanes 4, 8, and 12) for 8 h. For priming experiments, cells were first incubated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h followed by additional stimulation with IFN- γ , or IFN- γ and LPS. Total RNA was extracted, Northern blot analysis was performed (A), and cell extracts were prepared for Western blot analyses (B) as described in *Materials and Methods*. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

cells were incubated for 18 h with 100 U/ml IFN- γ before the addition of either 100 U/ml IFN- γ alone or in combination with *L. donovani* promastigotes for an additional 8 h. Phagocytic stimulation with *L. donovani* promastigotes failed to induce COX-2 mRNA accumulation as well as protein synthesis in control RAW 264.7 macrophages (Fig. 4, A and B, lane 3) and in the two DN PKC- α -overexpressing clones (Fig. 4, A and B, lane 7 for clone B1 and lane 11 for clone C2). Priming with IFN- γ had no effect on the induction of COX-2 expression following phagocytosis of *L. donovani*, as COX-2 mRNA and protein levels induced by IFN- γ alone (Fig. 4, A and B, lane 2 for control cells, lane 6 for clone B1, and lane 10 for clone C2) were similar to those induced by the combination of IFN- γ and *L. donovani* (Fig. 4, A and B, lane 4 for control cells, lane 8 for clone B1, and lane 12 for clone C2). In naive BMM, *L. donovani* evaded the induction of COX-2 expression (Fig. 5, A and B, lane 5), whereas priming with IFN- γ led to the induction of COX-2 mRNA and protein synthesis by *L. donovani* promastigotes in BMM (Fig. 5, A and B, lane 6).

Effect of DN PKC- α overexpression on PGE₂ secretion

We compared the ability of control RAW 264.7 cells and clones B1 and C2 to secrete PGE₂ in response to either LPS (10 or 100 ng/ml), 100 U/ml IFN- γ , or *L. donovani*. As shown in Fig. 6A, in the presence of 10 ng/ml (▨) and 100 ng/ml (■) LPS, control RAW 264.7 cells as well as DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 secreted PGE₂ in a dose-dependent manner. In contrast to

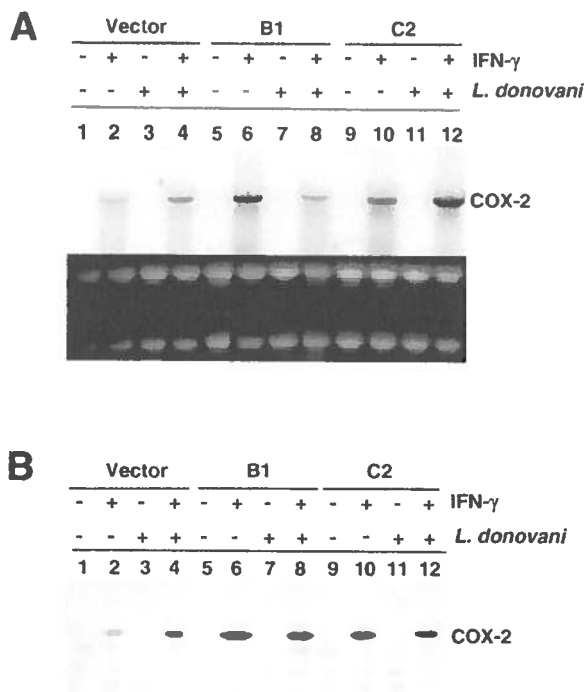


FIGURE 4. Effect of DN PKC- α overexpression on COX-2 expression induced by *L. donovani* promastigotes. Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence (lanes 1, 5, and 9) or in the presence of different stimuli, namely, 100 U/ml IFN- γ (lanes 2, 6, and 10), *L. donovani* promastigotes (lanes 3, 7, and 11), or a combination of both (lanes 4, 8, and 12) for 8 h. For priming experiments, cells were first incubated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h followed by additional stimulation with *L. donovani* and IFN- γ , or IFN- γ alone. Total RNA was extracted, Northern blot analysis was performed (A), and cell extracts were prepared for Western blot analyses (B) as described in *Materials and Methods*. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

COX-2 mRNA and protein levels, overexpression of DN PKC- α did not affect LPS-induced PGE₂ secretion by RAW 264.7 cells. (For 10 ng/ml LPS, $p = 0.15$ for B1 vs control cells, and $p = 0.02$ for C2 vs control cells, $n = 3$. For 100 ng/ml LPS, $p = 0.103$ for B1 vs control cells, and $p = 0.07$ for C2 vs control cells, $n = 3$.) Data obtained with the specific COX-2 inhibitor NS-398 (5 μ M) (25) confirmed that COX-2 activation is the major pathway responsible for LPS-stimulated PGE₂ secretion (Table I). The observation that valeryl salicylate, a COX-1 inhibitor (26), reduced LPS-induced PGE₂ production by 50% suggested a role for COX-1, although it is possible that COX-2 activity was also inhibited at the concentration used (1 mM) (Table I). As shown in Fig. 6B, IFN- γ induced the secretion of minimal PGE₂ levels in control RAW 264.7 cells, whereas DN PKC- α -overexpression increased IFN- γ -induced PGE₂ secretion by 35-fold by clone B1 ($p = 0.005$, $n = 3$) and 70-fold by clone C2 ($p = 0.01$, $n = 3$). Collectively, these results indicated that DN PKC- α overexpression had no effect on LPS-induced PGE₂ secretion but strongly up-regulated IFN- γ -induced PGE₂ secretion. When macrophages were exposed to a combination of IFN- γ and LPS, control RAW 264.7 cells and the DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 secreted similar PGE₂ levels ($p = 0.04$ for B1 vs control cells, and $p = 0.795$ for C2 vs control cells, $n = 3$) (Fig. 6C). As observed for COX-2 mRNA and protein synthesis, *L. donovani* promastigotes failed to induce PGE₂ secretion in control RAW 264.7 cells as well as in DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 (data not shown).

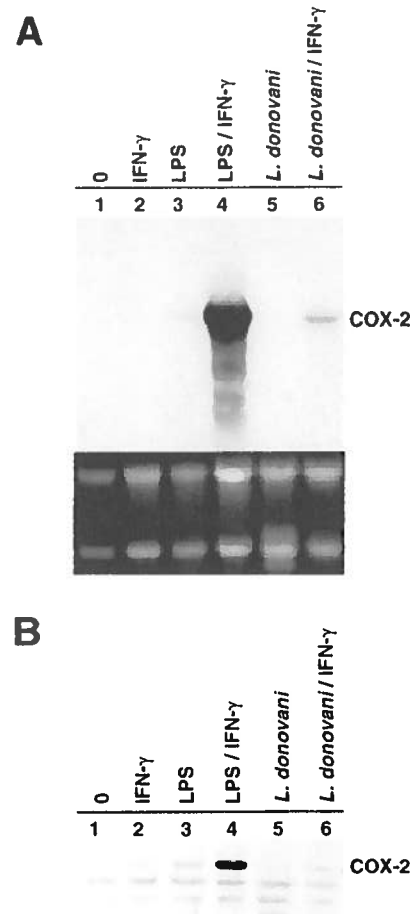


FIGURE 5. COX-2 expression in BMM. BMM were incubated in the absence (lane 1) or in the presence of different stimuli (lanes 2–6) for 8 h. For priming experiments, cells were first incubated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h followed by 100 ng/ml LPS, *L. donovani* promastigotes, or 100 U/ml IFN- γ . Total RNA was extracted, Northern blot analysis was performed (A), and cell extracts were prepared for Western blot analyses (B) as described in *Materials and Methods*. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

Discussion

PGs are important regulatory mediators for the maintenance of numerous physiological functions and are synthesized by most mammalian tissues (3, 27). In inflammatory reactions, macrophages are the main producers of large quantities of PGE₂ (10, 28). COX-2, the inducible COX isoform, has been identified in activated macrophages and constitutes the key enzyme responsible for the high production of inflammatory PGs such as PGE₂ (3, 5, 29). A role for PKC in the regulation of PG production (possibly by regulating COX-2 expression) has been suggested after treatment of macrophages with PKC inhibitors or activators (1, 13). In this study, we investigated the role of PKC- α in the regulation of COX-2 expression in macrophages. To this end, we have stably overexpressed a DN mutant of this isoenzyme in the murine macrophage cell line RAW 264.7 (16). We obtained evidence suggesting that PKC- α activity is important for the modulation of COX-2 expression in macrophages exposed to either LPS or IFN- γ .

Previous studies suggested that PKC is involved in the regulation of COX-2 expression. A role for PKC- α in the regulation of

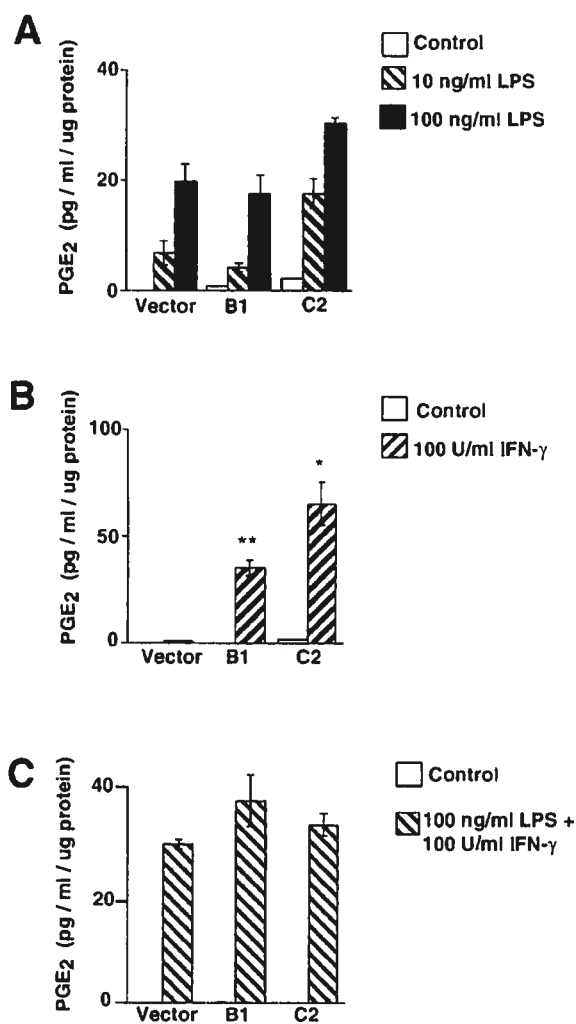


FIGURE 6. Effect of DN PKC- α on PGE₂ secretion. Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence or presence of either 10 ng/ml or 100 ng/ml LPS (A), 100 U/ml IFN- γ (B), or a combination of 100 U/ml IFN- γ and 100 ng/ml LPS (C) for 8 h. Cells stimulated with IFN- γ were first incubated for 18 h with 100 U/ml IFN- γ . Levels of PGE₂ in cell supernatants were determined by ELISA as described in *Materials and Methods*. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ as compared with IFN- γ -treated control cells.

zymosan-induced PGE₂ secretion in mouse peritoneal macrophages has been previously proposed based on the selective down-regulation of PKC isoenzymes and on their differential sensitivities to pharmacological inhibitors (17). Recently, it has been reported that overexpression of wild-type PKC- α in mouse epidermis increases phorbol esters-induced expression of specific proinflammatory mediators, including COX-2, suggesting that PKC- α plays a role in cutaneous inflammation (30). Our data obtained with DN PKC- α -overexpressing clones suggest that this isoenzyme is required for COX-2 expression in the RAW 264.7 macrophage cell line. However, the possibility exists that stable overexpression of the DN PKC- α might have affected basal PKC- α activity levels, thereby altering the maintenance of normal cellular functions. A possible consequence of such alterations could be the loss of regulator(s), which could potentially affect signal transduction pathways leading to COX-2 expression. Accordingly, PKC- α would play a secondary role in LPS-induced COX-2 expression. In con-

trast, our observation that overexpression of wild-type PKC- α increases LPS-induced COX-2 promoter activity is not consistent with this possibility and argues in favor of a direct role for PKC- α (Fig. 2). Thus, our observations further support a role for PKC- α in the modulation of COX-2 expression in macrophages, and hence in the regulation of inflammatory responses.

