

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**L'EFFET DE L'INHIBITION DE LA MATURATION DU PHAGOSOME PAR LE
LPG DE *L. DONOVANI* SUR LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE VIA LE
CMH II CHEZ LE MACROPHAGE**

Par
François D'Amour

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne :	Claude Daniel INRS-Intitut Armand-Frappier
Examineur externe :	Barbara Papadopoulou Université Laval
Examineur externe :	Albert Descoteaux INRS-Intitut Armand-Frappier

Résumé

La leishmaniose viscérale est une maladie parasitaire qui touche environ 12 millions de personnes. Malheureusement, il n'existe encore aucun vaccin efficace pour immuniser les populations à risque, retrouvées principalement en Amérique centrale et du sud, en Afrique de l'est et en Inde. L'agent causal, le protozoaire *Leishmania donovani*, entraîne des lésions au foie, à la rate et à la moelle osseuse qui peuvent être mortelles si elles ne sont pas traitées.

Pour établir l'infection, la forme promastigote de *L. donovani* réussit entre autres à résister à l'action antimicrobienne des macrophages en survivant à l'intérieur des phagosomes. Pour ce faire, le promastigote bloque de façon localisée la maturation du phagosome, empêchant ainsi l'acquisition de différentes molécules microbicides par ce compartiment. Il a été démontré que le lipophosphoglycan (LPG), une molécule abondamment retrouvée à la surface du promastigote, entraîne ce défaut de la maturation du phagosome chez le macrophage.

Certaines études ont aussi démontré que *Leishmania* peut aussi nuire à la présentation antigénique via le CMH II chez le macrophage. Or, tous les processus nécessaires à la digestion, à l'apprêtement et à la présentation antigénique via la CMH II peuvent se dérouler dans le phagosome.

L'hypothèse de ce travail est que l'altération de la maturation du phagosome par le LPG peut mener à une diminution de la présentation antigénique via la CMH II chez le macrophage. En ralentissant l'acquisition de nombreuses molécules au phagosome suite à la phagocytose, le LPG pourrait nuire à la destruction du parasite ainsi qu'à la présentation de ses antigènes.

Pour vérifier l'impact du LPG sur la présentation antigénique via le CMH II chez le macrophage, nous avons procédé à des expériences de présentation antigénique en

utilisant l'antigène modèle OVA₃₂₃₋₃₃₉. Pour ce faire, nous avons produit des promastigotes de type sauvage et déficients en phosphoglycans (*lpg2* KO) qui sécrètent une forme tronquée de l'ovalbumine (OVA_t). Des particules de zymosan recouvertes d'ovalbumine et de LPG ont aussi servi à vérifier la capacité des macrophages à présenter OVA₃₂₃₋₃₃₉.

Les résultats démontrent que les promastigotes de type sauvage et *lpg2* KO qui sécrètent le OVA₃₂₃₋₃₃₉ n'entraînent pas l'activation des hybridomes de cellules T spécifiques à l'antigène. L'utilisation de particules de zymosan recouvertes de LPG n'a pas non plus montré d'impact de ce glycoconjugué sur la présentation antigénique. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG n'entraîne pas d'altération de la présentation antigénique via le CMH II chez le macrophage.



François D'Amour



Albert Descoteaux

Remerciements

Je souhaite grandement remercier mon directeur de maîtrise, M. Albert Descoteaux, pour ses conseils scientifiques mais aussi pour sa grande patience et sa compréhension. Je lui en suis très reconnaissant.

Je tiens également à saluer et à remercier chaleureusement tous mes collègues de laboratoire côtoyés au fil du temps, avec qui j'ai partagé de nombreux moments de plaisir de folie et de science bien sûr. Robert, John, Jean-Fred, PO, CriCri, Adrien et Tamsir, vous m'avez particulièrement marqué et je vous souhaite le plus grand des bonheurs, que ce soit ici ou ailleurs dans le monde!

Pour sa précieuse aide en microscopie confocale, je remercie M. Marcel Desrosiers. Je remercie également les professeurs Sam Turco, Jacques Thibodeau et Claude Daniel pour leur contribution en LPG, macrophages Raw CIITA et en cellules CTLL respectivement.

Mme Suzanne Lemieux, je vous remercie également pour votre support, votre écoute et vos conseils. C'est en partie grâce à vous si je pratique maintenant un métier qui me passionne et me comble.

Sur une note plus amicale, comment passer sous silence les liens que j'ai tissés avec trois grands amis : Simon, Iohann et Nicolas. *You rock!*

Finalement, cette maîtrise m'aura permis de rencontrer la personne que j'aime, Maude Bigras. Merci pour ton support, tes encouragements et ta patience, tu es merveilleuse.

Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières.....	vi
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	x
Introduction.....	1
Revue de littérature.....	4
1. Le macrophage.....	5
1.1 La phagocytose	6
1.1.1 La reconnaissance des particules à phagocyter.....	6
1.1.2 La formation du phagosome	9
1.1.3 La maturation du phagosome.....	11
1.1.4 La digestion.....	14
2. La présentation antigénique.....	16
2.1 La présentation antigénique via le CMH II.....	16
2.1.1 La génération des peptides immunogènes	17
2.1.1.1 L'asparaginylyl endoprotéase (AEP).....	17
2.1.1.2 La thiol réductase lysosomale induite par l'IFN- γ (GILT).....	18
2.1.1.3 Les cathepsines	18
2.1.2 CMH II.....	20
2.1.3 La chaîne invariante Ii	21
2.1.4 Le chargement de l'antigène.....	23
2.1.4.1 Lieu de rencontre antigène-CMH II.....	24
2.1.4.2 Le chargement du peptide.....	25
2.1.5 Transport et présentation aux cellules T CD4 ⁺	26
2.1.6 L'implication des radeaux lipidiques.....	27
2.1.7 Le phagosome comme organelle présentateur d'antigènes	28
2.2 Conclusion	29
3. Leishmania.....	30
3.1 Le cycle de vie de <i>Leishmania</i>	30
3.2 La réponse immunitaire face à <i>Leishmania</i>	31
3.3 Les glycoconjugués de surface des promastigotes.....	32
3.3.1 Le LPG et les mécanismes d'évasion	33
3.3.1.1 Interaction avec le système du complément	33
3.3.1.2 L'entrée silencieuse dans le macrophage.....	34
3.3.1.3 Inhibition de la maturation du phagosome.....	36
3.3.1.4 Altération des radeaux lipidiques.....	38
4. Inhibition de la présentation antigénique par <i>Leishmania</i>	40
4.1 L'importance du stade de différenciation de <i>Leishmania</i>	40
4.2 La caractérisation du phagosome contenant <i>Leishmania</i>	41

4.3	Les molécules de co-stimulation et <i>Leishmania</i>	42
4.4	Altération de la synapse immunologique efficace par <i>Leishmania donovani</i> ..	43
Matériel et méthode		46
1.	Culture cellulaire	47
1.1	Macrophages	47
1.2	<i>Leishmania</i>	47
1.3	DO.11.10.....	48
1.4	CTLL.....	48
2.	Isolement de macrophages	49
2.1	Macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM)	49
2.2	Macrophages péritonéaux	50
3.	Transfection de <i>Leishmania</i> par électroporation	50
4.	Détection par immunoprécipitation de la production d'ovalbumine tronquée (OVAt) par <i>Leishmania</i>	51
4.1	Incorporation de la méthionine marquée au [³⁵ S] dans les promastigotes et préparation des échantillons.....	51
4.2	Immunoprécipitation d'OVAt.....	52
4.3	Électrophorèse sur gel SDS-PAGE et détection d'ovalbumine.....	53
5.	Oponisation de particules avec de l'ovalbumine	54
5.1	Préparation des billes de latex recouvertes d'ovalbumine.....	54
5.2	Oponisation de promastigotes avec de l'ovalbumine.....	54
5.3	Oponisation d'ovalbumine sur des particules de zymosan	55
6.	Détection de la présence d'ovalbumine chez les promastigotes transfectés et recouverts d'ovalbumine par immunobuvardage de type Western.....	55
6.1	Lysats cellulaires de <i>Leishmania</i>	56
6.2	Dosage des protéines BCA (Pierce, Rockfort, IL).....	56
6.3	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) et transfert sur membrane de nitrocellulose	56
6.4	Immunobuvardage de type Western	57
7.	Détection de l'accumulation d'actine périphagosomale par immunofluorescence	57
7.1	Préparation des particules de zymosan recouvertes de LPG	58
7.2	Internalisation des particules de zymosan par les macrophages.....	58
7.3	Détection de l'accumulation d'actine périphagosomale chez le macrophage par immunofluorescence.....	59
8.	Quantification de la présentation antigénique	59
8.1	Infection des macrophages.....	60

8.2	Expériences d'activation des hybridomes DO.11.10.....	60
9.	Comptes d'internalisation des promastigotes par les macrophages	61
	Résultats	63
1.	La phagocytose de promastigotes par les macrophages n'entraîne pas une diminution de la présentation d'OVA₃₂₃₋₃₃₉ adhérent à des billes de latex.....	64
2.	Expression d'une forme tronquée de l'ovalbumine (OVAt) par <i>L. donovani</i> ...	66
3.	Les macrophages infectés par des promastigotes exprimant une forme sécrétée d'OVAt n'induisent pas l'activation des cellules DO.11.10.....	68
4.	La présence de LPG sur des particules de zymosan n'altère pas la présentation antigénique par le macrophage.....	70
5.	Les promastigotes de type sauvage et <i>lpg2</i> KO recouverts d'ovalbumine n'altèrent pas la présentation antigénique par les macrophages	73
	Discussion.....	79
	Conclusion	91
	Liste de références.....	93

Liste des figures

Figure 1: Les récepteurs membranaires des macrophages et leurs ligands	7
Figure 2: La phagocytose engendrée par les récepteurs Fc	10
Figure 3: La maturation du phagosome	13
Figure 4: La structure de la chaîne invariante Ii associée au CMH II	21
Figure 5: La dégradation de la chaîne invariante.....	23
Figure 6: Modèle du rôle des radeaux lipidiques dans la présentation antigénique	27
Figure 7: Structure moléculaire du LPG.....	32
Figure 8: Le lipophosphoglycan et les autres molécules de surface apparentées au LPG des promastigotes de <i>L. donovani</i> de type sauvage et <i>lpg2 KO</i>	35
Figure 9: L'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG.....	38
Figure 10: La désorganisation des microdomaines lipidiques par le LPG	39
Figure 11. Niveaux d'incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTLL mises en contact avec des surnageants de cellules DO.11.10 incubées avec des macrophages RAW 264.7 <i>CIITA</i> non infectés et infectés.	65
Figure 12. Expression d'OVA _t par des promastigotes de type sauvage et déficients en phosphoglycans. A,.....	67
Figure 13. Niveaux d'incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTLL mises en contact avec des surnageants de cellules DO.11.10 incubées avec des macrophages infectés par des promastigotes.	69
Figure 14. Immunomarquage de la F-actine chez des BMM ayant internalisés des particules de zymosan.	71
Figure 15. Niveaux d'incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTLL mises en contact avec des surnageants de cellules DO.11.10 incubées avec des macrophages ayant internalisé des particules de zymosan recouverte de LPG.	72
Figure 16. Détection de l'ovalbumine et de sa forme tronquée chez des promastigotes de type sauvage et mutants <i>lpg2 KO</i>	74
Figure 17. Les macrophages n'ont pas la même avidité de phagocytose pour les promastigotes de type sauvage que pour les mutants <i>lpg2 KO</i>	76
Figure 18. Niveaux d'incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTLL mises en contact avec des surnageants de cellules DO.11.10 incubées avec des macrophages ayant internalisé des promastigotes pré-incubés avec de l'ovalbumine.	Erreur ! Signet non défini.

Liste des abréviations

⁰C : degré Celsius

ADN : acide désoxyribonucléique

AEP: aspaginyl endoprotéase

ARN : acide ribonucléique

BCR: *B-cell receptor for Ag*

BMM: *bone marrow-derived macrophage*

CIITA: *class-II transactivator*

CLIP: *class II-associated invariant-chain peptide*

CMH I: molécule de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité

CMH II: molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

CSF: *colony-stimulating factor*

CTL : *cytotoxic T-lymphocytes*

DAG: diacylglycérol

DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium*

EEA1: *early endosome antigen 1*

Fc: fragment Fc de la molécule d'Ig

FcR: récepteur de fragment Fc

GILT: *gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase* (thiol réductase lysosomale induite par l'IFN-gamma)

GIPL: phospholipides glycoinositol

HBSS: *Hanks' balanced salt solution*

HEL: *hen egg lysozyme*

IFN: interféron

Ig: immunoglobuline

IgG: immunoglobuline G

IL : interleukine

iNOS: *inducible nitric oxide synthase*

kDa : kilodalton

LACK: *Leishmania* homologue of receptors for Activated C Kinase
LAMP: *lysosomal-associated membrane proteins*
LCM: *cell-conditioned medium*
LPG: lipophosphoglycan
LPS : lipopolysaccharide
MAPK: *Mitogen-Associated Protein Kinases*
MARCKS: *myristoylated alanine-rich C kinase substrate*
MBP: *myelin basic protein*
MCP: *Membrane Cofactor Protein*
MIIC: *MHC-II compartments*
MOI : *multiplicity of infection*
NO: *nitric oxide*
NRAMP: *natural resistance-associated macrophage protein*
OVAt: ovalbumine tronquée exprimée par les promastigotes de *L. donovani* pKS NEO-PS-OVA
OVA₃₂₃₋₃₃₉ : épitope de la protéine ovalbumine chargé sur le CMH II
PAMPs : *pathogen-associated molecular patterns*
PBMC: *peripheral blood mononuclear cell* (cellules mononucléées du sang périphérique)
PG: phosphoglycan
PI-3K: phosphatidylinositol-3 kinase
PPG: protéophosphoglycan
PS: peptide signal
RE: réticulum endoplasmique
ROS: *reactive oxygen species* (composés oxydants réactifs)
sAP: acides phosphatases sécrétées
TCR: *T-cell receptor for Ag*
TfR: *Transferrin receptor*
TNF : tumor necrosis factor
v/v : volume/volume
µg : microgramme
µl : microlitre

Introduction

Leishmania donovani, agent causal de la leishmaniose, est un protozoaire transmis aux mammifères sous sa forme promastigote. Une fois phagocyté par un macrophage, le promastigote réussit à survivre à l'environnement hostile du phagosome pour ainsi devenir amastigote. C'est sous sa forme amastigote que *L. donovani* se multipliera et infectera d'autres macrophages pour engendrer la maladie.