The mechanism by which PKC- α modulates COX-2 expression remains obscure. One possibility is that PKC- α is required for the activation of specific transcription factors. In this regard, few studies have addressed the identity of the transcription factor(s) regulating COX-2 expression (31–33). The ubiquitous transcription factor NF- κ B, one of the main mediators of LPS responses (34), binds to regulatory sequences within the promoter region (–403 to –395 bp) of both the human and mouse COX-2 genes to regulate COX-2 expression (35). Because LPS-induced NF- κ B activation takes place normally in DN PKC- α -overexpressing macrophages (16), it is likely that transcription factor(s) other than NF- κ B and required for LPS-induced COX-2 expression may be defective in our DN PKC- α overexpressing clones. Consensus binding sites for NF-IL6 have been identified within the COX-2 promoter region, and recent evidence indicated that this regulatory sequence is responsible for the induction of human COX-2 by LPS, through NF-IL6 β (C/EBP δ) (33). More recently, it has been established that although that NF- κ B is not required, NF-IL6 is essential for LPS-induced COX-2 gene expression in RAW 264.7 cells (36). Further studies will be required to examine whether a defective activation of NF-IL6 could account for the inhibition of LPS-induced COX-2 expression in the DN PKC- α overexpressing RAW 264.7 macrophages. In this regard, preliminary evidence indicated that DN PKC- α overexpression inhibited LPS-induced NF-IL6 activation in RAW 264.7 cells (F. Chano and A. Descoteaux, unpublished data).

IFN- γ is a pleiotropic cytokine that plays a key role in modulating immune and inflammatory responses (37) and regulates several macrophage functions (38). Previous studies in human macrophages demonstrated that IFN- γ priming is required for the induction of COX-2 expression following stimulation with either IFN- γ or TNF- α . Moreover, IFN- γ , in combination with either LPS or TNF- α , induced a synergistic increase in the accumulation of COX-2 mRNA (24). However, this synergistic effect is not universal, as IFN- γ priming down-regulated COX-2 gene transcription in response to IL-1 β but not to LPS in human macrophages (6). Despite these observations, no data exist on the regulation of COX-2 expression by PKC following stimulation with IFN- γ . In contrast to LPS-induced COX-2 expression, we found that levels of COX-2 mRNA were significantly enhanced in DN PKC- α -overexpressing macrophages following a stimulation with IFN- γ . These data suggest that PKC- α negatively modulates COX-2 expression in response to IFN- γ . Two possible mechanisms may account for these results. First, overexpression of DN PKC- α influences the transcriptional activity of the COX-2 promoter, possibly by regulating the activation of IFN- γ -induced transcription factor(s). IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), which is primarily expressed in cells of the macrophage and lymphocytic lineages, is a member of the IFN regulatory factor family that binds to a DNA sequence, known as the IFN-stimulated response element (ISRE), which mediates IFN- γ responsiveness for several genes (39, 40). ICSBP mRNA levels become elevated in response to IFN- γ , but not IFN- α/β , in macrophage cell lines and in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages (41). Thus, the selectivity of ICSBP for macrophages and other cells of the immune system, coupled with its strong inducibility and long half-life in macrophages, suggests that it could play a critical role in the down-regulation of macrophage activity after activation by IFN- γ (42).

Table 1. Effect of COX and iNOS inhibitors on LPS-induced PGE₂ secretion in RAW 264.7 macrophages^a

Inhibitors	PGE ₂ (pg/ml/ μ g protein) ^b			
	Vector		Clone C2	
	Control	LPS	Control	LPS
None	0.07 \pm 0.00	12.89 \pm 0.91	0.09 \pm 0.04	13.58 \pm 3.20
NS-398	0.13 \pm 0.06	0.08 \pm 0.04	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.04
Valeryl salicylate	0.12 \pm 0.01	7.61 \pm 1.63	0.16 \pm 0.07	6.12 \pm 0.83
L-NMMA	0.12 \pm 0.05	13.20 \pm 1.34	0.15 \pm 0.05	14.19 \pm 2.12

^a Macrophages (2.5×10^5 per well) were incubated for 15 min in the absence or presence of either NS-398 (5 μ M), valeryl salicylate (1 mM), or L-NMMA (500 μ M) prior to the addition of 100 ng/ml LPS. PGE₂ levels in the supernatants were measured after 8 h as described in *Materials and Methods*.

^b Results are expressed in picograms per milliliter PGE₂ produced per microgram total protein. The values represent the mean \pm SD of one experiment performed in triplicate samples. Similar results were obtained in a separate experiment.

Recent studies provided evidence that ICSBP can selectively suppress the expression of IFN-responsive genes (40). Furthermore, induction of ICSBP mRNA by IFN- γ was found previously to be inhibited by PKC inhibitors (41). Considering these observations, it will be of interest to verify the role of ICSBP in IFN- γ -induced COX-2 expression in DN PKC- α overexpressing RAW 264.7 cells in response to IFN- γ . Second, the steady-state levels of COX-2 transcripts are the result of a balance between the rate of gene transcription and the rate of degradation of the mRNA produced. The 3' untranslated region of COX-2 mRNA contains conserved AUUA repeats also found in other short-lived mRNA species, such as GM-CSF mRNA (20, 43), that are important in determining mRNA stability and translation (44, 45). Whether PKC- α activity negatively regulates the binding of putative cytosolic factors to the 3' untranslated region of the COX-2 transcripts, and hence influences COX-2 mRNA stability in IFN- γ -stimulated macrophages, is an hypothesis that will deserve further attention.

L. donovani is an obligate intracellular protozoan that resides within mononuclear phagocytes of infected mammals (46). A previous study demonstrated that infection of murine peritoneal macrophages with *L. donovani* induced specific alterations in COX and lipoyxygenase pathways. This response involved selective increase of some metabolites, such as PGE₂ (11). Another study in spleen cells indicated an ex vivo evidence for increased COX activity (12). Because LPS- and IFN- γ -induced COX-2 expression are modulated by PKC- α it was of interest to determine whether DN PKC- α overexpression would influence COX-2 expression during phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. However, we failed to detect COX-2 expression in RAW 264.7 cells exposed to *L. donovani* promastigotes. In contrast to RAW 264.7 cells, IFN- γ treatment of BMM before infection with *L. donovani* promastigotes allowed the induction of COX-2 expression.

Whereas COX-2 mRNA and protein synthesis were inhibited, LPS-induced PGE₂ secretion was normal in DN PKC- α -overexpressing macrophages. A recent study reported that secretion of NO attenuates PGE₂ production in response to LPS in RAW 264.7 macrophages (47). Moreover, it was shown that NO suppresses the activity and expression of COX-2 mRNA in LPS-stimulated rat peritoneal macrophages (48). However, data obtained with the iNOS inhibitor L-NMMA (Table 1) ruled out the possibility that our data are related to the low levels of NO secreted by LPS-stimulated DN PKC- α -overexpressing clones (16). In contrast, PGE₂ secretion was increased in DN PKC- α -overexpressing clones compared with control RAW 264.7 cells in response to IFN- γ .

In summary, we have provided evidence suggesting a role for PKC- α in the modulation of COX-2 expression in macrophages. Further knowledge of the mechanism that regulates COX-2 ex-

pression may potentially lead to the development of novel anti-inflammatory therapies.

Acknowledgments

We thank K. Chadee for critical comments and helpful discussions, J. Giroux for helping with calculations, and H. R. Herschman for the COX-2-luciferase reporter construct pTIS10L.

References

- Burch, R. M. 1987. Protein kinase C mediates endotoxin and zymosan-induced prostaglandin synthesis. *Eur. J. Pharmacol.* 142:431.
- Russell, S. W., and J. L. Pace. 1984. Both the kind and magnitude of stimulus are important in overcoming the negative regulation of macrophage activation by PGE₂. *J. Leukocyte Biol.* 35:291.
- Dubois, R. N., S. B. Abramson, L. Crofford, R. A. Gupta, L. S. Simon, L. B. Van De Putte, and P. E. Lipsky. 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12:1063.
- Langenbach, R., S. G. Morham, H. F. Tian, C. D. Loftin, B. I. Ghanayem, P. C. Chulada, J. F. Mahler, C. A. Lee, E. H. Goulding, and K. D. Kluckman. 1995. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83:483.
- Morham, S. G., R. Langenbach, C. D. Loftin, H. F. Tian, N. Vouloumanos, J. C. Jettette, J. F. Mahler, K. D. Kluckman, A. Ledford, and C. A. Lee. 1995. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83:473.
- Barrios-Rodiles, M., and K. Chadee. 1998. Novel regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production by IFN- γ in human macrophages. *J. Immunol.* 161:2441.
- Lee, S. H., E. Soyoola, P. Chanmugam, S. Hart, W. Sun, H. Zhong, S. Liou, D. Simmons, and D. Hwang. 1992. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 267:25934.
- Bachwich, P. R., S. W. Chensue, J. W. Larrick, and S. L. Kunkel. 1986. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E₂ production in resting macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136:94.
- Hla, T., and K. Neilson. 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7384.
- Riese, J., T. Hoff, A. Nordhoff, D. L. DeWitt, K. Resch, and V. Kaever. 1994. Transient expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 during mouse macrophage activation. *J. Leukocyte Biol.* 55:476.
- Reiner, N. E., and C. J. Malemud. 1985. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoyxygenase pathways. *J. Immunol.* 134:556.
- Reiner, N. E., and C. J. Malemud. 1984. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (*Donovani*): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoyxygenase activity in spleen cells. *Cell. Immunol.* 88:501.
- Pfannkuche, H. J., V. Kaever, and K. Resch. 1986. A possible role of protein kinase C in regulating prostaglandin synthesis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139:604.
- Newton, A. C. 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270:28495.
- Blobe, G. C., S. Stribling, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun. 1996. Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv.* 27:213.
- St-Denis, A., F. Chano, P. Tremblay, Y. St-Pierre, and A. Descoteaux. 1998. Protein kinase C- α modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 273:32787.
- Huwiler, A., and J. Pfeilschifter. 1993. A role for protein kinase C- α in zymosan-stimulated eicosanoid synthesis in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Biochem.* 217:69.
- Descoteaux, A., and G. Matlashewski. 1989. *c-fos* and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 9:5223.

19. Descoteaux, A., and G. Matlashewski. 1990. Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 145:846.
20. Fletcher, B. S., D. A. Kujubu, D. M. Perrin, and H. R. Herschman. 1992. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J. Biol. Chem.* 267:4338.
21. Finkenzeller, G., D. Marme, and H. Hug. 1990. Sequence of human protein kinase C α . *Nucleic Acids Res.* 18:2183.
22. Smith, W. L., R. M. Garavito, and D. L. DeWitt. 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271:33157.
23. Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67:227.
24. Arias-Negrete, S., K. Keller, and K. Chadee. 1995. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:582.
25. Futaki, N., I. Arai, Y. Hamasaka, S. Takahashi, S. Higuchi, and S. Otomo. 1993. Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 45:753.
26. Davidson, M. E., and R. J. Lang. 2000. Effects of selective inhibitors of cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) on the spontaneous myogenic contractions in the upper urinary tract of the guinea-pig and rat. *Br. J. Pharmacol.* 129:661.
27. Williams, J. A., and E. Shacter. 1997. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E₂: distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 272:25693.
28. Phipps, R. P., S. H. Stein, and R. L. Roper. 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol. Today* 12:349.
29. Pennisi, E. 1998. Building a better aspirin. *Science* 280:1191.
30. Wang, H. Q., and R. C. Smart. 1999. Overexpression of protein kinase C- α in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF- α expression but not tumor promotion. *J. Cell Sci.* 112:3497.
31. Bauer, M. K., K. Lieb, K. Schulze-Osthoff, M. Berger, P. J. Gebicke-Haerter, J. Bauer, and B. L. Fiebich. 1997. Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur. J. Biochem.* 243:726.
32. D'Acquisto, F., T. Iuvone, L. Rombola, L. Sautebin, M. Di Rosa, and R. Carnuccio. 1997. Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett.* 418:175.
33. Kim, Y., and S. M. Fischer. 1998. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells: regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J. Biol. Chem.* 273:27686.
34. Sweet, M. J., and D. A. Hume. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 60:8.
35. Yamamoto, K., T. Arakawa, N. Ueda, and S. Yamamoto. 1995. Transcriptional roles of nuclear factor κ B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor α -dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 270:31315.
36. Wadleigh D. J., S. T. Reddy, E. Kopp, S. Ghosh, and H. R. Herschman. 2000. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* 275:6259.
37. Young, H. A., and K. J. Hardy. 1995. Role of interferon- γ in immune cell regulation. *J. Leukocyte Biol.* 58:373.
38. Adams, D. O., and T. A. Hamilton. 1987. Molecular transductional mechanisms by which IFN γ and other signals regulate macrophage development. *Immunol. Rev.* 97:5.
39. Friedman, R. L., and G. R. Stark. 1985. α -Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314:637.
40. Kantakamalaku, W., A. D. Politis, S. Marecki, T. Sullivan, K. Ozato, M. J. Fenton, and S. N. Vogel. 1999. Regulation of IFN consensus sequence binding protein expression in murine macrophages. *J. Immunol.* 162:7417.
41. Politis, A. D., J. Sivo, P. H. Driggers, K. Ozato, and S. N. Vogel. 1992. Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine peritoneal macrophages. Induction by IFN- γ and down-regulation by IFN- α , dexamethasone, and protein kinase inhibitors. *J. Immunol.* 148:801.
42. Politis, A. D., K. Ozato, J. E. Coligan, and S. N. Vogel. 1994. Regulation of IFN- γ -induced nuclear expression of IFN consensus sequence binding protein in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 152:2270.
43. Shaw, G., and R. Kamen. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46:659.
44. Hel, Z., S. Di Marco, and D. Radzioch. 1998. Characterization of the RNA binding proteins forming complexes with a novel putative regulatory region in the 3'-UTR of TNF- α mRNA. *Nucleic Acids Res.* 26:2803.
45. Gueydan, C., L. Houzet, A. Marchant, A. Sels, G. Huez, and V. Krays. 1996. Engagement of tumor necrosis factor mRNA by an endotoxin-inducible cytoplasmic protein. *Mol. Med.* 2:479.
46. Liew, F. Y., and C. A. O'Donnell. 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 32:161.
47. Patel, R., M. G. Attur, M. Dave, S. B. Abramson, and A. R. Amin. 1999. Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E₂ production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J. Immunol.* 162:4191.
48. Habib, A., C. Bernard, M. Lebre, C. Creminon, B. Esposito, A. Tedgui, and J. Maclof. 1997. Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 158:3845.

CORRECTIONS

Laurent Belocil, Martine Tomkowiak, Georgi Angelov, Thierry Walzer, Patrice Dubois, and Jacqueline Marvel. In Vivo Impact of CpG1826 Oligodeoxynucleotide on CD8 T Cell Primary Responses and Survival. *The Journal of Immunology* 2003;171:2995–3002.

In *Materials and Methods*, in the first sentence under the heading *Vaccination protocol*, an extra T was added to the 5' end of the CpG1826 sequence. The correct sequence is 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3'. The authors wish to underline that CpG1826 has a phosphorothioate backbone.

Also in this section, in the second sentence under the heading *CFSE labeling of F5 TCR transgenic cells and adoptive transfers*, there is a mistake in the CFSE concentration. For adoptive transfer, the CFSE concentration used is 7.5 μM (instead of 0.75 μM). Under the heading *In vivo cytotoxic assays*, in the fifth sentence, CFSE concentrations for target cells are 7.5 μM (pulsed B10) and 0.75 μM (non-pulsed B10), and in the seventh sentence when three targets are used: 7.5 μM (pulsed B10), 0.94 μM (pulsed B6-Lpr) and 0.14 μM (non-pulsed B10).

Mélanie Giroux, Manuel Schmidt, and Albert Descoteaux. IFN- γ -Induced MHC Class II Expression: Transactivation of Class II Transactivator Promoter IV by IFN Regulatory Factor-1 is Regulated by Protein Kinase C- α . *The Journal of Immunology* 2003;171:4187–4194.

In *Results*, the legends for Figures 2 and 3 are inverted. The legend with Figure 2 should have been published with the image for Figure 3, and vice versa.

Janet A. Willment, Hsi-Hsen Lin, Delyth M. Reid, Philip R. Taylor, David L. Williams, Simon Y. C. Wong, Siamon Gordon, and Gordon D. Brown. Dectin-1 Expression and Function Are Enhanced on Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology* 2003;171:4569–4573.

The second author's first name was misspelled. The correct spelling is Hsi-Hsien.

IFN- γ -Induced MHC Class II Expression: Transactivation of Class II Transactivator Promoter IV by IFN Regulatory Factor-1 is Regulated by Protein Kinase C- α ¹

Mélanie Giroux,* Manuel Schmidt,[†] and Albert Descoteaux^{2,*}

Previous studies based on pharmacological evidence suggested a requirement for protein kinase C (PKC) activity in the regulation of IFN- γ -induced MHC class II (MHC-II) expression. In the present study, we investigated the molecular mechanisms by which PKC- α modulates IFN- γ -induced MHC-II expression in the mouse macrophage cell line RAW 264.7. Overexpression of a dominant-negative (DN) mutant of PKC- α inhibited the expression of IFN- γ -induced MHC-II but had no effect on IFN- γ -induced STAT1 nuclear translocation and DNA binding activity, as well as on the expression of inducible NO synthase, IFN consensus sequence binding protein, MHC class I, IFN regulatory factor (IRF)-1, and IFN- γ -inducible protein-10. Further analysis showed that IFN- γ -induced expression of the MHC class II transactivator (CIITA), a transcriptional coactivator essential for MHC-II expression, was inhibited in DN PKC- α -overexpressing cells. Studies with reporter constructs containing the promoter IV region of CIITA revealed that overexpression of a constitutively active mutant of PKC- α enhanced IRF-1, but not IRF-2, transcriptional activity. Furthermore, characterization of IRF-1 from both normal and DN PKC- α -overexpressing cells revealed differences in IRF-1 posttranslational modifications. Collectively, our data suggest a novel regulatory mechanism for IFN- γ -induced MHC-II expression, whereby PKC regulates CIITA expression by selectively modulating the transcriptional activity of IRF-1. *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 4187–4194.

Major histocompatibility complex class II (MHC-II)³ molecules play a pivotal role in the induction and regulation of immune responses by virtue of their ability to present peptides derived mainly from processed extracellular Ags to CD4⁺ Th lymphocytes (1, 2). Although constitutively present on professional APCs (monocytes/macrophages, B cells, and dendritic cells), MHC-II expression can be induced in most cell types and tissues by IFN- γ (1, 3, 4).

The regulation of both constitutive and IFN- γ -inducible MHC-II expression occurs primarily at the transcriptional level. The signaling cascade leading to *MHC-II* gene expression in response to IFN- γ is initiated by the activation of the protein tyrosine kinases JAK1 and JAK2 and the subsequent tyrosine phosphorylation and dimerization of STAT1. Then, STAT1 dimers translocate to the nucleus where they bind to IFN- γ -activated sequence

(GAS) elements present in the promoters of IFN- γ -responsive genes (5). Such genes include the transcription factor IFN regulatory factor (IRF)-1 and the transcriptional coactivator class II transactivator (CIITA). IRF-1, which is strongly inducible by IFN- γ , binds promoter sequences known as IFN-stimulated responsive element (ISRE) (6), and is essential for CIITA induction by IFN- γ (7). CIITA is a non-DNA binding transcriptional coactivator essential for both constitutive and IFN- γ -inducible MHC-II expression (8, 9). *CIITA* gene expression is controlled by the alternative usage of three distinct promoters: constitutive expression in dendritic cells and B lymphocytes by promoters I and III, respectively, and IFN- γ -inducible expression in other cell types mainly by promoter IV (10). However, a recent study revealed that, in macrophages, both type I and type IV CIITA are responsive to IFN- γ (11). Although the regulation of type I CIITA remains to be elucidated, IFN- γ inducibility of type IV CIITA is dependent mainly upon an ISRE, a GAS, and an adjacent E-box, which bind the transcription factors IRF-1, STAT1, and upstream stimulating factor-1, respectively (12).