Le lipophosphoglycan (LPG), un glycoconjugué de surface très abondant chez le promastigote de *L. donovani*, permet la survie du parasite en inhibant de façon transitoire la maturation du phagosome (Desjardins and Descoteaux, 1997; Dermine *et al.*, 2000). Dans les moments suivants la phagocytose du promastigote, le LPG empêche la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs et les lysosomes, et ce de façon localisée (Desjardins and Descoteaux, 1997; Dermine *et al.*, 2000). Cette altération de la maturation du phagosome permet au promastigote d'éviter l'effet microbicide de l'acidité et des enzymes hydrolytiques retrouvées dans le phagolysosome.

Un autre des effets observés chez *Leishmania donovani* est sa capacité à altérer la présentation antigénique via le CMH II. Cette inhibition est surtout remarquée lors d'infections par des amastigotes (Courret *et al.*, 1999; Prina *et al.*, 1996). Toutefois, une équipe a démontré dernièrement que les promastigotes de *L. donovani* pouvaient également nuire à la présentation antigénique chez le macrophage en altérant les radeaux lipidiques (Chakraborty *et al.*, 2005).

Il a été démontré que le phagosome est un organelle capable d'apprêter et présenter les antigènes. En interagissant avec les endosomes, le phagosome acquiert rapidement toute la machinerie qui lui permet d'apprêter et de charger l'antigène sur le CMH II, si bien que quelques minutes après la phagocytose, des antigènes sont déjà exposés à la surface du macrophage (Ramachandra *et al.*, 1999).

L'hypothèse de notre laboratoire est que l'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG de *L. donovani* pourrait mener à une altération de la présentation antigénique via le CMH II chez le macrophage. En empêchant la fusion d'endosomes tardifs et de lysosomes avec le phagosome, le LPG inhiberait l'acquisition d'enzymes hydrolytiques permettant la digestion du promastigote et donc son apprêtement.

Ce projet avait donc comme objectif d'étudier l'effet du LPG sur la présentation antigénique de façon localisée au phagosome. Pour ce faire, nous avons procédé à des expériences de présentation antigénique dans le contexte du CMH II en utilisant comme variable la présence de LPG à la surface de diverses particules phagocytées.

En premier lieu, nous avons démontré que lorsque des macrophages sont infectés à la fois par des promastigotes et des billes de latex recouvertes d'ovalbumine, la présentation antigénique ne semble pas affectée. Ces résultats vont dans le sens du concept d'inhibition de la maturation phagosomale localisée par le LPG, puisque les macrophages réussissent à présenter l'antigène malgré la présence de promastigotes.

Pour étudier l'effet du LPG sur la présentation antigénique de manière localisée au phagosome, nous avons ensuite produit des promastigotes de type sauvage et déficients en phosphoglycans capables de sécréter une forme tronquée de l'ovalbumine (OVAt). Ces promastigotes ont été incubés sur des périodes variant de 2 h à 8 h avec des macrophages avant d'évaluer la sécrétion d'IL-2 par des hybridomes de cellules T spécifique au complexe peptide-CMH II. Avec les deux types de promastigotes, nous n'avons pas détecté de sécrétion d'IL-2, signe d'une présentation antigénique inefficace ou à tout de moins indétectable. Ces résultats peuvent suggérer deux choses : d'une part que la sécrétion d'OVAt par les promastigotes transfectés pourrait être insuffisante pour engendrer une présentation antigénique. D'autre part, il se pourrait qu'une molécule autre que le LPG puisse être responsable de l'inhibition de la présentation antigénique.

En incubant des particules de zymosan avec de l'ovalbumine et du LPG, nous avons cette fois-ci détecté une présentation antigénique. Toutefois, la présence de LPG

sur les particules n'a pas eu d'effet inhibiteur sur la capacité des macrophages à présenter les antigènes. Des résultats similaires ont été obtenus suite à la phagocytose de promastigotes recouverts d'ovalbumine.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG n'entraîne pas d'altération de la présentation antigénique via le CMH II chez le macrophage. Il serait intéressant dans le futur d'investiguer l'effet du LPG sur la présentation d'antigènes administrés de façon soluble. Le LPG entraîne l'altération des radeaux lipidiques au phagosome (Dermine *et al.*, 2005). Or, l'utilisation de promastigotes déficients en phosphoglycans permettrait peut-être d'identifier le LPG comme étant la cause de l'inhibition de la présentation antigénique par l'altération des radeaux lipidiques (Chakraborty *et al.*, 2005).

Chapitre 1

Revue de littérature

1. Le macrophage

C'est dans ses travaux sur l'étoile de mer qu'un des pionniers de l'immunologie, Elie Metchnikoff, a décrit pour la première fois la capacité à ingérer et digérer des microorganismes par un type cellulaire qu'il a nommé macrophage. Il croyait à l'époque que toutes les défenses de l'hôte résidaient dans la défense naturelle des macrophages. Il est aujourd'hui évident que le rôle du macrophage dans l'immunité va bien au-delà de cette théorie. Ce type cellulaire est impliqué tant au niveau de l'immunité innée qu'adaptative pour favoriser le bon fonctionnement de notre organisme.

Les macrophages prennent naissance dans la moelle osseuse, lieu où l'on distingue les premières cellules associées à la lignée des monocytes, les monoblastes. Ces cellules se divisent et se différencient en promonocytes, qui elles ont un dernier cycle de division cellulaire avant de devenir des monocytes. Ce processus prend de deux à trois jours avant que les monocytes ne soient ensuite emportés dans la circulation sanguine. Après environ 18 heures dans le sang, les monocytes circulants se différencient en macrophages en se logeant dans les tissus. Cette étape est caractérisée par une augmentation de la taille de la cellule, une augmentation du nombre et de la complexité des organelles, ainsi que par une production accrue d'enzymes hydrolytiques. L'activation du macrophage est l'étape finale de différenciation. Selon les signaux reçus, ce leucocyte mononucléaire verra ses caractéristiques morphologiques et biochimiques varier afin de répondre de manière spécifique au besoin de l'organisme.

Les rôles du macrophage sont multiples. Tout d'abord, ils forment une véritable barrière contre les microorganismes pathogènes grâce à leurs propriétés antivirales et antimicrobiennes en plus de posséder des capacités antitumorales. Ils sont capables d'éliminer, sans activation préalable, une variété de microorganismes grâce à une suite d'évènements suivant la phagocytose, processus décrit plus loin. Ils agissent également comme nettoyeurs du système en phagocytant les corps apoptotiques et sont capables de remodeler des tissus. En sécrétant une multitude de cytokines et de chimiokines, ils peuvent aussi réguler la prolifération et l'activation de divers types cellulaires et ainsi

jouer un rôle de régulateur de l'immunité adaptative. L'importance du macrophage dans l'immunité adaptative réside surtout dans sa capacité à apprêter les antigènes et à les présenter. La présentation antigénique est un phénomène complexe et crucial dans la reconnaissance de microorganismes pathogènes ou de cellules tumorales par le système immunitaire.

1.1 La phagocytose

La phagocytose est l'internalisation active de particules supérieures à 0,5 μm dans des vésicules spécialisées, appelées phagosomes, suite à la formation de pseudopodes par la cellule. Par comparaison, des mécanismes tels que la pinocytose et l'endocytose impliquent plutôt l'internalisation de fluides, de particules solubles, de macromolécules, de virus ou de petites particules et n'impliquent pas la repolymérisation des filaments de F-actine au site d'internalisation. À la suite d'interactions avec le système endocytair, les phagosomes deviendront des phagolysosomes. Ces organelles sont capables de dégrader la particule étrangère ou le corps apoptotique internalisé. Les différents types cellulaires ne phagocytent pas tous avec la même efficacité. Selon le degré d'aptitude à phagocyter, les cellules peuvent être classées comme phagocytes « non-professionnels », « paraprofessionnels » ou « professionnels », ces derniers étant représentés par les neutrophiles et les monocytes/macrophages (Rabinovitch, 1995).

Les phénomènes caractérisant la phagocytose peuvent être divisés comme suit : la reconnaissance des particules à phagocyter, la formation du phagosome, la maturation du phagosome en phagolysosome et finalement, la digestion des particules internalisées.

1.1.1 La reconnaissance des particules à phagocyter

La première étape menant à la phagocytose est la reconnaissance d'un ligand à la surface d'une particule par un récepteur spécifique du macrophage. Les macrophages peuvent reconnaître ces ligands directement ou via leur interaction avec des molécules de l'hôte facilitant la reconnaissance, les opsonines (Figure 1). Les cellules eucaryotes ont

développé au cours de l'évolution des manières de distinguer le soi du non-soi. Une d'entre elles est d'exprimer des récepteurs capables de reconnaître spécifiquement des motifs conservés retrouvés uniquement chez les microorganismes pathogènes (Aderem, 1999). Ces motifs, appelés « PAMPs », pour *pathogen-associated molecular patterns* (Janeway, 1992), sont reconnus par des récepteurs spécifiques qui initient la phagocytose subséquente à la liaison. Parmi les molécules typiquement reconnues, on retrouve entre autres les lipopolysaccharides (LPS), les résidus mannoses et les acides lipoteichoïques. Toutes ces molécules sont retrouvées à la surface de levures ou de bactéries. Il a par exemple été démontré que les récepteurs mannose se lient aux motifs du même nom, et que des intégrines et des récepteurs de type scavenger reconnaissent le LPS (Stahl, 1998; Sastry and Ezekowitz, 1993).

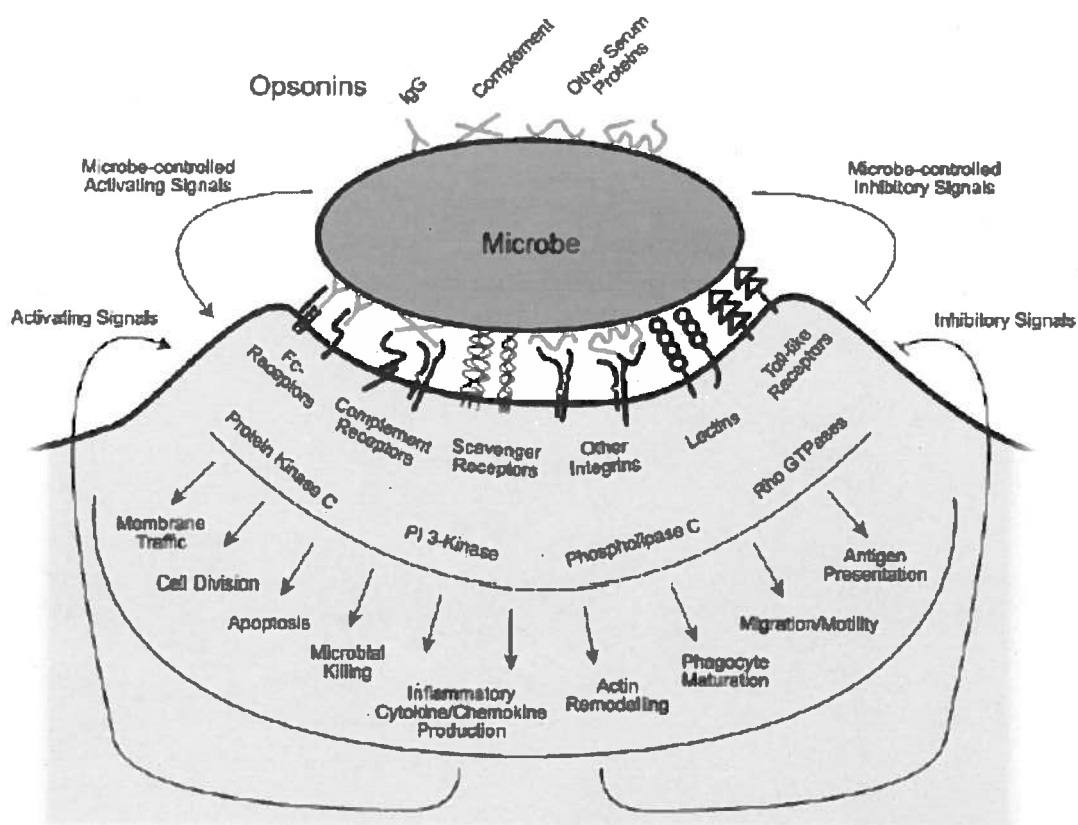


Figure 1: Les récepteurs membranaires des macrophages et leurs ligands (Underhill et Ozinsky, 2002)

Pour accentuer la reconnaissance des microorganismes pathogènes, les humains produisent diverses opsonines. Les opsonines s'associent aux particules étrangères pour ainsi permettre la liaison d'une multitude de molécules via quelques récepteurs seulement. Les opsonines les mieux caractérisées sont principalement la sous-unité C3bi du système du complément et l'immunoglobuline G (IgG). Dans le sérum, le fragment C3bi se lie de façon non-spécifique aux hydrates de carbone à la surface des microorganismes pathogènes et se fixe aux différents récepteurs du complément, comme le CR1, CR3 et CR4, qui sont exprimés en surface du macrophage (Carroll, 1998; Sengelov, 1995). Les récepteurs du complément démontrent bien la complexité reliée aux premières étapes de la phagocytose. En effet, différents récepteurs, bien qu'ils soient de la même famille et qu'ils aient des ligands similaires, peuvent jouer des rôles différents. Par exemple, le CR1 lie le C3b, C4b et le C3bi et participe à la liaison (Brown, 1991) alors que les récepteurs le CR3 et le CR4 se fixent spécifiquement au C3bi pour plutôt mener à l'internalisation de la particule (Sengelov, 1995). D'autre part, les IgG fixées à leur particule spécifique sont liées et internalisées via leur domaine Fc par la famille des récepteurs Fc (FcRs) (Ravetch and Clynes, 1998; Ravetch, 1997; Unkeless *et al.*, 1995). Des équipes ont transfecté des phagocytes non professionnels pour qu'ils puissent exprimer différents FcRs et les molécules intracellulaires associées. Ces études ont démontré que la présence de ces complexes améliorerait grandement la capacité phagocytaire de ces cellules (Caron and Hall, 1998; Indik *et al.*, 1995; Nagarajan *et al.*, 1995). Les CRs et les FcRs ne sont que deux exemples de récepteurs que le macrophage utilise pour reconnaître et internaliser les particules étrangères et les déchets de la circulation. La reconnaissance de motifs communs et l'opsonisation des particules permettent donc la phagocytose d'une grande variété de particules malgré la diversité limitée de récepteurs en surface du macrophage. Ainsi, la liaison du ligand à son récepteur mène au processus actif de polymérisation de la F-actine, phénomène qui caractérise la phagocytose par rapport aux autres modes d'internalisation.

1.1.2 La formation du phagosome

Suite à la liaison d'un récepteur à son ligand, des voies de signalisation sont activées pour mener à une réorganisation de la F-actine. Ce phénomène permet l'extension des pseudopodes jusqu'à la formation du phagosome. Toutefois, les cascades de signalisation et les événements qui en dépendent diffèrent selon le type de récepteur activé (Allen and Aderem, 1996a; Allen and Aderem, 1996b; Newman *et al.*, 1991). Par exemple, la phagocytose initiée par le récepteur Fc γ est accompagnée d'une importante extension des pseudopodes, tandis que l'association d'un CR avec une particule opsonisée par le complément est engloutie en ne formant que des pseudopodes très réduits lorsqu'ils sont présents (Kaplan, 1977). De plus, la phagocytose engendrée par le Fc γ R entraîne l'activation de signaux inflammatoires alors que celle régulée par le CR est silencieuse. Ces différences seraient dues à l'implication des petites GTPases de la famille Rho, soit Rac1 et Cdc42 dans le cas du Fc γ R, et RhoA pour le CR (Caron and Hall, 1998). Ces dogmes de l'immunologie ont toutefois été remis en question par une équipe qui a observé la formation de pseudopodes allongés et l'implication de RhoA et de Rac avec les deux types de récepteurs chez des macrophages dérivés de la moelle osseuse (Hall *et al.*, 2006). L'utilisation de macrophages dérivés de la moelle osseuse par rapport à des macrophages péritonéaux ou immortalisés pourrait expliquer ces différences. Des études seront nécessaires pour approfondir et peut-être confirmer cette hypothèse.

La meilleure description des événements intracellulaires menant à la formation du phagosome concerne le cas de la phagocytose impliquant le récepteur Fc (Figure 2). Il existe chez l'humain trois types de Fc γ R qui régulent la phagocytose, soit Fc γ RI, Fc γ RIIA et Fc γ RIII (Ravetch, 1997). Suite à la liaison du fragment Fc avec son récepteur, une protéine tyrosine kinase de la famille des Src kinases phosphoryle les domaines ITAM associés aux récepteurs (Greenberg, 1995; Ghazizadeh *et al.*, 1994). Ces domaines ITAMs phosphorylés recrutent des tyrosines kinases de la famille des Syk, telles que p72Syk. Suite à sa phosphorylation, p72Syk peut activer diverses voies de signalisation menant entre autres au réarrangement du cytosquelette et à la production de médiateurs de l'inflammation (Ghazizadeh *et al.*, 1995; Greenberg, 1995; Ravetch, 1994;

Agarwal *et al.*, 1993; Kiener *et al.*, 1993). Parmi les effecteurs responsables du réarrangement des filaments de F-actine lors de la phagocytose, notons l'implication des petites GTPases de la famille Rho (Hall, 1998), de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) (Araki *et al.*, 1996; Ninomiya *et al.*, 1994), de la protéine kinase C (PKC) (Allen and Aderem, 1995a; Allen and Aderem, 1995b; Zheleznyak and Brown, 1992) et de différents isoformes de myosine (Swanson *et al.*, 1999). Ces molécules permettent le recrutement de filaments de F-actine à la coupe phagocytaire, de former des pseudopodes et de fusionner pour créer le phagosome. Il est important de se souvenir que les phénomènes intracellulaires suivant la phagocytose sont étroitement liés à la nature du récepteur. Il sera donc intéressant de voir dans les années à venir dans quelles mesures les voies de signalisation menant à la réorganisation de la F-actine diffèrent suite à la liaison de récepteurs autres que celui des fragments Fc des Igy.

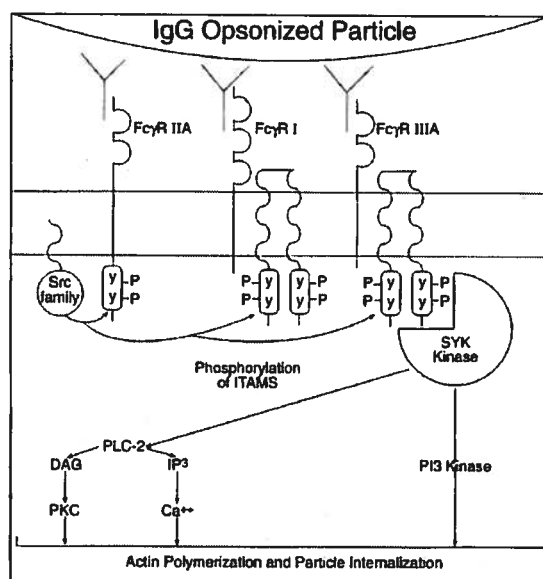


Figure 2: La phagocytose engendrée par les récepteurs Fc
(Aderem et Underhill, 1999)

Les macrophages sont capables de phagocyter des particules de taille impressionnante sans altérer leurs fonctions cellulaires. Après la phagocytose, la surface de la membrane plasmique demeure intact, ou peut même grossir, malgré l'utilisation de membrane égale ou supérieure à la surface totale du macrophage (Hackam *et al.*, 1998;

Holevinsky and Nelson, 1998). L'équipe de Desjardins a proposé qu'il pouvait y avoir un apport du réticulum endoplasmique (RE). L'analyse protéomique de phagosomes contenant des billes de latex a démontré la présence de protéines normalement associées au (RE) de façon qualitative mais pas quantitative (Garin *et al.*, 2001). Des travaux plus approfondis du même groupe ont confirmé que le RE était recruté à la membrane plasmique sous la coupe phagocytaire pour ainsi permettre l'apport de membrane nécessaire à la phagocytose (Gagnon *et al.*, 2002). Toutefois, cette théorie a dernièrement été confrontée par d'autres, notamment l'équipe de Sergio Grinstein, qui avance que la membrane du phagosome ne provient pas principalement de RE mais plutôt d'endosomes et de la membrane plasmique (Touret *et al.*, 2005a,b). Dernièrement, une étude a comparé la présence relative de protéines venant du RE et de la membrane plasmique dans la membrane du phagosome. En faisant une analyse protéomique quantitative, ces chercheurs ont montré que 10 minutes après l'internalisation, les phagosomes étaient formés d'environ 10% de membrane plasmique et seulement de 0.2% de RE (Rogers and Foster, 2007). Donc, bien qu'une grande variété de protéines du RE soient retrouvées au phagosome, la majorité des protéines du phagosome proviennent toutefois d'endosomes de recyclage et de la membrane plasmique. Finalement, le phagosome nouvellement formé possède également des protéines provenant des mitochondries (Garin *et al.*, 2001; Burlak *et al.*, 2006; Gotthardt *et al.*, 2006; Okada *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2007). La formation du phagosome est donc un phénomène actif et complexe qui implique de nombreux phénomènes, structures et molécules.

Suite à sa formation, le phagosome subit une série d'évènements qui lui permet d'acquérir toute la machinerie nécessaire à sa fonction principale, soit la dégradation de la particule. Ce phénomène est la maturation du phagosome.

1.1.3 La maturation du phagosome

La maturation du phagosome est caractérisée par la diminution progressive du pH de cet organelle et par l'acquisition de nombreuses enzymes. Le pH acide a pour effet de nuire à la survie des microorganismes phagocytés et d'activer les enzymes hydrolytiques.

Pour modifier sa composition, le phagosome nouvellement formé doit interagir avec les différents compartiments du réseau endosomal. Suite à l'internalisation de la particule, le phagosome perd rapidement ses marqueurs de surface membranaire et acquiert séquentiellement des marqueurs d'endosomes précoces, d'endosomes tardifs et de lysosomes (Figure 3) (Desjardins *et al.*, 1994a; Pitt *et al.*, 1992). Auparavant, l'hypothèse prédominante était que l'acquisition de ces marqueurs se faisait par fusion complète du phagosome avec les différentes vacuoles du réseau endosomal pour mener directement à la génération du phagolysosome (Rabinowitz *et al.*, 1992). Une telle hypothèse impliquerait une augmentation de la taille du phagosome, ce qui n'est toutefois pas observé en réalité. En chargeant des endosomes avec des particules d'or de tailles variées, Desjardins et ses collègues ont observé que les échanges entre les endosomes et les phagosomes se faisaient par des pores de fusion entre les compartiments et ce de manière sélective. Cela démontre du même coup qu'il n'y a pas de fusion complète entre le phagosome et les endosomes (Desjardins *et al.*, 1997). Selon ce modèle appelé « kiss and run », les différents endosomes transfèrent aux phagosomes une partie de leur contenu et de leurs marqueurs de surface spécifiques par une série de fusions et de fissions transitoires (Desjardins, 1995). Ces interactions séquentielles permettraient donc au phagosome d'acquérir les molécules nécessaires à sa maturation, sans toutefois causer une augmentation de la taille de cet organelle (Desjardins *et al.*, 1994b; Vieira *et al.*, 2002).

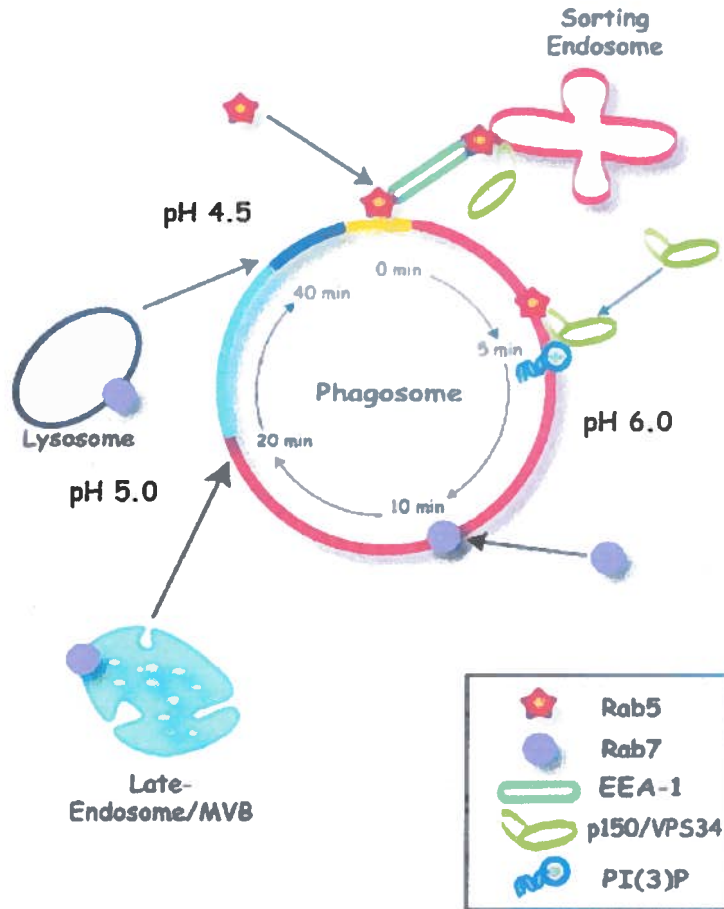


Figure 3: La maturation du phagosome

(Vieira *et al.*, 2002)

L'apport des constituants endosomaux aux phagosomes se fait de manière active et le phagosome guide ce phénomène en exprimant certains signaux spécifiques. Quelques instants après la phagocytose, les endosomes précoces interagissent avec le phagosome. Cette étape est caractérisée par la présence au phagosome du « *Early Endosome Antigen 1* » (EEA1), de la petite GTPase Rab5 et du « *Transferrin receptor* » (TfR), tous des marqueurs qui sont absents des endosomes tardifs et des lysosomes (Duclos *et al.*, 2000; Scianimanico *et al.*, 1999; Pitt *et al.*, 1992). Les événements de fusion/fission au cours de la biogénèse du phagolysosome seraient d'ailleurs sous le contrôle de petites GTPases comme Rab5, qui régulent l'apport des endosomes précoces (Duclos *et al.*, 2000). Suite à ces interactions, le phagosome a un pH d'environ 6.0 et

possède peu de protéases (Mukherjee *et al.*, 1997). Entre 10 et 30 minutes après la phagocytose, le phagosome fusionne avec les endosomes tardifs, ce qui réduit grandement sa capacité de fusionner avec les endosomes précoces (Fratti *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2001; de Chastellier and Thilo, 1997). Cette étape est caractérisée par un pH plus acide (environ 5.5) et la présence de Rab7, Rab9, du récepteur mannose-6-phosphate, d'acide lysobisphosphatidique et des « *lysosomal-associated membrane proteins* » (LAMPs) (Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000; Mukherjee *et al.*, 1997). Une heure après sa formation, le phagosome peut interagir avec les lysosomes. Cet échange permet l'acquisition d'un grand nombre de protéases et d'hydrolases, ainsi qu'une acidification marquée du contenu intraphagosomal (environ pH 4.5). Cet enrichissement enzymatique est accompagné des marqueurs LAMPs (Jahraus *et al.*, 1998).