Previous studies using protein kinase C (PKC) inhibitors suggested that IFN- γ -induced MHC-II expression requires the activation of PKC in macrophages and astrocytes (13–15). Furthermore, microinjection of peritoneal macrophages with purified PKC was sufficient to induce MHC-II expression, suggesting that PKC participates in the regulation of MHC-II expression (16). Despite considerable progress having been made concerning the elucidation of the transcriptional events leading to IFN- γ -induced MHC-II expression, the role of PKC in this process remains poorly understood. At least six isoenzymes of PKC, a family of protein serine/threonine kinases, are expressed in macrophages, but knowledge of their respective roles in the regulation of macrophage functions is limited. Using clones of the RAW 264.7 macrophage cell line overexpressing a dominant-negative (DN) mutant of PKC- α (DN PKC- α) (17), we have accumulated evidence that PKC- α is

*Institut National de la Recherche Scientifique–Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada; and [†]Molgen GmbH, Berlin, Germany

Received for publication May 1, 2003. Accepted for publication August 5, 2003.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grant MT-12933 from the Canadian Institutes of Health Research (to A.D.), the Deutsche Jose-Carreras-Leukämienstiftung e.V. (to M.S.), and the Wilhelm Sander-Stiftung (to M.S.). M.G. is the recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. A.D. is chercheur-boursier of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the holder of a Canada Research Chair.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Albert Descoteaux, Institut National de la Recherche Scientifique–Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7. E-mail address: albert.descoteaux@inrs-iaf.quebec.ca

³ Abbreviations used in this paper: MHC-II, MHC class II; MHC-I, MHC class I; GAS, IFN- γ -activated sequence; IRF, IFN regulatory factor; CIITA, class II transactivator; ISRE, IFN-stimulated responsive element; PKC, protein kinase C; DN, dominant negative; IP-10, IFN- γ -inducible protein-10; iNOS, inducible NO synthase; ICSP, IFN consensus sequence binding protein; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; CA, constitutively active; h, human.

involved in the regulation of several macrophage functions, including LPS- and IFN- γ -induced responses, as well as phagocytosis (17–19). In the present study, we report that PKC- α selectively regulates IFN- γ -induced expression of MHC-II by modulating the ability of IRF-1 to transactivate the CIITA promoter IV. These results suggest that PKC- α participates in the development of a proper adaptive immune response in macrophages.

Materials and Methods

Cell lines

The murine macrophage cell line RAW 264.7 transfected with the expression vector pCIN-4, and the DN PKC- α -overexpressing clones A2, B1, and C2 (17) were cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in DMEM with glutamine (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada), containing 10% heat-inactivated FBS (HyClone, Logan, UT), 10 mM HEPES (pH 7.3), antibiotics, and 500 μ g/ml G418 (Life Technologies).

Northern blot analyses

Total RNA extraction and Northern blot analyses were performed essentially as described previously (17, 20). The probe for murine MHC-II (H2-IA- α ; *d* haplotype) consisted of a 591-bp fragment from the MHC-II cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-70 (forward) (5'-GGAATTCTGGGAATCTCAGGTTCCCAGTG-3') and AD-71 (reverse) (5'-GGAATTCTGAACACCATGCTCAGCCTCTG-3'). The probe for murine MHC class I (MHC-I) (H2-K *d*) consisted of a 518-bp fragment from the MHC-I cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-92 (forward) (5'-GGAATTCGATTACATCGCCCTGAACG-3') and AD-93 (reverse) (5'-GGAATTCGAATCAAGGACAACCAGAA CAGCAATG-3'). The probe for murine IFN- γ -inducible protein-10 (IP-10) was the 500-bp *Eco*R1 fragment from C7-1 (21) (American Type Culture Collection, Manassas, VA). The inducible NO synthase (iNOS) probe was the 817-bp *Hinc*II-*Eco*R1 fragment from pINOSL3 (22) (provided by D. Radzioch (McGill University, Montreal, Canada)). The probe for murine IFN consensus sequence binding protein (ICSBP) was the 1.2-kb *Eco*R1 fragment from pSK-ICSBP (23) (kindly provided by K. Ozato (National Institutes of Health, Bethesda, MD)). The probe for murine IRF-1 consisted of a 207-bp fragment from the IRF-1 cDNA obtained by PCR amplification using oligodeoxynucleotides AD-134 (forward) (5'-CAGAG GAAAGAGAGAAAGTCC-3') and AD-135 (reverse) (5'-CACACGGTG ACAGTGCTGG-3').

RT-PCR

Total RNA was prepared as described previously (17, 20). The relative quantities of mRNA for CIITA and hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) were determined by RT-PCR. For cDNA synthesis, 5 μ g of total RNA, 1 μ l of oligo(dT) primer (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), and RNase-free water were added to a sterile microcentrifuge tube to obtain a total volume of 14 μ l. This reaction mixture was heated at 70°C for 10 min and placed on ice for 1 min, and the following components were added: 2 μ l of 10 \times synthesis buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, and 1 μ g/ μ l BSA), 1 μ l of 10 mM dNTP mix (Amersham Pharmacia Biotech), 2 μ l of 0.1 M DTT, and 1 μ l of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (20 U/ μ l; Amersham Pharmacia Biotech). Samples were then incubated at room temperature for 10 min, 42°C for 50 min, and 70°C for 15 min. For PCR, samples were amplified under the following conditions: 30 s at 94°C, 1 min at 50°C, and 1 min at 72°C (30 cycles). After the PCR amplification reaction, 20 μ l of PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1.3% agarose gel. The primers used for *CIITA* were AD-157 (forward) (5'-CAAGTCCCTGAAGGATGTGGA-3') and AD-158 (reverse) (5'-ACGTCCATCACCCGGAGGAC-3'). The primers used for type I *CIITA* were AD-263 (forward) (5'-AAGAGCTGCTCTCACGGGAAT-3') and AD-268 (reverse) (5'-CTCTGCTCCAATGTGCTCCTA-3'). The primers used for type IV *CIITA* were AD-267 (forward) (5'-ACAGCCACAGC CGGACCATA-3') and AD-268 (reverse) (5'-CTCTGCTCCAATGT GCTCCTA-3'). The primers used for *HPRT* were AD-55 (forward) (5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3') and AD-56 (reverse) (5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3').

Western blot analyses

Western blot analyses were performed as described previously (17). Rabbit polyclonal antisera against IRF-1 and IRF-2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Plasmids

For the dual luciferase assays, the upstream 377 bp of the type IV promoter of CIITA was PCR amplified and cloned into the pGL3-basic firefly luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI). The two putative transcription factors binding sites, ISRE and GAS, were mutated as described previously (24). The GAS element was changed from TTCTGAGAAA to TACTGAGAAA, and the ISRE motif was changed from GAAAGT GAAAGG to GAAAGTGGTGGG. Mouse IRF-2 expression vector was constructed as described (25). The primers used for PCR amplification of IRF-1 were as follows: forward, 5'-CGGATCCCTCCGGCACCCCTT GCGA-3', and reverse, 5'-GAATTCGGAGGGAGACAAGAACGGCT CAGA-3'; and the IRF-1 product was then inserted into pCDNA3 (*Bam*HI/*Eco*RI) (Invitrogen, NV Leek, The Netherlands). The constitutively active (CA) PKC- α expression vector was provided by Dr. G. Baier (University of Innsbruck, Innsbruck, Austria). The pRL-TK plasmid encoding the *Renilla* luciferase was from Promega. pRCMV was obtained from Invitrogen.

Transient transfections

Adherent cells (2.5 \times 10⁵/well) were transfected using Fugene (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada) with 0.3 μ g of the CIITA luciferase reporter construct, and various combinations of pRCMV, CA PKC- α , IRF-1, and IRF-2 expression vector, as indicated in *Results*, for a total of 0.7 μ g. All transfections included 0.15 μ g of pRL-TK (Promega) to control for transfection efficiency. Cells were transfected with 100 μ l of DNA/Fugene mix in 1 ml of medium for 6 h, and then fresh medium containing 5% heat-inactivated FBS was added. Cells were treated 18 h later with 100 U/ml IFN- γ for 8 h and 30 min, and lysed in Reporter lysis buffer (Promega). Firefly and *Renilla* luciferase values were obtained by analyzing 20 μ l of cell extracts with the Dual Luciferase kit (Promega) using a Lumat LB 9507 luminometer (EG & G Berthold, Nashua, NH). Statistically significant differences were identified using unpaired Student's *t* test. Values of *p* = 0.05 were considered statistically significant.

Nuclear extracts and EMSA

Adherent cells (8 \times 10⁶/100-mm tissue culture dish) were stimulated with 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points, washed, and scraped into 1.5 ml of cold PBS. Cell suspensions were transferred into microcentrifuge tubes, pelleted, and the nuclear protein extracts were prepared essentially as described (25). Protein contents were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and the extracts were stored at -70°C. EMSA were performed using the following oligonucleotides. CIITA-IRF-1 consensus oligonucleotide (5'-GGTGATAGACAGAAAGTGAAAGGGG GAAAAGCGCCACAGA-3') corresponds to the type IV CIITA promoter sequence -81 to -43 (10, 12). The GAS probe (5'-AGCCATTTCAG GAATCGAAA-3') was derived from the Mg21 promoter sequence and contains a GAS site identical with the optimum GAS sequence (TTCCS GGAA) for STAT-1 binding (26). ³²P-Labeled CIITA-IRF-1 oligonucleotide was incubated with 10 μ g of nuclear extracts for 30 min at room temperature in a volume of 20 μ l containing 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 12% glycerol, 1 μ g of salmon sperm DNA, and 1 μ g of poly(dI:dC). ³²P-Labeled GAS probe was incubated with 5 μ g of nuclear extracts for 20 min at room temperature in a volume of 20 μ l containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 50 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.2% Nonidet P-40, and 1 μ g of poly(dI:dC). The CIITA-IRF-1-protein or GAS-protein complexes were separated from free oligonucleotides by electrophoresis under nondenaturing conditions in a 6% polyacrylamide gel at 250 V in 1 \times TGE (50 mM Tris-HCl, 380 mM glycine, and 2 mM EDTA) and in a 5% polyacrylamide gel at 180 V in 0.5 \times TBE (44.5 mM Tris-HCl, 44.5 mM borate (pH 8.0), and 1 mM EDTA), respectively. The gels were exposed to a phosphor screen that was scanned on a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Immunoprecipitations and immunoblotting

Adherent cells (8 \times 10⁶/100-mm tissue culture dish) were stimulated with 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Cells were washed once with PBS, homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EGTA, and 1% Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitors, and protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce). Immunoprecipitations and immunoblottings were performed as described previously (19). Anti-STAT1 or anti-JAK2 Abs were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Tyrosine phosphorylation was analyzed using the mouse anti-phosphotyrosine mAb (4G10).