La biogénèse du phagolysosome se fait de la membrane plasmique vers la région périnucléaire via son interaction avec les microtubules (Blocker *et al.*, 1997) mais les mécanismes exacts qui régulent les événements de fusion, de fission et de mouvements ne sont pas encore tous connus. Il existe plus de 600 molécules associées au phagosome (Stuart *et al.*, 2007) et il a même été démontré qu'il y avait des différences dans la maturation de phagosomes distincts à l'intérieur d'une même cellule (Henry *et al.*, 2004). Les processus menant à la biogénèse du phagolysosome sont donc très complexes.

1.1.4 La digestion

La dégradation des particules étrangères dans le phagolysosome constitue un rôle-clé du macrophage puisque c'est ici que l'immunité innée et acquise se croisent. La digestion enzymatique qu'on y retrouve sert à détruire les microorganismes (immunité innée). Cette digestion permet également de générer les peptides qui seront présentés sur les molécules présentatrices d'antigènes (immunité acquise). Ce mécanisme est indispensable pour générer une réponse immunologique efficace contre l'envahisseur ayant échappé à l'immunité innée. De nombreux facteurs participent à la dégradation active des microorganismes pathogènes dans le phagolysosome. Quelques instants après

la formation du phagosome via le récepteur Fc γ , le macrophage produit des ions superoxydes réactifs suite à l'assemblage de la NADPH oxydase (DeLeo *et al.*, 1999; Gresham *et al.*, 1988), ce qui contribue à la destruction du microorganisme ingéré. De plus, le pH acide des phagolysosomes favorise l'activité hydrolytique de nombreuses hydrolases qui dégradent le microorganisme. Ces différentes enzymes présentes dans les phagolysosomes, principalement les cathepsines, jouent un rôle crucial dans le processus menant à la présentation antigénique via le CMH II, en dégradant séquentiellement les protéines en peptides immunogènes (apprêtement). La présentation antigénique est une fonction essentielle des macrophages puisqu'elle permettra l'activation du système immunitaire de manière à reconnaître et éliminer les microorganismes et les cellules exhibant des anomalies liées à la présence de virus ou de tumeurs.

2. La présentation antigénique

La présentation antigénique des peptides peut être divisée en deux grandes catégories : la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I), et la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II). Ces deux modes de présentation impliquent des molécules, des compartiments et des mécanismes totalement distincts. Classiquement, des peptides endogènes, issus soit de la cellule même ou de virus utilisant la machinerie cellulaire de l'hôte, sont dégradés dans le cytosol et chargés sur les CMH I dans le réticulum endoplasmique. Ces complexes sont ensuite exportés à la membrane pour être reconnus par des lymphocytes T CD8⁺. La majorité des cellules nucléées expriment des CMH I. Pour leur part, les peptides exogènes provenant du soi ou du non-soi se couplent aux CMH II à l'intérieur des vacuoles du réseau endosomal. Ces peptides proviennent de particules préalablement internalisées surtout par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B. Le CMH II, couplé à son peptide, migre à la membrane et est reconnu par les cellules T CD4⁺ pour engendrer l'activation de ces lymphocytes (Harding *et al.*, 1995; Unanue, 2002). Notons qu'entre ces deux voies classiques se glisse la présentation croisée, qui est caractérisée par l'apprêtement et la présentation d'antigènes exogènes via les CMH I (Groothuis and Neefjes, 2005; Ackerman and Cresswell, 2004).

Les prochaines sections traiteront des mécanismes menant à la présentation antigénique via le CMH II chez le macrophage.

2.1 La présentation antigénique via le CMH II

Pour présenter à sa surface des antigènes exogènes efficacement, les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles doivent dégrader les protéines internalisées en peptides. Ensuite, ces CPA doivent synthétiser les différentes molécules nécessaires à l'apprêtement et à la présentation des antigènes et orchestrer les mécanismes menant au chargement du peptide dans la poche peptidique du CMH II. C'est à ce moment que le

complexe CMH II-peptide pourra migrer à la surface et ainsi permettre l'interaction avec la cellule T CD4⁺.

2.1.1 La génération des peptides immunogènes

Suite à l'internalisation d'une particule par le macrophage, de nombreuses enzymes protéolytiques permettent à la cellule de générer des peptides qui peuvent potentiellement être liés aux CMH II, une étape nommée apprêtement de l'antigène. Tel que discuté plus loin, certaines théories s'affrontent quant aux étapes exactes menant à la digestion des protéines et à leur liaison aux CMH II. En effet, il est généralement accepté que la génération des peptides se fait avant leur association au CMH II alors que des études plus récentes tendent à démontrer l'inverse. Peu importe la séquence d'actions, l'apprêtement des antigènes dans le réseau endosomal se fait par différentes endoprotéases, réductases, exopeptidases et endopeptidases. Parmi ces enzymes, les plus importantes sont l'asparaginyl endoprotéase (AEP), la thiol réductase lysosomale induite par l'IFN- γ (GILT) et certaines cathepsines.

2.1.1.1 L'asparaginyl endoprotéase (AEP)

Pour que les endopeptidases et les exopeptidases puissent digérer de larges fragments en petits peptides, d'autres enzymes doivent préalablement rendre accessibles les sites d'apprêtement. L'équipe de Watts a découvert que dans les cellules B humaines l'AEP initiait l'apprêtement de TTCF, un domaine carboxy-terminal de l'antigène de la toxine tétanique (Manoury *et al.*, 1998). Par ses clivages enzymatiques, cette endoprotéase spécifique à l'asparagine détruit la structure native de la protéine pour ainsi permettre l'exposition d'autres sites de clivages peptidiques. Une autre étude a permis de démontrer que la substitution d'une phénylalanine pour une asparagine dans le « *hen egg lysozyme* » (HEL) améliorait la présentation de l'antigène adjacent HEL₂₃₋₃₂ par un facteur de 10 (Schneider *et al.*, 2000). Toutefois, l'AEP peut également avoir un effet négatif sur la présentation antigénique, comme en témoigne son activité destructrice d'un

épitope immunodominant de la « *myelin basic protein* » (MBP), et peut également dégrader la chaîne invariante Ii (Manoury *et al.*, 2003; Manoury *et al.*, 2002).

2.1.1.2 La thiol réductase lysosomale induite par l'IFN- γ (GILT)

Comme son nom l'indique, GILT est induite par l'IFN- γ , ce qui laisse présager un rôle dans la présentation antigénique pour cette enzyme qui réduit les ponts disulfures et qui est retrouvée dans les endosomes contenant des CMH II (Arunachalam *et al.*, 2000). Cette enzyme du lysosome accélère le rythme de réduction des liens S-S à pH acide et pourrait donc également détruire les structures des protéines pour faciliter l'accès aux sites de clivages (Phan *et al.*, 2000). L'équipe de Cresswell a vérifié l'importance de GILT pour l'apprêtement d'antigènes en ayant recours à des cellules présentatrices d'antigènes provenant de souris déficientes pour cette enzyme. En absence de GILT, certains épitopes de HEL n'étaient pas reconnus par des hybridomes de cellules T spécifiques, confirmant ainsi l'apport essentiel de GILT pour la présentation antigénique (Maric *et al.*, 2001).

2.1.1.3 Les cathepsines

La majorité des protéases lysosomales appartiennent à la classe des cystéine ou des aspartate protéases. Chez les APCs, on retrouve les cathepsines B, H, L, S, F, Z, V, O, C et probablement la cathepsine K, qui font partie de la classe des cystéine protéases. Les aspartate protéases sont pour leur part représentées par les cathepsines D et E (Watts, 2001). La liste des cathepsines est longue, chacune d'entre elles ayant des substrats, des localisations et des modes d'action différents. Par exemple, certaines cathepsines peuvent cliver des peptides et aussi dégrader la chaîne invariante Ii. Cette dernière fonction sera abordée ultérieurement alors que les prochaines lignes s'attarderont aux cathepsines impliquées au niveau de l'apprêtement de l'antigène.

Les cathepsines sont synthétisées et importées dans le réticulum endoplasmique en tant que précurseurs protéolytiques puisqu'elles ne sont pas capables d'activité

enzymatique dans ces compartiments. Les enzymes passent ensuite par l'appareil de Golgi pour subir des modifications post-traductionnelles et sont finalement amenées aux vésicules du réseau endocyttaire en se liant à leurs récepteurs mannose-6-phosphate (Brown and Dziegielewska, 1997). Les pro-domaines protecteurs des cathepsines ont un rôle de chaperon en empêchant les cathepsines d'être actives dans le RE et dans le réseau golgien. Dans les endosomes plus acides, la dissociation des pro-domaines de leur enzyme génère la forme active des peptidases (Nishimura and Kato, 1987). Par exemple, les cathepsines de la famille des cysteine protéases ont à leur extrémité N-terminale un pro-domaine appelé « *propiece* ». Comme démontré chez les procathepsines B, L et K, le « *propiece* » occupe le site actif de l'enzyme et empêche ainsi l'activité protéolytique de ces enzymes dans l'appareil de Golgi et dans le RE (LaLonde *et al.*, 1999; Coulombe *et al.*, 1996; Turk *et al.*, 1996). Il permet également le repliement efficace, la stabilité et la sortie de la cathepsine L du RE (Tao *et al.*, 1994). Lorsque la cathepsine couplée à sa protéine chaperon arrive aux endosomes, le pH acide cause la dissociation du complexe permettant ainsi à l'enzyme d'être active (LaLonde *et al.*, 1999).

Les cathepsines B, D, E, L et H, que ce soit des endopeptidases, des carboxypeptidases ou des aminopeptidases, ont un rôle à jouer dans l'apprêtement des antigènes (Watts, 1997). Le rôle exact de chacune des cathepsines est difficile à déterminer *in vivo* puisqu'on retrouve de la redondance entre ces enzymes. Par exemple, en travaillant avec des souris déficientes en cathepsines B ou D, une équipe a observé qu'il n'y avait pas d'effet négatif sur la présentation antigénique lorsqu'il y avait absence de l'une ou de l'autre enzyme (Deussing *et al.*, 1998).

De concert avec les GILTs et les AEPs, les cathepsines dégradent les protéines du soi et du non-soi retrouvées dans les phagolysosomes pour générer des peptides qui seront chargés sur des CMH II. L'expression du CMH II, de la chaîne invariante Ii et de leurs molécules accessoires seront essentielles à la présentation antigénique.

2.1.2 CMH II

Membre de la superfamille des immunoglobulines, le CMH II est retrouvé chez les cellules présentatrices d'antigènes. Bien que le CMH II soit exprimé constitutivement par les CPAs, différents stimuli peuvent augmenter l'expression de cette molécule, et ce également chez d'autres types cellulaires. Classiquement, l'IFN- γ est considéré comme la cytokine la plus efficace pour engendrer cette augmentation. Suite à la liaison du récepteur de l'IFN- γ à son ligand, une cascade de signalisation mènera à la transcription du gène *CIITA* (Class-II TransActivator). Le co-activateur CIITA contrôle l'expression du CMH II en se fixant à un complexe nucléoprotéinique, appelé enhanceosome. Cette liaison initie la transcription des gènes menant à la production du CMH II (Reith and Mach, 2001; Masternak *et al.*, 2000).

Le CMH II est composé de deux chaînes polypeptidiques transmembranaires, une chaîne α de 33 kDa et une chaîne β de 28 kDa. Les chaînes α et β sont associées par des interactions non covalentes et sont formées de deux domaines externes chacune, soit $\alpha 1/\alpha 2$ et $\beta 1/\beta 2$ respectivement. Les domaines distaux $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment la cavité dans laquelle se fixe le peptide alors que les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ présentent une homologie de séquence avec la structure de repliement immunoglobulinique. La poche peptidique est composée d'un plancher de brins β antiparallèles et est bordée par deux hélices α antiparallèles provenant des deux chaînes. Ces structures forment ainsi une cavité ouverte où des peptides de longueur variable peuvent se lier (Madden, 1995; Brown *et al.*, 1993). Les haplotypes de CMH II diffèrent entre eux de quelques acides aminés seulement mais ces variations, concentrées surtout dans le domaine $\beta 1$, leur confèrent une spécificité de liaison propre aux peptides (Engelhard, 1994; Bell *et al.*, 1985).

Tel que discuté plus loin, les complexes majeurs d'histocompatibilité peuvent lier un très large spectre de peptides puisqu'ils reconnaissent des sites conservés au centre du peptide qui peuvent toutefois être flanqués de séquences d'acides aminés de longueur et de composition variables. Le CMH II est assemblé dans le RE et est amené, après un transit dans l'appareil de Golgi, au réseau endocyttaire grâce à la chaîne invariante Ii. Ce

chaperon est essentiel à la présentation antigénique en assistant le CMH II à partir de la formation de cet hétérodimère jusqu'à la liaison de l'antigène dans la cavité peptidique de celui-ci.