In vivo phosphorylation of IRF-1

Adherent RAW 264.7 cells (1×10^7 /100-mm tissue culture dish) were incubated for 2 h in 3 ml of phosphate-free DMEM with glutamine (Life Technologies) supplemented with 0.5 mCi/ml $^{32}\text{P}_i$ (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Quebec, Canada) before the addition of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Cells were then washed with ice-cold PBS and homogenized in immunoprecipitation buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Total extracts were immunoprecipitated as described previously (19) and separated on 10% SDS-PAGE. The gels were exposed to a phosphor screen that was scanned on a PhosphorImager (Molecular Dynamics) to determine IRF-1 phosphorylation.

Two-dimensional gel electrophoresis

Preparation of cell extracts and immunoprecipitation were performed as described previously (19). Anti-IRF-1 Abs used for immunoprecipitation were from Santa Cruz Biotechnology. Solubilization of proteins was performed in a buffer containing 8 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 40 mM dithioerythritol, 20 mM Tris-HCl, 2% immobilized pH gradient buffer (Amersham Biosciences), and 0.5 μl of bromophenol blue (0.5%). Proteins were first separated according to their isoelectrical point along 7-cm linear immobilized pH gradient strips (Amersham Biosciences) using IPGphor Isoelectric Focusing system (Amersham Pharmacia Biotech). The strips were then equilibrated in a solution containing 13 mM dithioerythritol for 10 min, followed by a solution containing 2.5% iodoacetamide for 5 min. The proteins were finally separated according to their molecular mass using 10% SDS-PAGE, transferred on Hybond-ECL membranes, and detected by Western blot analysis using anti-IRF-1 Abs (Santa Cruz Biotechnology).

Translocation of PKC- α

Adherent RAW 264.7 cells were transfected using Gene Porter (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) with 0.6 μg of the human (h)PKC- α -GFP construct (provided by C. Quittau-Prévostel (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Montpellier, France)). Cells were seeded (1×10^5 /well) in 24-well plates containing microscope coverslips (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) for 1 day, transfected with 250 μl of DNA/Gene Porter mix for 5 h, and further incubated in medium for 18 h. Cells were then stimulated for 2 h with 100 U/ml IFN- γ , fixed with 2% formaldehyde, permeabilized with ice-cold PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% BSA for 10 min at room temperature, and then incubated with Alexa Fluor 568 phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR). Coverslips were washed six times with PBS and mounted with Fluoromount-G (Interscience, Markham, Ontario, Canada). Analyses were performed using a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) installed on an Eclipse E800 microscope (Nikon, Melville, NY). Phalloidin fluorescence and translocation of PKC- α -GFP were analyzed using an argon/krypton laser at 568 and 488 nm, respectively, both with a Plan Apo Nikon 60 \times (numerical aperture, 1.4) oil immersion lens. At least 20–30 cells from each of two independent experiments were examined under each experimental condition. Images were acquired in the normal scanning mode with a Kalman filter of 10 using the LaserSharp software (Bio-Rad Laboratories).

Interaction between PKC- α and IRF-1

293T cells were grown to 75–85% confluence in 100-mm tissue culture dish. Cells were transfected with 15 μg of IRF-1 expression vector, and either 15 μg of pRcCMV or CA PKC- α expression vector using the calcium phosphate coprecipitation technique. Plasmid DNA and water were mixed to a total volume of 450 μl , and 50 μl of 2.5 M CaCl_2 was added. The calcium/DNA solution was mixed quickly with 500 μl of HeBS (2 \times) buffer (140 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4 , and 50 mM HEPES (pH 7.05)), and the precipitate was immediately added to the dishes. Cells were transfected 8 h at 37°C, washed twice with methionine-free DMEM with glutamine (Life Technologies), and then incubated for 16 h in methionine-free DMEM with glutamine supplemented with 0.2 mCi/ml [^{35}S]methionine (Amersham Biosciences). After the labeling period, cells were washed with ice-cold PBS and then homogenized in lysis buffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.4), and 0.2% Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitors. Total cell extracts were subjected to immunoprecipitation as described previously (19) with Abs to IRF-1 (Santa Cruz Biotechnology) and to PKC- α (Santa Cruz Biotechnology). The IRF-1 immunoprecipitate was denatured by a treatment of 5 min at room temperature and 5 min at 95°C in 50 μl of elution buffer (1% SDS, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), and 10 mM DTT), and 10 μl of 10% BSA was added. Samples were then diluted in 1 ml with lysis buffer containing 10 mM iodoacetamide and cleared by centrifugation, and the second immunopre-

cipitation was performed with anti-IRF-1 and anti-PKC- α Abs. Proteins were analyzed on 10% SDS-PAGE, and dried gels were exposed to a phosphor screen that was scanned on a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Results

DN PKC- α overexpression selectively inhibits IFN- γ -induced MHC-II mRNA accumulation

Using clones of the mouse macrophage cell lines overexpressing a DN PKC- α , we previously obtained evidence for the involvement of PKC- α in the modulation of IFN- γ -induced COX-2 expression in macrophages (18). To further investigate the role of PKC- α in the modulation of IFN- γ -induced responses, we first determined whether IFN- γ alters the intracellular localization of PKC- α . To this end, we transiently transfected RAW 264.7 cells with a PKC- α -GFP expression vector. Incubation in the presence of 100 U/ml IFN- γ induced the translocation of PKC- α -GFP from the cytoplasm to the nucleus within 2 h (Fig. 1A). We next compared the expression of several genes in normal RAW 264.7 cells (transfected with the empty vector) and in DN PKC- α -overexpressing

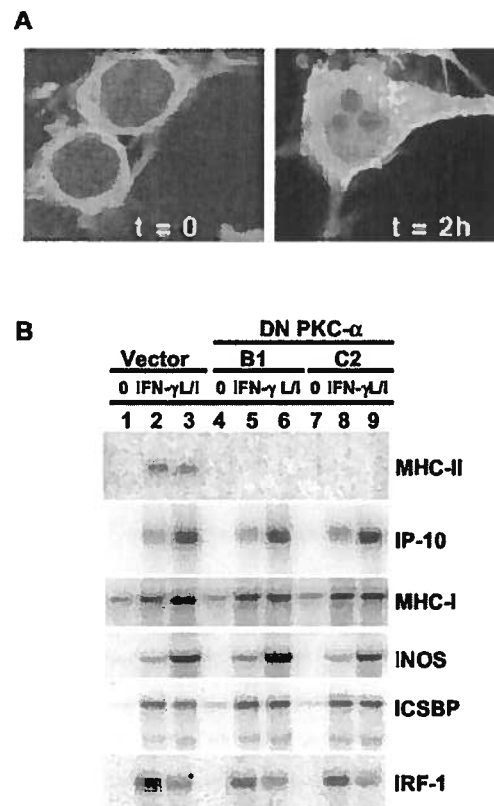


FIGURE 1. Effect of DN PKC- α overexpression on IFN- γ -induced MHC-II mRNA accumulation. **A**, Adherent RAW 264.7 cells were transfected with hPKC- α -GFP, incubated with 100 U/ml IFN- γ for 2 h, and prepared for confocal microscopy as described in *Materials and Methods*. hPKC- α -GFP is located in the cytoplasm of unstimulated cells and undergoes nuclear translocation following activation with 100 U/ml IFN- γ . Similar results were obtained in two separate experiments. **B**, Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the absence (lanes 1, 4, and 7) or in the presence of either 100 U/ml IFN- γ (lanes 2, 5, and 8) or a combination of 100 U/ml IFN- γ and 100 ng/ml LPS (lanes 3, 6, and 9) for 8 h. For priming experiments, cells were first incubated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h followed by additional stimulation with IFN- γ , or IFN- γ and LPS. Total RNA was extracted, and Northern blot analysis was performed as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

clones (B1 and C2) (17) after stimulation with 100 U/ml IFN- γ alone or in combination with 100 ng/ml LPS. MHC-II mRNA accumulation was completely abrogated in DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 (Fig. 1B, lanes 5 and 8) compared with the levels observed in normal cells (lane 2). It has been demonstrated that LPS down-modulates the accumulation of Ia mRNA induced by IFN- γ (27, 28). Accumulation of MHC-II mRNA decreased in normal RAW 264.7 macrophages in response to a combination of IFN- γ and LPS (Fig. 1B, lane 3) compared with the levels observed for IFN- γ -induced mRNA in control cells (lane 2). Consistent with the inhibition of IFN- γ -induced MHC-II mRNA accumulation, DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 failed to express MHC-II mRNA in response to LPS and IFN- γ (Fig. 1B, lanes 6 and 9). The inhibitory effect of DN PKC- α on IFN- γ -induced MHC-II expression was not the consequence of a general defect in IFN- γ responses, because the expression of several other IFN- γ -inducible genes (*iNOS*, *ICSBP*, *IRF-1*, *MHC-I*, and *IP-10*) was not affected by DN PKC- α (Fig. 1B, lanes 2, 5, and 8). Furthermore, IFN- γ -induced tyrosine phosphorylation on STAT1 and JAK2 (Fig. 2A) as well as the kinetics of STAT1 nuclear translocation and DNA binding activity (B) were normal in DN PKC- α -overexpressing cells. Collectively, these data indicated that DN PKC- α selectively inhibits IFN- γ -induced MHC-II mRNA accumulation, downstream of STAT1 activation.

PKC- α modulates IFN- γ -induced type IV CIITA expression

CIITA is a master regulator of both inducible and constitutive MHC-II expression (7, 9). To elucidate the mechanism by which DN PKC- α inhibits IFN- γ -induced MHC-II expression, we compared the accumulation of total CIITA mRNA in normal RAW 264.7 cells and in DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 after stimulation with 100 U/ml IFN- γ . In normal RAW 264.7 cells, IFN- γ induced the expression of total CIITA mRNA in a time-dependent manner (Fig. 3A, lanes 1–4). In contrast, IFN- γ -induced total CIITA mRNA levels were barely detectable in DN PKC- α -overexpressing clone B1 and C2 (Fig. 3A, lanes 5–12). Thus, similar to IFN- γ -induced MHC-II expression, DN PKC- α overexpression inhibited IFN- γ -induced CIITA gene expression in RAW 264.7 macrophages. These results raised the possibility that PKC- α modulates IFN- γ -induced MHC-II gene expression by regulating CIITA expression. In macrophages, CIITA IFN- γ -inducible expression is mainly regulated by promoters I and IV (10, 11, 29). In IFN- γ -stimulated RAW 264.7 cells, type IV CIITA was induced earlier and more abundantly than type I CIITA (Fig. 3B, lanes 2 and 3). Overexpression of DN PKC- α strongly inhibited IFN- γ -induced type IV CIITA mRNA accumulation and slightly reduced IFN- γ -induced type I CIITA mRNA (Fig. 3B, lanes 5 and 6), suggesting that PKC- α modulates IFN- γ -induced type IV CIITA expression. To further address the role of PKC- α in the induction of type IV CIITA expression, we transiently transfected RAW 264.7 cells with a CA PKC- α expression vector and a type IV CIITA promoter reporter construct. Expression of CA PKC- α had no significant effect on basal CIITA promoter IV activity in untreated RAW 264.7 cells (Fig. 3C). In contrast, CA PKC- α significantly increased IFN- γ -stimulated CIITA promoter IV activity by ~ 1.6 -fold (Fig. 3C; $p = 0.005$; $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. Similar results were obtained with a wild-type PKC- α expression vector (data not shown). These data are consistent with PKC- α playing a role in modulating type IV CIITA expression in IFN- γ -stimulated macrophages. To determine the influence of PKC- α on the various promoter IV elements, we transiently transfected RAW 264.7 cells with the CA PKC- α expression vector and reporter constructs containing either the GAS-mutated or the ISRE-mutated promoter IV region. As previ-

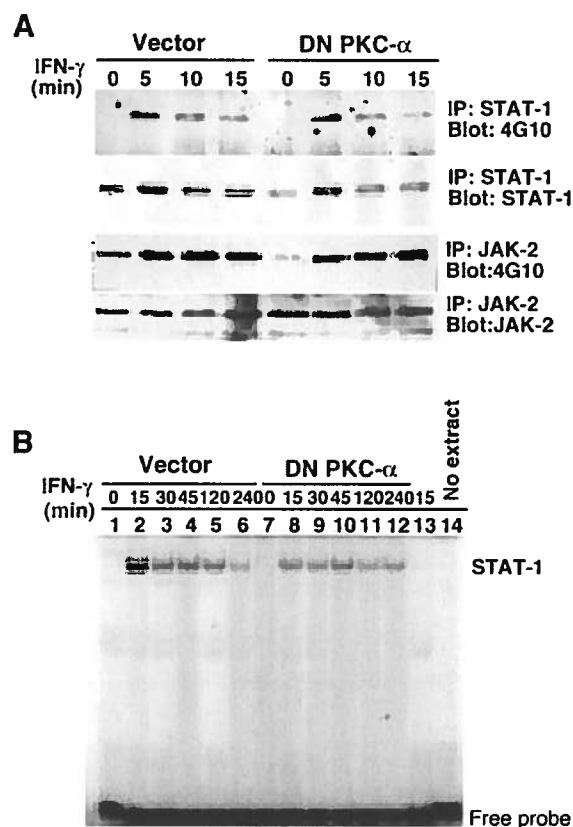


FIGURE 2. PKC- α modulates IFN- γ -induced CIITA transcriptional activity. **A**, Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR with specific primers for *CIITA* and *HPRT*. **B**, Adherent cells (vector alone and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR with specific primers for type I and type IV *CIITA* and *HPRT*. **C**, Adherent RAW 264.7 cells were transiently transfected with the luciferase reporter vectors containing the normal, the GAS-mutated, and the ISRE-mutated type IV *CIITA* promoter region and the pRL-TK for 6 h along with either the control vector (pRCMV) or the CA PKC- α (A25E) expression vector. Cells were incubated for 18 h and then stimulated with 100 U/ml IFN- γ for 8 h and 30 min. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments. *, $p \leq 0.05$ as compared with untreated or IFN- γ -treated cells transfected with control vector.

ously shown (12), we observed that both GAS and ISRE elements were important for promoter IV activity in untreated as well as in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 cells (Fig. 3C). In untreated cells, CA PKC- α significantly increased basal activity of promoter IV containing the GAS-mutated region by ~ 1.7 -fold (Fig. 3C; $p = 0.005$; $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. In IFN- γ -treated cells, CA PKC- α significantly increased promoter activity of promoter IV containing the GAS-mutated region by ~ 2 -fold (Fig. 3C; $p = 0.002$; $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. But intriguingly, the construct containing the ISRE-mutated region was less induced by CA PKC- α in untreated and in IFN- γ -treated cells. We obtained similar results with cells transfected with a wild-type PKC- α expression vector (data not shown). These results suggested that PKC- α might modulate the activity of ISRE-binding and IFN- γ -activated factors to stimulate type IV CIITA promoter. These transcription factors may be IRF-1 or IRF-2

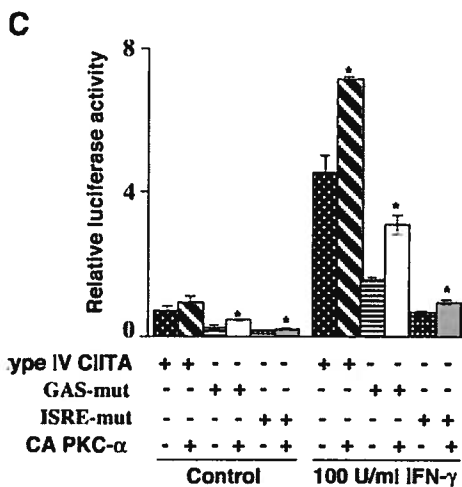
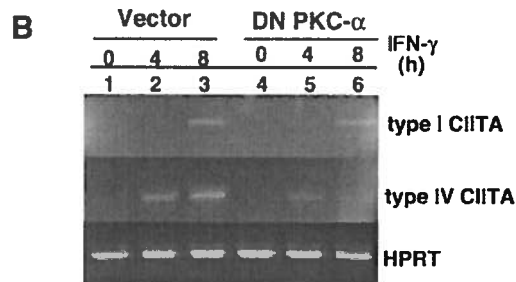
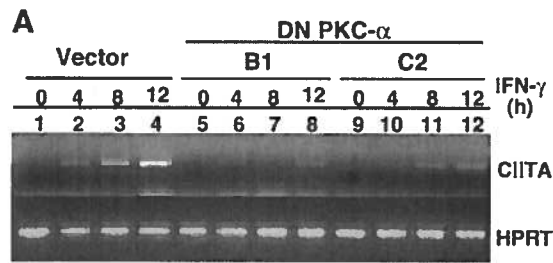


FIGURE 3. Effect of DN PKC- α overexpression on IFN- γ -induced activation of the JAK-STAT pathway. Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. *A*, Total cell extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-STAT1 and anti-JAK2 Abs, and then the levels of tyrosine phosphorylation were determined by Western blot analysis with anti-phosphotyrosine (4G10) mAb as described in *Materials and Methods*. *B*, Nuclear extracts were prepared, and EMSA for STAT1 were performed as described in *Materials and Methods*. In lane 13, 100-fold excess cold probe was coincubated with the reaction mixture containing nuclear extracts from control cells incubated with 100 U/ml IFN- γ for 15 min before EMSA. Similar results were obtained in three different experiments.

Expression and DNA binding activity of IRF-1 and IRF-2 are normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells

Because both IRF-1 and IRF-2 are involved in IFN- γ -induced CIITA expression (7, 30), we have determined whether expression of these proteins was affected by DN PKC- α . In both control RAW 264.7 cells (Fig. 4A, lanes 1–4) and DN PKC- α overexpressing cells (clone B1, lanes 5–8; clone C2, lanes 9–12), IRF-1 was equally induced by IFN- γ . Similarly, IRF-2 was constitutively expressed to similar levels in control cells (Fig. 4A, lanes 1–4) as well as in DN PKC- α -overexpressing clones B1 (lanes 5–8) and C2 (lanes 9–12). In addition, the kinetics of IRF-1 nuclear translocation and DNA binding activity were similar in IFN- γ -stimu-

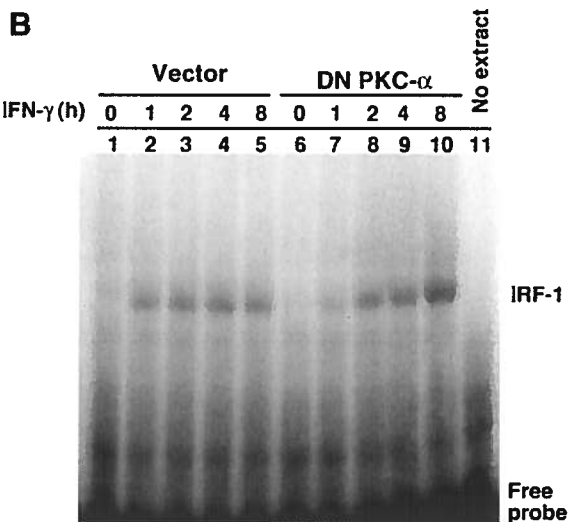
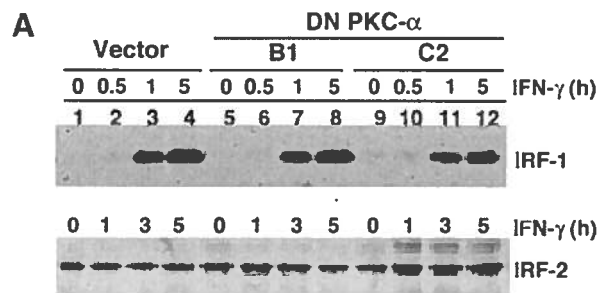


FIGURE 4. Expression and DNA binding activity of IRF-1/2 are normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells. *A*, Adherent cells (vector alone, clone B1, and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Cell extracts were prepared for Western blot analyses as described in *Materials and Methods*. *B*, Adherent cells (vector alone, clone A2, clone B1, and clone C2) were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for 1 and 8 h. Nuclear extracts were prepared, and EMSA for IRF-1 were performed as described in *Materials and Methods*. In lane 13, 100-fold excess cold probe was coincubated with the reaction mixture containing nuclear extracts from control cells incubated with 100 U/ml IFN- γ for 1 h before EMSA. Similar results were obtained in three different experiments.

lated control cells and DN PKC- α -overexpressing clones C2 (Fig. 4B). We obtained similar data with DN PKC- α -overexpressing clones B1 and A2 (data not shown). Supershift experiments, using Abs to IRF-1 and IRF-2, revealed that IRF-1 was the major factor bound to the IRF element in the CIITA promoter IV (data not shown). Collectively, these results indicated that IFN- γ -induced IRF-1 expression and DNA binding activity, as well as IRF-2 expression, are not affected by DN PKC- α .