2.1.3 La chaîne invariante Ii

La chaîne invariante Ii est une glycoprotéine transmembranaire de type II non-polymorphe de 216 acides aminés. On peut diviser les domaines fonctionnels de cette molécule comme suit : un court segment cytoplasmique en N-terminal, un domaine transmembranaire, le « *Class-II-associated Ii peptide* » (CLIP) et un domaine en C-terminal, qui servira à la trimérisation de Ii (Figure 4, à gauche). Pour lier une molécule de CMH II, trois chaînes invariantes Ii doivent d'abord s'associer ensemble à la suite de leur translocation dans le RE. Toujours dans le RE, le trimère de chaînes invariantes peut ensuite se lier à trois molécules de CMH II pour ainsi former un polymère de neuf chaînes directement après la synthèse de ces molécules (Figure 4, à droite) (Busch and Mellins, 1996; Cresswell, 1996).

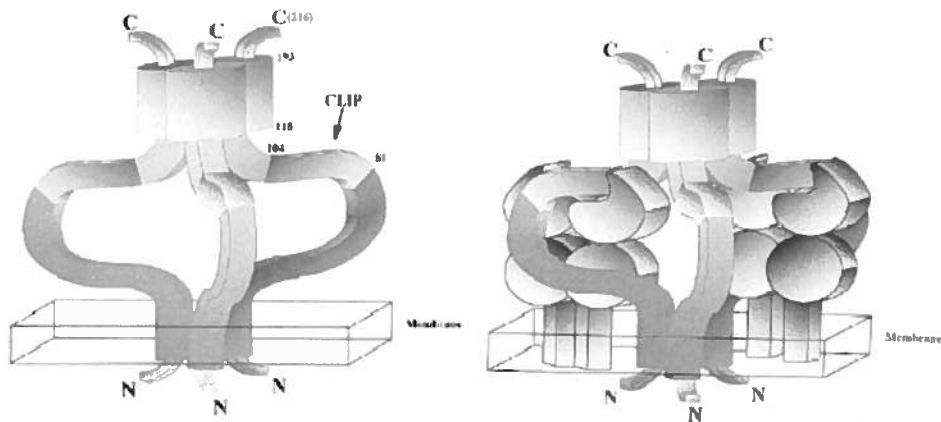


Figure 4: La structure de la chaîne invariante Ii associée au CMH II
(Cresswell, 1996)

L'association de la chaîne invariante Ii avec le CMH II ($\alpha\beta$ I) permettra à l'hétérodimère $\alpha\beta$ de conserver sa structure, d'être transporté vers les compartiments où le chargement de l'antigène a lieu et empêchera la liaison de peptides dans le réticulum endoplasmique.

Suite à la formation du complexe $\alpha\beta$ I dans le RE, des motifs di-leucine sur le domaine cytoplasmique de Ii ciblent le complexe vers les lysosomes surtout mais aussi vers les endosomes précoces et la membrane plasmique (Hiltbold and Roche, 2002). Différentes études ont d'ailleurs démontré qu'en l'absence de Ii, les CMH II s'accumulaient dans le RE et formaient des agrégats (Bonnerot *et al.*, 1994; Bikoff *et al.*, 1993). En dirigeant ainsi les CMH II vers différents compartiments, la cellule s'assure donc d'optimiser la rencontre avec les peptides qui y sont générés.

Dans les vésicules du réseau endocyttaire, la chaîne invariante Ii subit une dégradation enzymatique séquentielle, ne laissant à la fin que le CLIP dans la cavité peptidique du CMH II (Figure 5). Tout comme pour la digestion des antigènes, c'est principalement l'AEP qui initie la dégradation de la forme p31 à p22 (le terme Iip peut également être employé pour nommer ces fragments) de Ii. Pour ce faire, l'AEP cible les résidus asparagine sur les domaines carboxy-terminaux, là où la trimérisation a lieu. (Manoury *et al.*, 2003). Toujours dans une direction C-terminal vers N-terminal, la dégradation se poursuit grâce à l'AEP et à des cystéine et aspartyl protéases jusqu'à l'obtention du fragment p10. La digestion subséquente de p10 en CLIP témoigne bien des difficultés liées à l'étude des enzymes qui en sont responsables puisqu'il y a beaucoup de redondance d'activité chez les cathepsines. De plus, les inhibiteurs pharmacologiques de ces protéases ne sont pas tout à fait spécifiques et on ne retrouve pas les mêmes cathepsines chez tous les types cellulaires. Chez les cellules B et les cellules dendritiques dérivées de souris déficientes pour la cathepsine S, p10 n'est pas converti en CLIP. Ceci mène à l'accumulation du complexe CMH II-p10, démontrant le rôle-clé de la cathepsine S (Driessen *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 1999). Par contre, les macrophages déficients en cathepsines S et L sont capables de dégrader normalement p10, ce qui a mené à l'identification de la cathepsine F. Cette cathepsine a le même

substrat et compense pour l'absence des cathepsines S et L (Shi *et al.*, 2000; Santamaria *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998). Suite à la dégradation complète de Ii, seul le CLIP demeure associé au CMH II dans la niche peptidique, inhibant ainsi le chargement prématuré d'un peptide (Busch *et al.*, 1996). Le chargement du peptide implique deux autres molécules, DM et DO, qui modulent l'échange du CLIP pour un antigène dans la cavité du CMH II.

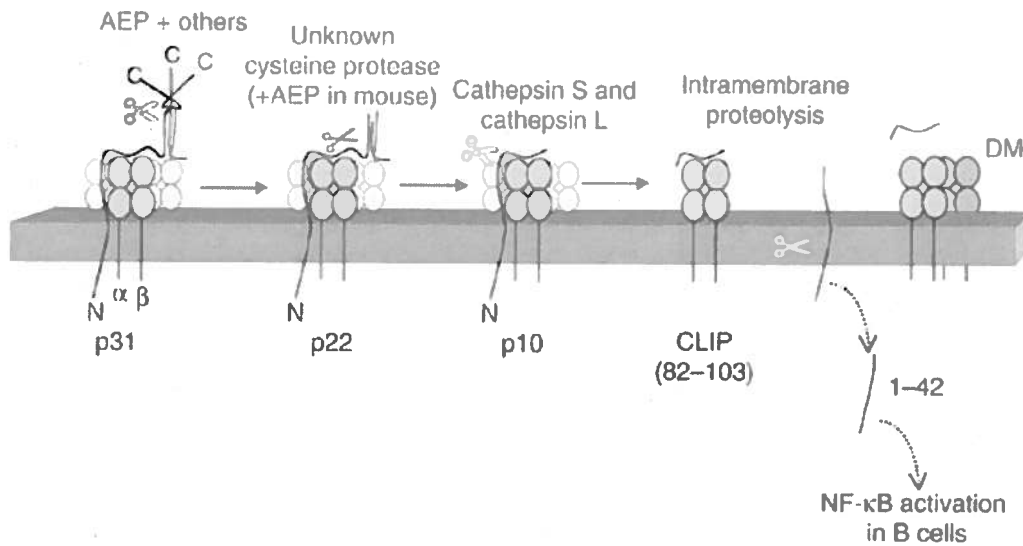


Figure 5: La dégradation de la chaîne invariante
(Watts, 2004)

2.1.4 Le chargement de l'antigène

L'antigène se lie de manière non-covalente dans la niche peptidique du CMH II, dans les vésicules du réseau endocyttaire. La molécule DM (HLA-DM chez l'humain et H2-DM chez la souris) catalyse l'échange du CLIP pour un peptide qui peut varier grandement en taille. Les prochaines lignes résumant comment se fait le chargement de l'antigène sur le CMH II.

2.1.4.1 Lieu de rencontre antigène-CMH II

On admet classiquement que les protéines sont d'abord apprêtées par les enzymes en peptides de longueur définie puis que ceux-ci sont chargés sur les CMH II dans des vésicules spécialisées, soit les MIIC (*MHC-II compartments*). Toutefois, en réalité les processus d'apprêtement et de chargement pourraient avoir lieu dans un ordre inversé et ce dans différents compartiments, que ce soit à un niveau précoce ou tardif de la maturation du phagosome. En effet, des antigènes différents de pleine longueur peuvent se lier à des CMH II à condition d'être préalablement réduits (Sette *et al.*, 1989). Cette séquence d'évènements pourrait permettre la préservation d'épitopes immunogènes en empêchant la destruction de ceux-ci par les nombreux facteurs qui gèrent la digestion peptidique, particulièrement aux stades tardifs de la maturation du phagosome. Les enzymes dégradent ensuite les résidus qui flanquent l'épitope, laissant seulement le peptide enfoui et protégé dans la cavité ouverte du CMH II (Mouritsen *et al.*, 1992).

De plus, la liaison de l'antigène à son CMH II peut avoir lieu dans de multiples compartiments du réseau endosomal (Castellino and Germain, 1995). Les endosomes tardifs possèdent un pH acide et de nombreuses enzymes, ce qui en fait le lieu de prédilection pour la formation de complexes peptide-CMH II. De nombreuses études ont toutefois démontré que des épitopes pouvaient aussi se lier à des CMH II dans les endosomes précoces. Par exemple, l'inhibition par la concanamycin A de l'ATPase responsable de l'acidification vacuolaire n'empêche pas la présentation de l'antigène HA du virus influenza (Pinet and Long, 1998). De plus, des antigènes peuvent se lier aux CMH II dans le RE et directement en surface de la membrane plasmique lorsqu'il n'y a pas de CLIP associé à la cavité. Une telle diversité d'évènements et de lieux menant à la formation du complexe antigène-CMH II optimise les chances de pouvoir présenter efficacement les épitopes dérivés d'une particule internalisée.

2.1.4.2 Le chargement du peptide

Tant et aussi longtemps que le CLIP demeure lié dans la poche peptidique, le CMH II ne peut pas former de complexes avec un antigène. Le rôle de DM a été identifié lorsque des chercheurs ont remarqué que l'absence de cette protéine accessoire causait l'accumulation de complexes CLIP-CMH II en surface des cellules (Mellins *et al.*, 1990). L'expression de DM, comme celle du CMH II, est sous le contrôle du CIITA. Cette molécule non-polymorphe et dont la structure s'apparente beaucoup à celle d'un CMH II se retrouve principalement dans les vésicules endosomales acides, là où elle pourra jouer son rôle de chaperon lors du chargement de l'antigène. Premièrement, DM libère la cavité peptidique de CLIP, puis stabilise physiquement le CMH II vide en empêchant l'agrégation de cette molécule (Denzin *et al.*, 1996). Ensuite, il régule le répertoire des antigènes retrouvés sur les CMH II en favorisant le chargement d'antigènes qui ont une grande affinité pour son CMH II, tout en empêchant la liaison de peptides trop instables (Hall *et al.*, 2002; Kropshofer *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1996).

DO, une autre molécule apparentée au CMH II, doit s'associer à DM pour sortir du RE convenablement (Liljedahl *et al.*, 1996). Cette interaction se poursuit jusqu'aux endosomes tardifs, endroits où DO a un effet inhibiteur pH-dépendant sur l'activité de DM. Il a été démontré que la surexpression de DO chez des cellules transfectées diminuait la présentation antigénique de différents épitopes et qu'une diminution de l'expression de cette protéine avait l'effet contraire (Brocke *et al.*, 2003; Qi and Ostrand-Rosenberg, 2001). Il reste toutefois beaucoup à faire pour bien comprendre ses rôles mais DO semblerait être impliquée au niveau de la présentation antigénique chez les cellules B ayant internalisé des antigènes via les récepteurs de cellule B (BCR) (Alfonso and Karlsson, 2000).

Chez l'humain, on retrouve normalement 8 molécules différentes classiques de CMH II mais celles-ci sont capables de lier une très grande diversité d'antigènes. Chaque CMH II reconnaît une classe d'épitopes via des motifs conservés sur les

antigènes, ce qui explique comment très peu de molécules de CMH II peuvent présenter une panoplie d'antigènes différents. Par cristallographie, il a été démontré qu'un peptide pouvait interagir avec un CMH II par deux types de liens. Premièrement, les résidus polymorphes retrouvés dans les poches de la cavité du CMH II sont responsables de la spécificité relative de chaque molécule, en reconnaissant des motifs conservés sur les chaînes latérales des peptides. De plus, des ponts hydrogènes entre le squelette de l'antigène et les résidus conservés de la niche peptidique solidifient l'interaction peptide-CMH II (Stern *et al.*, 1994). Contrairement à la cavité du CMH I, la niche peptidique du CMH II est ouverte. Elle permet ainsi la liaison de fragments variant entre 13 et 25 acides aminés dont les extrémités ne sont pas fixées.

Les chaperons DM et DO, ainsi que les diverses interactions entre les antigènes et les CMH II, favorisent donc la création de complexes stables qui sont finalement transportés dans des vésicules de transport à la surface cellulaire.

2.1.5 Transport et présentation aux cellules T CD4⁺

Après l'apprêtement et le chargement de l'antigène sur le CMH II, le complexe peptide-CMH II sort rapidement de la voie endocytaire pour se diriger vers la membrane plasmique. Les mécanismes qui régulent ces phénomènes ne sont toutefois pas encore tous connus, mais les radeaux lipidiques semblent jouer un rôle crucial dans le transport et la concentration des peptides-CMH II. Arrivée à la surface, la vésicule fusionne avec la membrane plasmique pour ainsi exposer l'antigène couplé au CMH II aux cellules T CD4⁺ spécifiques pour ce complexe. Le lymphocyte T CD4⁺ reconnaît d'une part le complexe via son récepteur (TCR). Les molécules accessoires de ce lymphocyte, telles que le CD4, LFA-1 et CD28, augmentent ensuite l'affinité de la liaison. Une reconnaissance antigénique par la cellule CD4⁺ résulte en l'activation de cette cellule.