PKC- α increases IFN- γ -induced transactivating activity of IRF-1, but not IRF-2

To investigate the role of PKC- α in IFN- γ -induced activation of IRF-1 or IRF-2, we transiently transfected RAW 264.7 cells with CA PKC- α , IRF-1, or IRF-2 expression vectors, or a combination of CA PKC- α and IRF-1 or IRF-2 expression vectors along with the CIITA promoter IV reporter construct. As previously reported (30), we observed that expression of both IRF-1 and IRF-2 increased basal and IFN- γ -induced promoter IV activity. In untreated RAW 264.7 cells, basal promoter IV activity was significantly increased by 4.2-fold with the IRF-1 expression vector (Fig. 5; $p < 0.0001$; $n = 3$) and by 3.9-fold with IRF-2 expression

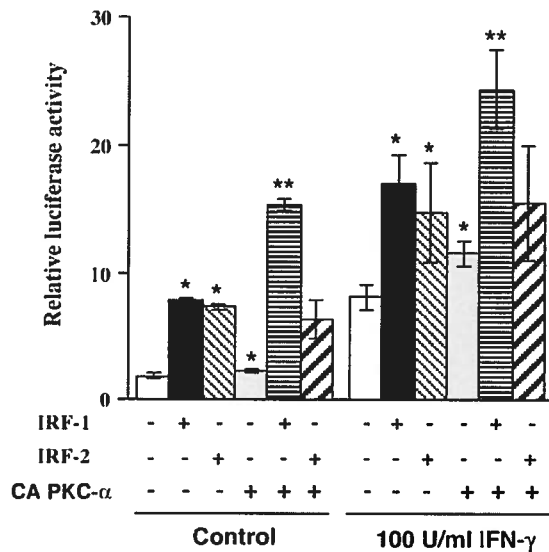


FIGURE 5. Overexpression of PKC- α increases IFN- γ -induced transactivation activity of IRF-1 but not IRF-2. Adherent RAW 264.7 cells were transiently transfected with the CIITA promoter-IV/Luc reporter construct and pRL-TK for 6 h along with either the control vector (pRcCMV), the CA PKC- α (A25E) expression vector, and/or the IRF-1 or IRF-2 expression vector. Cells were incubated for 18 h and then stimulated with 100 U/ml IFN- γ for 8 h and 30 min. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments. *, $p \leq 0.05$ as compared with untreated or IFN- γ -treated cells transfected with control vector. **, $p \leq 0.05$ as compared with untreated or IFN- γ -treated cells transfected with IRF-1 expression vector.

vector (Fig. 5; $p < 0.0001$; $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. In IFN- γ -treated RAW 264.7 cells, promoter IV activity was increased by 2.1-fold with the IRF-1 expression vector (Fig. 5; $p < 0.0001$; $n = 3$) and by 1.8-fold with the IRF-2 expression vector (Fig. 5; $p = 0.004$; $n = 3$) with respect to cells transfected with the control vector. Cotransfection of CA PKC- α with IRF-1 had a significant effect on IRF-1-transactivating activity, further increasing type promoter IV activity in untreated cells by 2-fold (Fig. 5; $p < 0.0001$; $n = 3$) and in IFN- γ -treated cells by 1.4-fold (Fig. 5; $p = 0.03$; $n = 3$) with respect to cells transfected with the IRF-1 expression vector. In contrast, CA PKC- α had no effect on IRF-2-dependent basal (Fig. 5; $p = 0.324$; $n = 3$) and IFN- γ -induced (Fig. 5; $p = 0.843$; $n = 3$) promoter IV activity. These data indicate that PKC- α modulates IRF-1- but not IRF-2-transactivating activity to induce CIITA promoter IV transcription.

Effect of DN PKC- α overexpression on the modulation of IFN- γ -induced IRF-1 posttranslational modifications

Both IRF-1 and IRF-2 undergo posttranslational modifications such as phosphorylation and acetylation (31–35). To assess the impact of PKC- α on IRF-1 posttranslational modifications, we first compared the phosphorylation of IRF-1 in IFN- γ -treated normal RAW 264.7 cells and DN PKC- α -overexpressing cells. As shown in Fig. 6A, there were no detectable differences in the kinetics and levels of IRF-1 phosphorylation in these cells. However, two-dimensional gel electrophoresis analysis revealed that the migration in a pH gradient of IRF-1 from DN PKC- α -overexpressing cells was delayed with respect to the migration of IRF-1 from normal RAW 264.7 cells (Fig. 6B). To determine whether IRF-1 and

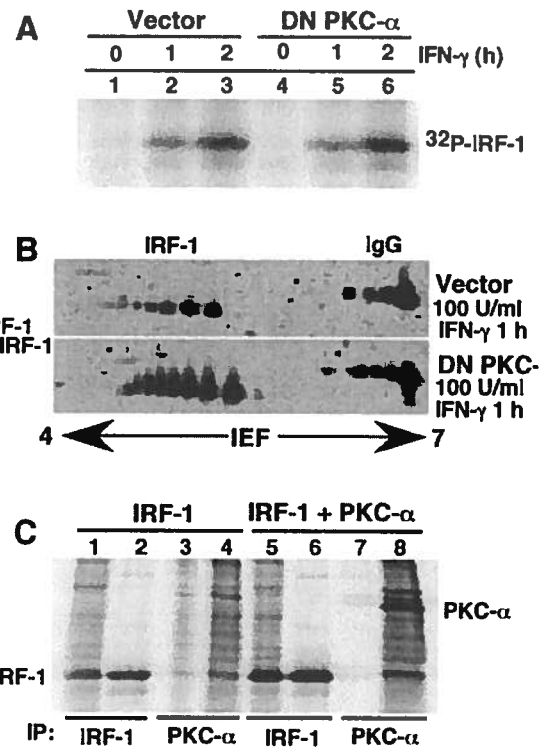


FIGURE 6. Role of PKC- α in the modulation of IFN- γ -induced IRF-1 posttranslational modifications. *A*, Adherent cells (vector alone and clone C2) were incubated in 32 Pi-containing medium for 2 h before the addition of 100 U/ml IFN- γ for the indicated time points. Immunoprecipitation of IRF-1 was carried as described in *Materials and Methods*. *B*, Adherent cells (vector alone and clone C2) were treated with 100 U/ml IFN- γ for 1 h. Total cell lysates were immunoprecipitated with anti-IRF-1 Abs, and two-dimensional gel electrophoresis was performed as described in *Materials and Methods*. IEF, Isoelectric focusing. *C*, 293T cells were transiently transfected with an IRF-1 expression vector, together with either pRcCMV or a CA PKC- α expression vector for 8 h, followed by an incubation in [35 S]methionine-containing medium for 16 h. Total cell extracts were prepared as described in *Materials and Methods* and subjected to immunoprecipitation with anti-IRF-1 (lanes 1 and 5) and anti-PKC- α (lanes 4 and 8) Abs. The IRF-1 immunoprecipitate was denatured as described in *Materials and Methods*. After dilution with lysis buffer, aliquots were subjected to reprecipitation with Abs to IRF-1 (lanes 2 and 6) and PKC- α (lanes 3 and 7). Proteins were resolved on a 7.5% SDS-PAGE, and the gel was dried and exposed on a phosphor screen that was scanned on a PhosphorImager. The presence PKC- α in lane 7 indicates that it was coprecipitated with IRF-1. The amount of IRF-1 immunoprecipitate loaded in lanes 1 and 5 represents one-tenth of the total sample. Data shown are representative of three independent experiments.

PKC- α directly interact, we performed an immunoprecipitation-recapture assay. The observation that PKC- α was recaptured from IRF-1 immunoprecipitate in 293T cells transfected with both IRF-1 and CA PKC- α expression vectors (Fig. 6C, lane 7) suggested that both proteins interact *in vivo*. The specificity of the interaction was evidenced by the absence of bands corresponding to PKC- α in IRF-1 immunoprecipitate from cells transfected only with the IRF-1 expression vector (Fig. 6C, lane 3).

Discussion

Previous studies based on pharmacological agents suggested that PKC participates in IFN- γ -induced MHC-II expression in various cell types, including macrophages (13, 14, 36, 37). Our data obtained with DN PKC- α -overexpressing cells revealed a role for

PKC- α in the regulation of MHC-II expression in IFN- γ -treated RAW 264.7 macrophages. Significantly, overexpression of DN PKC- α had no effect on IFN- γ -induced expression of several unrelated genes (*iNOS*, *IRF-1*, *IP-10*, *ICSBP*, and *MHC-I*), supporting the notion that PKC- α selectively modulates IFN- γ -induced responses.

The inhibition of IFN- γ -induced CIITA mRNA accumulation observed in DN PKC- α -overexpressing cells indicated that PKC- α regulates MHC II expression at the level of CIITA expression. This role for PKC- α was further substantiated by the fact that expression of a CA PKC- α significantly increased IFN- γ -induced CIITA promoter IV activity in transient transfection assays. Dissection of the IFN- γ -induced signaling cascade leading to CIITA expression revealed that kinetics and extent of tyrosine phosphorylation of both STAT1 and JAK2 were similar in control RAW 264.7 cells and in DN PKC- α -overexpressing cells. Furthermore, nuclear translocation and DNA-binding activity of STAT1 took place normally in DN PKC- α -overexpressing cells. These data indicated that the inhibitory effect of DN PKC- α on IFN- γ -induced CIITA expression may be downstream of these early signaling events. This was expected because IFN- γ -induced expression of *iNOS*, *MHC I*, *ICSBP*, and *IRF-1* was normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells. The observation that DN PKC- α had no effect on both the IFN- γ -induced *IRF-1* expression and *IRF-1* DNA binding activity raised the possibility that PKC- α modulates *IRF-1*-transactivating capacity. Indeed, expression of a CA PKC- α enhanced the ability of *IRF-1*, but not *IRF-2*, to transactivate CIITA promoter IV in both unstimulated and IFN- γ -treated RAW 264.7 cells, thereby strongly supporting this view. Although the underlying mechanism is presently unknown, there is growing evidence that phosphorylation is important for *IRF-1* function (31, 38). The possibility that PKC- α participates to post-translational modifications of *IRF-1* is supported by the finding that the *IRF-1* protein complex is more basic in DN PKC- α -overexpressing cells than in control cells and by the observation of a direct interaction between PKC- α and *IRF-1*. Mutation analysis of serine and threonine residues potentially phosphorylated by PKC will be required to elucidate the mechanism by which PKC- α modulates *IRF-1* activity.