2.1.6 L'implication des radeaux lipidiques

Dans un environnement cellulaire normal, les cellules présentatrices d'antigènes n'ont pas toujours accès à une grande quantité d'antigène spécifique. Elles doivent donc organiser à leur surface leurs complexes CMH II-peptide de manière à engendrer une synapse immunologique efficace. Ce rôle peut être accompli par les radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires ordonnés et enrichis en cholestérols, glycosphingolipides et sphingomyélines (Harder *et al.*, 1998; Simons and Ikonen, 1997). En plus de servir à la transduction de signaux et au transport de protéines, ces structures peuvent également favoriser la présentation antigénique. Des travaux réalisés par le laboratoire de Paul Roche ont démontré que les radeaux lipidiques étaient essentiels pour engendrer une activation des cellules T spécifiques en présence d'une faible densité de complexes CMH II-peptide en surface des cellules B. En effet, des couples CMH II-peptides distincts sont associés à leurs propres radeaux lipidiques et ces microdomaines s'accumulent à la synapse immunologique de manière à polariser la présentation (Figure 6). Ces phénomènes liés aux radeaux lipidiques permettent donc aux CPAs d'activer les cellules T malgré la présence limitée d'antigènes disponibles (Hiltbold *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2000).

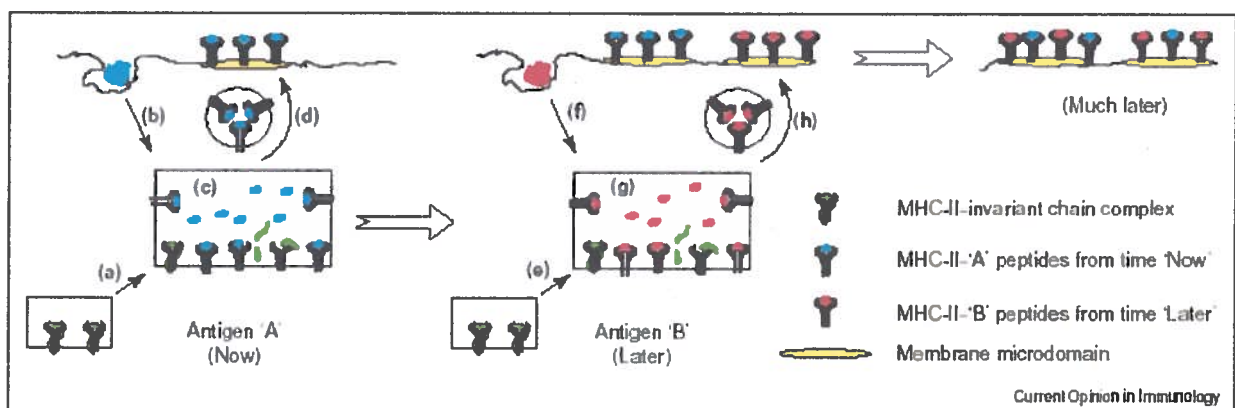


Figure 6: Modèle du rôle des radeaux lipidiques dans la présentation antigénique (Poloso and Roche, 2004)

2.1.7 Le phagosome comme organelle présentateur d'antigènes

Les évènements impliquant le dynamisme des vésicules endocytaires dans l'apprêtement et le chargement des antigènes suite à la phagocytose ne sont pas encore complètement démystifiés. Il était auparavant accepté que ces processus avaient lieu dans les MIICs, des vésicules tardives du réseau endocytair enrichies en CMH II et distinctes des phagosomes. Selon ce modèle, les particules internalisées sont dégradées dans le phagolysosome, puis dirigées vers les MIICs pour être apprêtées et chargées sur le CMH II. Avec le modèle du « kiss and run », d'autres chercheurs ont plutôt proposé que le phagosome pouvait acquérir la machinerie nécessaire à la formation du complexe antigène-CMH II à la suite d'une maturation.

Les travaux du Professeur Clifford Harding ont d'ailleurs démontré que le phagosome était un organelle capable de gérer toutes les étapes menant à la présentation antigénique. En isolant des phagosomes de macrophages contenant des billes de latex couplées à de l'ovalbumine, cette équipe a montré la présence abondante de CMH II, de Ii et de H2-DM, toutes des molécules associées à l'apprêtement de l'antigène (Ramachandra *et al.*, 1999). Selon cette étude, entre 5 et 6% des CMH II totaux de la cellule se retrouveraient associés aux phagosomes. De plus, les phagosomes possèdent les enzymes nécessaires à la dégradation de la chaîne invariante Ii, ainsi qu'à l'apprêtement de l'antigène. En effet, l'apparition dans le phagosome du peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ dérivé de l'ovalbumine se produit aussi peu que dix minutes après le début de la phagocytose. L'isolement de phagosomes a également servi à démontrer la présence de complexes I-A^d-OVA₃₂₃₋₃₃₉ capables d'activer des hybridomes de cellules T spécifiques. Finalement, cette équipe a montré que même si des CMH II étaient recyclés de la surface au phagosome lors de la phagocytose, la majorité des CMH II utilisés étaient nouvellement synthétisés (Ramachandra *et al.*, 2000). Bref, le phagosome acquiert rapidement toute la machinerie qui lui permet d'apprêter et de charger l'antigène et cela en fait donc un organelle autonome pour la présentation antigénique.

2.2 Conclusion

Voilà donc un portrait global des phénomènes reliés à la présentation antigénique via le CMH II suivant la phagocytose de particules étrangères par le macrophage. La présentation antigénique est un phénomène très complexe où différentes molécules et mécanismes peuvent intervenir dans des ordres qui ne sont pas nécessairement constants. La nature de la particule phagocytée, le type cellulaire et son état, l'environnement et possiblement d'autres facteurs intracellulaires contribuent à la diversité des phénomènes reliés à la présentation antigénique. La présentation antigénique par les CPAs engendre la reconnaissance et la destruction de microorganismes pathogènes par le reste du système immunitaire. Toutefois, certains microorganismes tels *Mycobacterium tuberculosis* et certaines espèces de *Leishmania* réussissent à inhiber la présentation via le CMH II pour ainsi échapper au système immunitaire. Les prochaines sections traiteront des mécanismes d'évasion de *Leishmania donovani*, plus particulièrement au niveau de la présentation antigénique.

3. Leishmania

Selon l'organisation mondiale de la santé, il y avait en 2000 plus de 12 millions de personnes infectées dans 88 pays par le parasite protozoaire *Leishmania* (Organisation Mondiale de la Santé). Il existe une vingtaine d'espèces de *Leishmania* dans le monde que l'on peut diviser en trois catégories. Il y a tout d'abord les espèces telles que *L. mexicana*, *L. tropica* et *L. major* qui causent la leishmaniose cutanée. Cette maladie est identifiable par la formation de lésions au site du repas sanguin de l'insecte qui transmet le parasite. La forme muco-cutanée, qui peut causer de sévères défigurations en attaquant la bouche et le nez, est causée par *L. braziliensis braziliensis*. Finalement, la leishmaniose viscérale (kala azar) constitue la forme la plus grave car elle peut être mortelle si elle n'est pas traitée. Dans de tels cas, des organes vitaux comme le foie, la rate et la moelle osseuse sont infectés. Les leishmanioses viscérales sont causées par *L. infantum* et *L. donovani* dans le vieux monde et par *L. chagasi* dans le nouveau monde. Historiquement, c'est en 1903 que William Leishman et Charles Donovan démontrèrent, dans des études indépendantes, qu'un parasite retrouvé dans la rate de patients causait des symptômes s'apparentant à ceux de la malaria. On attribua alors le nom *Leishmania donovani* au protozoaire causant cette maladie viscérale en l'honneur de ses découvreurs. Le présent travail se concentrera d'ailleurs sur l'espèce *L. donovani*, parasite causant une maladie chronique pour laquelle il n'existe toujours pas de vaccin.

3.1 Le cycle de vie de Leishmania

Lors d'un repas sanguin, la mouche des sables femelle du genre *Phlebotomus* (vieux monde) ou *Lutzomyia* (nouveau monde) transmet à l'hôte mammifère le parasite sous sa forme promastigote (12-20 μm). Attachés aux cellules épithéliales du tractus digestif de l'insecte, les promastigotes, dits procycliques, sont capables de se diviser, sont non-infectieux et possèdent un flagelle. Ces parasites doivent ensuite se transformer en la forme métacyclique, un état où ils ne peuvent plus se diviser mais acquièrent un pouvoir infectieux (Sacks, 1989). Lorsque la mouche prend son repas sanguin, les promastigotes métacycliques sont inoculés dans la circulation sanguine de l'individu. Chez l'hôte

mammifère, les promastigotes sont phagocytés par les macrophages et résident dans les phagosomes. C'est dans ce compartiment que le promastigote se différencie en sa forme amastigote pour résister à l'environnement hostile du phagolysosome. Sous cette forme plus petite (2-5 µm), non-motile et très infectieuse, *Leishmania* se divise et se disperse dans le milieu environnant pour infecter d'autres macrophages (Rittig and Bogdan, 2000). Le cycle se poursuit quand une mouche vient se nourrir chez un mammifère infecté, ingérant des amastigotes qui se redifférencieront en promastigotes.

3.2 La réponse immunitaire face à *Leishmania*

Chez l'humain, des facteurs tels que la malnutrition et l'immunosuppression causée par le VIH favorisent l'établissement d'une infection par *Leishmania*. Des facteurs génétiques contribuent aussi à la susceptibilité de l'hôte face au parasite. Ces différences de réponses face à *Leishmania* se reflètent également chez les modèles murins. En effet, les souris BALB/c sont susceptibles aux infections par *L. major* alors que les souris C57BL/6 y résistent (Howard *et al.*, 1980). La résistance de l'animal face à certaines espèces de *Leishmania* dépend de sa capacité à générer une réponse de type Th1, caractérisée par la présence d'IFN- γ , d'IL-2 et d'IL-12 (Alexander *et al.*, 1999). En revanche, les souris BALB/c qui suite à l'inoculation expriment plutôt les cytokines associées à une réponse Th2, comme l'IL-4 et l'IL-10, ne peuvent pas guérir. Ce paradigme Th1/Th2 ne peut toutefois pas s'appliquer à toutes les espèces de *Leishmania*. Chez l'homme, ce sont aussi les réponses de type Th1 qui permettent de combattre le parasite. Des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) isolées de patients asymptomatiques infectés par *L. donovani* répondent à un antigène de *Leishmania* en proliférant et en produisant de grandes quantités d'IL-2, d'IL-12 et d'IFN- γ . Ce type de réponse ne survient pas chez les personnes qui souffrent de la leishmaniose viscérale (Bacellar *et al.*, 1996; Ghalib *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1992). Des études ont également démontré l'existence de facteurs génétiques dans la résistance à *L. donovani*. Entre autres, des études épidémiologiques au Soudan ont révélé qu'un polymorphisme du gène NRAMPI (*natural resistance-associated macrophage protein one*) influençait la susceptibilité de familles aux leishmanioses viscérales causées par *L. donovani* (El-Safi *et*

al., 2006; Mohamed *et al.*, 2004). NRAMP1 régule la prolifération intracellulaire des microorganismes et les réponses inflammatoires du macrophage. Chez les personnes possédant l'allèle de type sauvage, l'infection par *Leishmania* ne peut s'établir.

Pour établir l'infection, *L. donovani* a développé au cours de l'évolution de nombreuses stratégies pour déjouer les systèmes de défense de l'hôte. Autant chez la mouche des sables que chez le mammifère, les glycoconjugués de surface du promastigote, principalement le lipophosphoglycan (LPG), jouent un rôle essentiel pour la survie de *L. donovani*.

3.3 Les glycoconjugués de surface des promastigotes

Parmi les glycoconjugués retrouvés en surface du promastigote, le LPG est le plus abondant. Cette molécule comporte quatre domaines (Figure 7) : une ancre 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(myo)inositol, un noyau de glycan, un polymère d'unités répétitives de Gal β (1,4)Man-PO $_4$ et une coiffe d'oligosaccharides (McConville and Ferguson, 1993; Turco and Descoteaux, 1992; Descoteaux and Turco, 1999; Lodge and Descoteaux 2005). Dans la mouche des sables, le LPG des promastigotes possède une quinzaine d'unités répétées mais ce nombre augmentera à 30 lors de la métacyclogénèse, moment où les promastigotes deviennent infectieux et se détachent du tractus digestif de l'insecte (Sacks *et al.*, 1995). Tel que discuté plus loin, le LPG des promastigotes métacycliques contribue grandement à la résistance du parasite, autant dans la circulation sanguine de l'hôte que dans les macrophages. Après avoir établi l'infection dans le phagosome du macrophage, le promastigote se différencie en amastigote. Cette étape est entre autres accompagnée d'une importante diminution de l'expression du LPG.

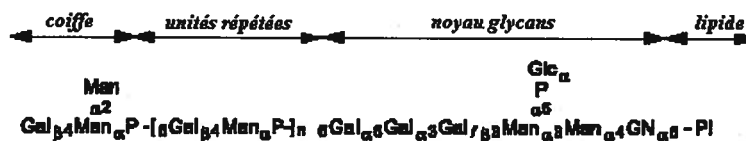


Figure 7: Structure moléculaire du LPG
(Lodge and Descoteaux, 2005b)

Les autres glycoconjugués de surface possèdent tous une homologie de structure avec un des domaines du LPG (Mengeling *et al.*, 1997). Les phosphoglycans (PG), les protéophosphoglycans (PPG), ainsi que les acides phosphatases sécrétées (sAP), sont constitués entre autres d'unités répétées de dissacharides et d'une coiffe de sucres similaire à celle du LPG (Ilg *et al.*, 1998; Ilg *et al.*, 1996; Ilg *et al.*, 1995; Ilg *et al.*, 1994). Pour sa part, la protéase de surface gp63 possède une ancre GPI qui lui permet de s'attacher à la surface du promastigote (Schneider *et al.*, 1990). Finalement, chez les promastigotes et les amastigotes, on retrouve en grande quantité une famille de phospholipides glycoinositols (GIPLs). Les GIPLs peuvent être des précurseurs de LPG, d'ancres GPI ou d'autres molécules de surface (McConville and Ferguson, 1993).

3.3.1 Le LPG et les mécanismes d'évasion

Le LPG des promastigotes de *L. donovani* permet au parasite de survivre dans le macrophage et d'ainsi établir l'infection (Lodge *et al.*, 2006; McNeely and Turco, 1990). Pour ce faire, cette molécule confère tout d'abord une résistance au promastigote face au système du complément. Ensuite, une fois à l'intérieur du macrophage, le LPG contribue à l'invasion silencieuse, cause la désorganisation des radeaux lipidiques et inhibe de façon transitoire de la fusion du phagosome avec les endosomes. Le LPG possède d'autres rôles déterminants pour l'établissement de l'infection et probablement que d'autres seront découverts dans le futur.

3.3.1.1 Interaction avec le système du complément

Suite à leur transmission par l'insecte piqueur, les promastigotes doivent faire face aux molécules du complément du sérum, composantes majeures de la première ligne de défense de l'hôte. Chez l'homme, mais pas chez la souris, le LPG des promastigotes métacycliques permet de résister à l'action lytique du complément (Spath *et al.*, 2003; Puentes *et al.*, 1988). Dans la voie alterne du complément, le facteur C3b se fixe aux constituants de surface étrangers pour initier une cascade impliquant les facteurs B, D, la

C3 convertase et la C5 convertase ainsi que leurs sous-unités. Cette séquence d'évènements mènera finalement à la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9. Chez *L. major*, C3b se fixe au promastigote mais le LPG des promastigotes métacycliques agirait comme un bouclier pour prévenir l'accès du complexe C5b-9, dont la majorité est rapidement libérée de la surface, empêchant ainsi la lyse du parasite (Puentes *et al.*, 1990). Pour sa part, le promastigote *L. donovani* évite l'action lytique du complément humain en favorisant la liaison du facteur C3bi (inactif), qui ne participe pas à la formation de la C5 convertase (Puentes *et al.*, 1989). Sur les cellules de l'hôte, le CR1, la MCP (*Membrane Cofactor Protein*) et le facteur H fixent C3b et le facteur I clive cette molécule pour donner le C3bi. Les promastigotes utilisent d'ailleurs le complément pour favoriser leur entrée dans le macrophage via le CR1, qui lie le C3b, ou par le CR3, qui lui reconnaît le C3bi (Mosser and Rosenthal, 1993; Lodge *et al.*, 2005).

D'autres composantes du sérum peuvent aussi lier le LPG. La « *Mannan-Binding Protein* » se lie aux unités mannoses terminales de la coiffe du LPG et active la voie lectine du complément pour mener à la formation de C3b (Green *et al.*, 1994). La protéine C-réactive, retrouvée dans le sérum lors de l'inflammation, est également une opsonine qui favorise l'internalisation en se fixant aux unités répétées du LPG (Culley *et al.*, 1996).

Le LPG est donc une molécule essentielle dans les premiers instants suivant l'inoculation de *L. donovani*. Il permet la survie du promastigote dans le sérum et son interaction avec des composantes du sérum permet son entrée dans le macrophage.

3.3.1.2 L'entrée silencieuse dans le macrophage

Chez les macrophages dérivés de la moelle osseuse activés par l'IFN- γ , la destruction des promastigotes de *L. donovani* dépend entre autres de la sécrétion de TNF- α et d'oxyde nitrique (NO), ainsi que de l'activation des voies des MAPKs (*Mitogen-Associated Protein Kinases*) qui leur sont associés (Prive and Descoteaux, 2000; Green *et al.*, 1990; Liew *et al.*, 1990). Toutefois, les promastigotes de *Leishmania* réussissent à

établir l'infection en entrant de façon silencieuse dans les macrophages (Reiner *et al.*, 1994).

La p38 MAPK et ERK1/2, suite à leur phosphorylation, induisent la synthèse de TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire cruciale de l'immunité contre *Leishmania*. Ces protéines mènent également à la production de NO microbicide, principal moyen de destruction du parasite (Liew *et al.*, 1990). Or, contrairement à plusieurs microorganismes pathogènes, les promastigotes de *L. donovani* n'induisent pas la phosphorylation de p38 MAPK, ERK1/2 et de JNK chez les macrophages naïfs dérivés de la moelle osseuse. L'absence d'activation de ERK1/2 est due à la présence de LPG. Contrairement aux promastigotes de type sauvage, des mutants déficients en glycoconjugués (Figure 8) sont capables d'induire une phosphorylation rapide et transitoire de ERK1/2 (Prive and Descoteaux, 2000). L'inhibition de l'activation de cette MAPK explique en partie pourquoi l'incubation de macrophages non-activés avec le domaine phosphoglycan du LPG purifié inhibe la production de NO par iNOS (inducible nitric oxide synthase), suite à l'addition d'IFN- γ (Proudfoot *et al.*, 1996).



sAP : secreted acid phosphatase

PG: phosphoglycan

PPG: proteophosphoglycan

LPG: lipophosphoglycan

Figure 8: Le lipophosphoglycan et les autres molécules de surface apparentées au LPG des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage et *lpg2 KO*

(adapté de (Holm *et al.*, 2001))

La protéine kinase C (PKC) et les activités qui découlent de son activation constituent une autre cible du LPG (McNeely and Turco, 1987). Parmi ces événements PKC-dépendant inhibés, notons l'induction de la flambée oxydative, l'expression de *c-fos* induite par le lipopolysaccharide (LPS) et le diacylglycérol (DAG) et la phosphorylation des MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*) (Descoteaux *et al.*, 1992; Descoteaux *et al.*, 1991; Frankenburg *et al.*, 1990). En interagissant avec le domaine de PKC qui contient les sites de liaison pour le DAG, les phospholipides et le calcium, le LPG inhibe l'activité de cette kinase (McNeely *et al.*, 1989).

Les protéines PKC et ERK1/2 ne sont que des exemples de cibles du LPG. Il existe possiblement d'autres effecteurs qui régulent l'activité microbicide du macrophage qui puissent être modulés par le LPG. L'étude de l'effet du LPG sur l'expression génique du macrophage suite à l'infection permettra d'approfondir les connaissances à ce niveau.

3.3.1.3 Inhibition de la maturation du phagosome

Suite à la phagocytose d'une particule, il y a normalement une maturation rapide du phagosome en phagolysosome qui implique la fusion du phagosome avec les vésicules du système endocytaire. Toutefois, le promastigote de *L. donovani* réussit à inhiber ce processus de maturation. Il a clairement été démontré que le LPG était la molécule responsable de ce ralentissement de la biogénèse du phagosome-lysosome, en inhibant la fusion des phagosomes avec les endosomes tardifs et les lysosomes (Desjardins and Descoteaux, 1997; Dermine *et al.*, 2000). Des phagosomes contenant des promastigotes mutants *lpg2* KO, incapables de synthétiser les unités répétées du LPG, fusionnent avec les endosomes tardifs et les lysosomes, ce qui n'est pas le cas pour les promastigotes de type sauvage. Comme le démontre l'absence du transfert de billes d'or des endosomes aux phagosomes contenant les promastigotes, le LPG influence les capacités fusogéniques du phagosome. Ces observations en microscopie électronique ont été appuyées par l'absence de détection des marqueurs de phagosome tardif, Rab7 et LAMP1, à la membrane des phagosomes contenant des promastigotes de type sauvage (Scianimanico *et al.*, 1999). Le LPG peut s'insérer dans les membranes cellulaires du

macrophage pour stabiliser la bicouche lipidique (Miao *et al.*, 1995; Tolson *et al.*, 1990). Cela pourrait ainsi compromettre les capacités fusogéniques du phagosome.

L'inhibition de la maturation du phagosome engendrée par le LPG s'accompagne également d'une accumulation de F-actine périphagosomale (Figure 9) (Holm *et al.*, 2001). Les filaments de F-actine, essentiels à la phagocytose, sont assemblés à la coupe phagocytaire mais sont normalement désassemblés suite à la formation du phagosome. Des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage et des levures recouvertes de LPG purifié provoquent la rétention de F-actine périphagosomale, ce qui n'est pas le cas suite à la phagocytose de mutants *lpg2* KO. L'enveloppe de F-actine pourrait former une barrière physique empêchant les interactions avec les endosomes tardifs et les lysosomes. Les mécanismes utilisés par le LPG pour empêcher la désorganisation de la F-actine périphagosomale ne sont pas encore totalement connus. Ces mécanismes impliqueraient les protéines PKC- α et Cdc42, qui jouent toutes deux un rôle dans le désassemblage et l'assemblage des filaments de F-actine respectivement. D'une part, le LPG inhibe le recrutement de la PKC- α au phagosome (Holm *et al.*, 2003; Holm *et al.*, 2001). De plus, les phagosomes contenant des promastigotes de type sauvage voient Cdc42, et par conséquent WASP et Arp2/3, demeurer associés à la membrane phagosomale (Lodge and Descoteaux, 2005a).

Pour éviter sa destruction, le LPG inhibe également l'assemblage de la NADPH oxydase au niveau de la membrane phagosomale (Lodge *et al.*, 2006). La NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique qui catalyse le transfert d'électrons de son substrat, le NADPH, à l'oxygène. Ce processus mène à la production de superoxyde dans le phagosome, un précurseur de composés oxydants microbicides hautement réactifs (ROS) (Shatwell and Segal, 1996). Un défaut de production de ces composés réactifs par l'oxydase entraîne des infections bactériennes et fongiques récurrentes chez l'humain (Dinauer and Orkin, 1992). Toutefois, le LPG inhibe le recrutement au phagosome de p47^{phox} et p67^{phox}, des composantes de la NADPH oxydase (Lodge *et al.*, 2006). Le LPG permet donc au promastigote de *L. donovani* d'éviter la destruction par les ROS, et ce de façon localisée au phagosome.

La présence du LPG est donc critique à la survie du promastigote, puisque sans cette molécule, le phagosome aurait le temps d'acquies les conditions nécessaires à la destruction du parasite.

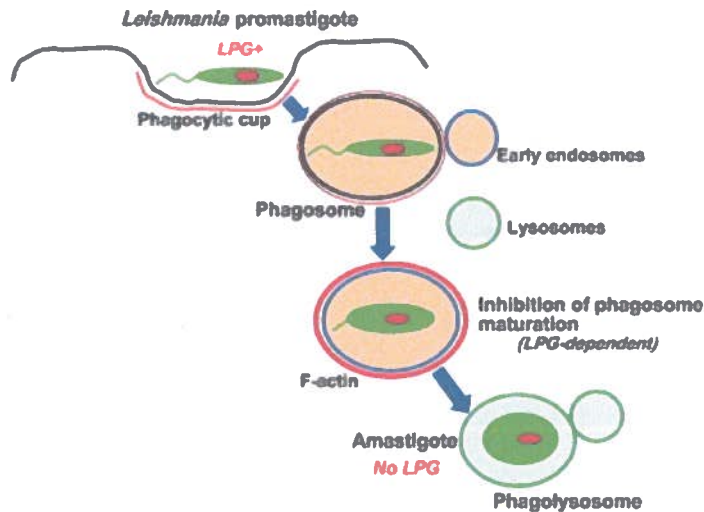


Figure 9: L'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG (Lodge and Descoteaux, 2005b)

3.3.1.4 Altération des radeaux lipidiques

Étant donné que de nombreuses voies de signalisation passent par les radeaux lipidiques, des microorganismes pathogènes et des toxines ciblent ces importantes structures pour envahir l'hôte (Rosenberger *et al.*, 2000). Les microdomaines lipidiques retrouvés aux phagosomes sont enrichis de flotilline-1 et ne possèdent pas LAMP1, un marqueur de phagosome. Trois heures après la phagocytose de promastigotes de type sauvage par la lignée de macrophages J774, il y a une inhibition de l'acquisition de ces radeaux lipidiques enrichis en flotilline-1 au phagosome, ce qui n'est pas le cas avec les mutants *lpg2* KO (Dermine *et al.*, 2001). En s'insérant via son ancre GPI dans les radeaux lipidiques, le LPG pourrait en désorganiser la structure et ainsi compromettre la transduction de signaux qui passent par ces microdomaines.