Studies with cells from mice with a targeted disruption of the *IRF-1* gene established that *IRF-1* is essential for IFN- γ -induced expression of a number of genes including *CIITA*, *iNOS*, and *MHC-I* (7, 39–41). The observation that IFN- γ -induced expression of *iNOS* and *MHC-I* was normal in DN PKC- α -overexpressing cells suggests that PKC- α -mediated modulation of *IRF-1* activity may not be required for the transactivation of all *IRF-1*-dependent promoters but rather that this requirement is limited to a subset of promoters. The expression of a given gene depends on the simultaneous interactions of a specific combination of regulatory proteins within the control DNA elements, leading to the assembly of nucleoprotein structures termed enhanceosomes (42, 43). It is possible that, in the context of CIITA promoter IV, PKC- α -dependent posttranslational modification(s) of *IRF-1* may be required for the stability of the enhanceosome or for the presentation of a specific activation surface. Whole genome expression analysis in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells may identify genes other than CIITA whose expression requires PKC- α -dependent modulation of *IRF-1*-transactivating activity.

The inhibition of IFN- γ -mediated induction of CIITA and MHC II expression by DN PKC- α indicates that PKC- α activation is an important event in IFN- γ -induced expression of these genes in RAW 264.7 macrophages. However, the mechanism by which PKC- α is activated in IFN- γ -treated macrophages remains to be established. PKC- α is activated by diacylglycerol which can be

generated through different pathways, including the activation of phospholipase C. In the human epithelial cell line NCI-H292, IFN- γ -induced ICAM-1 expression involves a c-Src tyrosine kinase activation pathway in which phospholipase C- γ 2 and PKC- α play an important role (44). Additional studies will be required to determine whether a similar pathway is involved in the activation of PKC- α in IFN- γ -treated macrophages.

The JAK-STAT signaling pathway plays a central role in IFN- γ -induced responses (5). Recent evidence indicate that members of the PKC family are required for proper function and fine tuning of this pathway. Hence, PKC- δ mediates serine phosphorylation of STAT1 to facilitate transcription of IFN- γ -stimulated genes (45), whereas PKC- ϵ is required for optimal JAK-mediated STAT1 tyrosine phosphorylation (46). This suggests that both PKC- δ and PKC- ϵ have a broad impact on IFN- γ responses. In contrast, PKC- α acts further downstream by modulating the transcriptional activity of *IRF-1* in the context of CIITA promoter IV. In this respect, PKC- α appears to exert a narrower influence than PKC- δ and PKC- ϵ in the regulation of IFN- γ -induced responses. Collectively, these data support the view that PKC isoenzymes modulate specific signaling and transcriptional events in IFN- γ -stimulated cells.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. G. Baier for providing the CA PKC- α expression vector and Dr. C. Quittau-Prévostel for providing the PKC- α -GFP expression vector. We thank M. Desrosiers for his technical expertise in confocal microscopy.

References

- Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14:301.
- van den Elsen, P. J., S. J. Gobin, M. C. van Eggermond, and A. Peijnenburg. 1998. Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. *Immunogenetics* 48:208.
- Boss, J. M. 1997. Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr. Opin. Immunol.* 9:107.
- Reith, W., and B. Mach. 2001. The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu. Rev. Immunol.* 19:331.
- Bach, E. A., M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1997. The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15:563.
- Harada, H., T. Fujita, M. Miyamoto, Y. Kimura, M. Maruyama, A. Furia, T. Miyata, and T. Taniguchi. 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, *IRF-1* and *IRF-2*, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58:729.
- Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Bernardino, L. A. Otten, and B. Mach. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon- γ requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8:157.
- Harton, J. A., and J. P. Ting. 2000. Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol. Cell. Biol.* 20:6185.
- Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon- γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106.
- Muhlethaler-Mottet, A., L. A. Otten, V. Steimle, and B. Mach. 1997. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J.* 16:2851.
- Pai, R. K., D. Askew, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2002. Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J. Immunol.* 169:1326.
- O'Keefe, G. M., V. T. Nguyen, L. L. Ping Tang, and E. N. Benveniste. 2001. IFN- γ regulation of class II transactivator promoter IV in macrophages and microglia: involvement of the suppressors of cytokine signaling-1 protein. *J. Immunol.* 166:2260.
- Politis, A. D., and S. N. Vogel. 1990. Pharmacologic evidence for the requirement of protein kinase C in IFN-induced macrophage Fc γ receptor and Ia antigen expression. *J. Immunol.* 145:3788.
- Lee, Y. J., R. B. Panek, M. Huston, and E. N. Benveniste. 1995. Role of protein kinase C and tyrosine kinase activity in IFN- γ -induced expression of the class II MHC gene. *Am. J. Physiol.* 268:C127.
- Fan, X. D., M. Goldberg, and B. R. Bloom. 1988. Interferon- γ -induced transcriptional activation is mediated by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5122.
- Smith, M. R., E. A. Ramsburg, H. F. Kung, and S. K. Durum. 1992. Components of the protein kinase C pathway induce Ia expression after injection into macrophages. *J. Immunol.* 149:1304.

17. St-Denis, A., F. Chano, P. Tremblay, Y. St-Pierre, and A. Descoteaux. 1998. Protein kinase C- α modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 273:32787.
18. Giroux, M., and A. Descoteaux. 2000. Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C- α . *J. Immunol.* 165:3985.
19. Breton, A., and A. Descoteaux. 2000. Protein kinase C- α participates in Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:472.
20. Descoteaux, A., and G. Matlashewski. 1990. Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 145:846.
21. Narumi, S., and T. A. Hamilton. 1991. Inducible expression of murine IP-10 mRNA varies with the state of macrophage inflammatory activity. *J. Immunol.* 146:3038.
22. Xie, Q. W., H. J. Cho, J. Calaycay, R. A. Mumford, K. M. Swiderek, T. D. Lee, A. Ding, T. Troso, and C. Nathan. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225.
23. Politis, A. D., J. Sivo, P. H. Driggers, K. Ozato, and S. N. Vogel. 1992. Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine peritoneal macrophages: induction by IFN- γ and down-regulation by IFN- α , dexamethasone, and protein kinase inhibitors. *J. Immunol.* 148:801.
24. Landt, O., H. P. Grunert, and U. Hahn. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* 96:125.
25. Andrews, N. C., and D. V. Faller. 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19:2499.
26. Hussain, S., B. S. Zwilling, and W. P. Lafuse. 1999. *Mycobacterium avium* infection of mouse macrophages inhibits IFN- γ Janus kinase-STAT signaling and gene induction by down-regulation of the IFN- γ receptor. *J. Immunol.* 163:2041.
27. Koerner, T. J., T. A. Hamilton, and D. O. Adams. 1987. Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA. *J. Immunol.* 139:239.
28. Glimcher, L. H., and C. J. Kara. 1992. Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu. Rev. Immunol.* 10:13.
29. Waldburger, J. M., T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2001. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J. Exp. Med.* 194:393.
30. Koenig Merediz, S. A., M. Schmidt, G. J. Hoppe, J. Alfen, D. Meraro, B. Z. Levi, A. Neubauer, and B. Wittig. 2000. Cloning of an interferon regulatory factor 2 isoform with different regulatory ability. *Nucleic Acids Res.* 28:4219.
31. Lin, R., and J. Hiscott. 1999. A role for casein kinase II phosphorylation in the regulation of IRF-1 transcriptional activity. *Mol. Cell. Biochem.* 191:169.
32. Lin, R., A. Mustafa, H. Nguyen, D. Gewert, and J. Hiscott. 1994. Mutational analysis of interferon (IFN) regulatory factors 1 and 2: effects on the induction of IFN- β gene expression. *J. Biol. Chem.* 269:17542.
33. Sharf, R., D. Meraro, A. Azriel, A. M. Thornton, K. Ozato, E. F. Petricoin, A. C. Larner, F. Schaper, H. Hauser, and B. Z. Levi. 1997. Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J. Biol. Chem.* 272:9785.
34. Masumi, A., and K. Ozato. 2001. Coactivator p300 acetylates the interferon regulatory factor-2 in U937 cells following phorbol ester treatment. *J. Biol. Chem.* 276:20973.
35. Birnbaum, M. J., B. van Zundert, P. S. Vaughan, A. J. Whitmarsh, A. J. van Wijnen, R. J. Davis, G. S. Stein, and J. L. Stein. 1997. Phosphorylation of the oncogenic transcription factor interferon regulatory factor 2 (IRF2) in vitro and in vivo. *J. Cell. Biochem.* 66:175.
36. Mattila, P., and R. Renkonen. 1991. Protein kinase C regulates MHC-class II expression on endothelial cells. *Scand. J. Immunol.* 34:153.
37. Politis, A. D., J. Sivo, and S. N. Vogel. 1993. Multiple pathways of interferon-induced gene expression in murine macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 53:583.
38. Momose, I., M. Terashima, Y. Nakashima, M. Sakamoto, H. Ishino, T. Nabika, Y. Hosokawa, and Y. Tanigawa. 2000. Phorbol ester synergistically increases interferon regulatory factor-1 and inducible nitric oxide synthase induction in interferon- γ -treated RAW 264.7 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1498:19.
39. Jarosinski, K. W., and P. T. Massa. 2002. Interferon regulatory factor-1 is required for interferon- γ -induced MHC class I genes in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 122:74.
40. Kamijo, R., H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S. I. Koh, T. Kimura, S. J. Green, et al. 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263:1612.
41. Martin, E., C. Nathan, and Q. W. Xie. 1994. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 180:977.
42. Merika, M., and D. Thanos. 2001. Enhanceosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:205.
43. Johnson, K. M., K. Mitsouras, and M. Carey. 2001. Eukaryotic transcription: the core of eukaryotic gene activation. *Curr. Biol.* 11:R510.
44. Chang, Y. J., M. J. Holtzman, and C. C. Chen. 2002. Interferon- γ -induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion: involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway. *J. Biol. Chem.* 277:7118.
45. Deb, D. K., A. Sassano, F. Lekmine, B. Majchrzak, A. Verma, S. Kambhampati, S. Uddin, A. Rahman, E. N. Fish, and L. C. Platanias. 2003. Activation of protein kinase C δ by IFN- γ . *J. Immunol.* 171:267.
46. Ivaska, J., L. Bosca, and P. J. Parker. 2003. PKC ϵ is a permissive link in integrin-dependent IFN- γ signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat. Cell Biol.* 5:363.