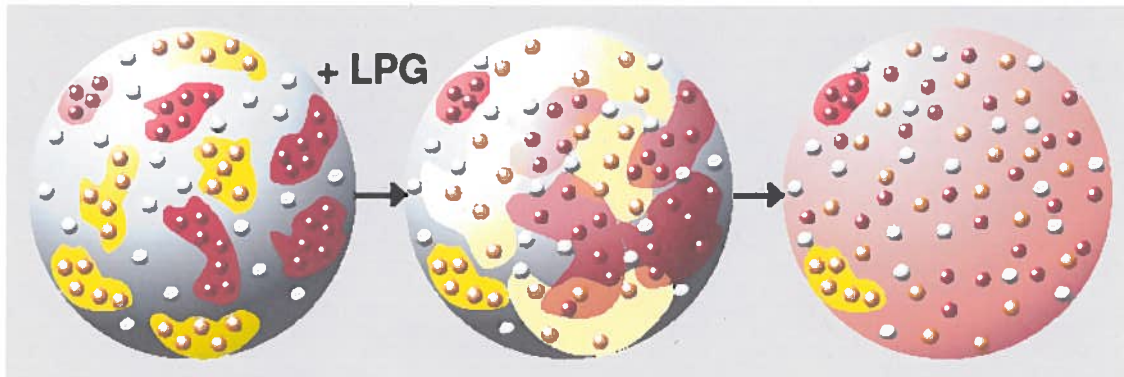


Figure 10: La désorganisation des microdomaines lipidiques par le LPG
(Dermine *et al.*, 2005)

En co-marquant la flotilline-1 et GM1, un autre marqueur de radeaux lipidiques, Dermine et ses collègues ont démontré que les différents microdomaines retrouvés au phagosome n'étaient pas distribués uniformément (Dermine *et al.*, 2005). Une telle spécialisation des régions pourrait ainsi servir à compartimenter les fonctions, notamment au niveau de la transduction de signaux. Lors de cette même étude, cette équipe a démontré que le LPG causait la désorganisation des radeaux lipidiques sans toutefois modifier quantitativement la composition en protéines des phagosomes (Figure 10). Puisque le LPG se détache du promastigote pour s'insérer dans les membranes cellulaires du macrophage, cette molécule peut inhiber toute une variété de fonctions associées aux radeaux lipidiques, tant au niveau localisé que global de la cellule. L'importance des microdomaines lipidiques quant à la spécialisation de fonctions a d'ailleurs été démontrée au niveau de la présentation antigénique via le CMH II (Chakraborty *et al.*, 2005). Comme il sera discuté plus loin, *L. donovani* peut altérer les radeaux lipidiques pour ainsi inhiber la présentation antigénique via le CMH II. L'inhibition de la présentation antigénique via le CMH II par *Leishmania* constitue d'ailleurs le sujet d'intérêt de la prochaine section.

4. Inhibition de la présentation antigénique par *Leishmania*

Chez l'hôte infecté par *Leishmania*, une réponse dirigée par les cellules T CD8⁺ peut dans certains cas être bénéfique, mais c'est toutefois l'activation des cellules CD4⁺ qui sera essentielle pour complètement éliminer le parasite (Uzonna *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 1998; Locksley *et al.*, 1993). Suite à l'interaction entre le macrophage et le lymphocyte CD4⁺, via le CMH II et le TCR principalement, la cellule T spécifique s'active et peut ensuite activer à son tour le macrophage en sécrétant de l'IFN- γ . Pour contourner ce système de défense primordial, diverses espèces de *Leishmania* inhibent la présentation antigénique efficace via le CMH II. L'activation des cellules T implique la formation de complexes CMH II-peptide, le transport de ces molécules en surface du macrophage, l'apport des molécules de co-stimulation et la synapse immunologique. Comme pour la majorité des mécanismes d'évasion de *Leishmania*, les mécanismes employés et les degrés d'altération causés peuvent grandement varier selon l'espèce et le stade de différenciation.

4.1 L'importance du stade de différenciation de *Leishmania*

Il est bien connu que les amastigotes et les promastigotes métacycliques ont un pouvoir infectieux supérieur à celui des promastigotes procycliques. Une partie de cette résistance des amastigotes réside dans leur capacité à inhiber la présentation antigénique, alors les promastigotes procycliques engendrent une présentation antigénique. Une équipe est arrivée à cette conclusion en comparant la présentation antigénique de LACK (*Leishmania* homologue of receptors for Activated C Kinase), une protéine cytosolique exprimée autant par les promastigotes que les amastigotes (Courret *et al.*, 1999; Prina *et al.*, 1996). Suite à une infection par des promastigotes procycliques de *L. donovani*, *L. major* ou *L. amazonensis*, des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse et activés à l'IFN- γ activent les cellules T spécifiques à LACK₁₅₈₋₁₇₃ de manière transitoire. En effet, au cours des premières 5 heures suivant l'infection, les macrophages présentent l'antigène mais cette présentation cesse complètement après 48 heures. Pour leur part,

les formes plus virulentes, comme les promastigotes métacycliques, inhibent presque complètement la présentation antigénique, tandis que les amastigotes l'altèrent totalement. Pour les parasites au stade procyclique, la présentation antigénique transitoire pourrait être attribuée à la destruction des promastigotes, contrairement aux amastigotes qui eux résistent mieux à l'activité microbicide des macrophages. Toutefois, un traitement des macrophages infectés avec un agent leishmanicide, le L-leucine methyl ester (Leu-mMe), ne favorise pas le rétablissement de la présentation antigénique. Ceci démontre qu'un amastigote, même tué, peut altérer cette propriété du macrophage.

Cet effet inhibiteur de *Leishmania* sur la présentation antigénique peut également être observé lorsque des protéines ou des peptides exogènes sont mis en présence de macrophages infectés par des promastigotes de *L. donovani* (Chakraborty *et al.*, 2005), des promastigotes de *L. major* (Fruth *et al.*, 1993) ou des amastigotes de *L. amazonensis* (Prina *et al.*, 1993). En comparaison avec des macrophages sains, des macrophages infectés pendant 24 h ou 48 h, et incubés en présence de faibles quantités d'antigènes solubles, ne sont pas capables d'activer les cellules T spécifiques. *In vivo*, le portrait demeure le même puisque des macrophages spléniques isolés de souris et de hamsters infectés par des amastigotes *L. donovani* ne stimulent pas les lymphocytes spécifiques aux antigènes de *Leishmania* (Rodrigues Junior *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1986).

4.2 La caractérisation du phagosome contenant *Leishmania*

Puisque *Leishmania* inhibe la présentation antigénique, la présence de CMH II et de ses molécules associées, ainsi que la formation de complexes CMH II-peptide, ont été investiguées chez les macrophages infectés.

Autant en surface du macrophage que dans ses phagosomes, les amastigotes de *L. mexicana* et *L. amazonensis* n'altèrent pas les niveaux de CMH II et de H2-DM (Antoine *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 1994b; Prina *et al.*, 1993). Les phagosomes qui contiennent des parasites possèdent aussi les enzymes nécessaires pour dégrader la chaîne invariante Ii (De Souza Leao *et al.*, 1995). Toutefois, pour éviter la présentation antigénique, les

amastigotes de *L. mexicana* et *L. amazonensis* réussissent à fixer, à internaliser et à dégrader certaines molécules de CMH II et H2-DM (Antoine *et al.*, 1999).

Chez les macrophages infectés par des promastigotes de *L. major*, il semble que l'altération de la présentation antigénique serait causé par un défaut du chargement de l'antigène sur le CMH II (Fruth *et al.*, 1993).

Les macrophages infectés par des amastigotes de *L. donovani* possèdent également toute la machinerie nécessaire à la présentation antigénique, autant *in vitro* que *in vivo* (Lang *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 1994a). L'infection par le parasite n'altère pas la synthèse et la relocalisation des CMH II vers les phagosomes chez des macrophages murins stimulés avec de l'IFN- γ 18 h avant l'infection. De plus, les chaînes invariantes Ii sont complètement dégradées sur les CMH II retrouvés dans les phagosomes, ce qui suggère que des peptides pourraient s'y lier et éventuellement former un complexe. Dans le cas de *L. donovani*, il a été suggéré que l'altération des mécanismes menant à la présentation antigénique puisse donc avoir lieu en aval de la formation du complexe antigène-CMH II, au niveau de la synapse immunologique avec le TCR (discuté plus loin).

4.3 Les molécules de co-stimulation et *Leishmania*

Pour pleinement activer les cellules T naïves, les macrophages doivent exprimer à leur surface les molécules d'adhésion (p.ex. ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 et LFA-3) et les molécules de co-stimulation comme B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86). En l'absence de ces molécules, les cellules T naïves deviennent anergiques ou meurent par apoptose. Chez des macrophages de chien et de souris, les promastigotes et les amastigotes de *L. donovani* et *L. infantum* régulent à la baisse B7 en bloquant la voie de signalisation menant à l'expression de cette molécule (Saha *et al.*, 1995; Kaye *et al.*, 1994). Il a aussi été observé *in vivo* que les cellules de Kupffer infectées par *L. donovani* avaient une très faible expression de B7-1, bien qu'elles possédaient un taux normal de CMH II.

4.4 Altération de la synapse immunologique efficace par *Leishmania donovani*

Jusqu'à tout récemment, le monde scientifique était encore à la recherche de la cible exacte et critique de *Leishmania donovani* pour inhiber la présentation antigénique efficace. L'observation que *L. donovani* n'avait pas d'effet sur l'apprêtement et le chargement antigénique poussa à étudier plutôt l'interaction entre la cellule T et le macrophage infecté.

Lors du contact initial entre le macrophage et la cellule T, ce sont les molécules d'adhésion qui lient les deux cellules. Ces interactions indépendantes de l'antigène causent la réorganisation de la F-actine de la cellule T. Ceci se produit via la phosphorylation de la protéine Vav associée au CD3zêta.

Ensuite, la protéine Vav phosphorylée active Rac1, un régulateur de la polymérisation de la F-actine (Valensin *et al.*, 2002). Pour générer une activation, il doit toutefois y avoir une reconnaissance par le TCR de l'antigène lié au CMH II, ce qui entraîne ensuite une réorientation des microtubules. Cette réorganisation du cytosquelette sert à polariser la sécrétion des cytokines activatrices, comme l'IFN- γ , par la cellule T. De plus, cette activation de la cellule T est dépendante de la concentration en antigène disponible. (Meier *et al.*, 2003; Sedwick *et al.*, 1999). En effet, une augmentation croissante de la concentration en antigène dans le milieu entraîne une hausse proportionnelle de l'activation des cellules T spécifiques jusqu'à l'obtention d'un plateau. Une équipe a donc étudié ces différents paramètres dans le cadre d'une infection par *L. donovani*. Pour ce faire, des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse ont été infectés avec des amastigotes *L. donovani* pendant 48h. Ces macrophages ont ensuite été incubés avec la protéine ovalbumine pendant 18h, et finalement l'activation des cellules T a été mesurée. Il a premièrement été démontré que les macrophages infectés possédaient bien à leur surface des complexes CMH II-peptide, et ce à des niveaux comparables aux macrophages sains. Exposés à de très faibles concentrations d'antigènes, les macrophages pouvaient également engendrer une réorientation de la F-actine mais pas

des microtubules chez la cellule T. Par conséquent, l'infection par *Leishmania donovani* ne stimule pas de sécrétion d'IFN- γ par la cellule T. Ce phénomène d'inhibition pouvait être renversé en exposant les macrophages infectés à de plus fortes concentrations d'ovalbumine. De plus, l'effet de l'infection par les amastigotes sur la réorientation des microtubules de la cellule T pouvait être reproduite en traitant des macrophages sains avec de la nystatin, un agent altérant l'intégrité des radeaux lipidiques. Ces auteurs proposent que les phosphoglycans sécrétés par les amastigotes pourraient être la cause de cet effet (Meier *et al.*, 2003).

Dernièrement, une autre équipe a démontré que les promastigotes de *L. donovani* interféraient avec les radeaux lipidiques de macrophages spléniques de souris et de macrophages P388D1 pour inhiber la présentation antigénique (Chakraborty *et al.*, 2005). Ils ont tout d'abord montré que des macrophages infectés depuis 24h ou 48h présentaient beaucoup moins l'antigène λ_{12-26} . Dans ces expériences, l'antigène soluble était présent à de faibles concentrations (2 μ M) et était internalisé par endocytose par les macrophages. Les radeaux lipidiques forment des structures hautement ordonnées et possèdent une température de fusion élevée (Brown and London, 2000). Les auteurs ont ainsi constaté qu'une infection par des promastigotes de *L. donovani* causait l'augmentation de la fluidité membranaire des radeaux lipidiques, déstabilisant ainsi leur structure. Pour associer l'inhibition de la présentation antigénique à la déstabilisation des microdomaines lipidiques par les promastigotes, deux moyens ont été utilisés. Ils ont tout d'abord abaissé la température de culture des macrophages infectés à 15°C, de manière à restaurer l'intégrité des radeaux lipidiques. Dans le même objectif, l'ajout de cholestérol transporté par des liposomes à des macrophages infectés a également été utilisé. Dans un cas comme dans l'autre, l'augmentation de l'intégrité membranaire associée aux radeaux lipidiques rétablissait la capacité de présentation antigénique des macrophages infectés. Ces travaux mettent donc en relief l'impact de *L. donovani* sur l'intégrité des radeaux lipidiques et par surcroît du rôle de ces microdomaines dans la concentration des molécules associées à la présentation antigénique pour favoriser l'activation des cellules T spécifiques.

Bien qu'il soit maintenant établi que *L. donovani* échappe à la surveillance du système immunitaire en altérant les radeaux lipidiques, les molécules ou les mécanismes avec lesquels les promastigotes réussissent à saboter le macrophage ne sont pas encore tous connus. Le LPG est une molécule essentielle pour l'établissement de l'infection du promastigote en interférant avec de nombreuses fonctions du macrophage. On peut donc avancer que cette molécule pourrait également interférer au niveau de la présentation antigénique. Suite à l'internalisation d'une particule, le phagosome acquiert normalement toute la machinerie nécessaire à la présentation antigénique, mais il se pourrait que l'inhibition de la maturation du phagosome associée au LPG puisse également entraîner une altération de la présentation antigénique via le CMH II.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

1.1 Macrophages

La lignée de macrophage RAW 264.7 *CIITA* (H-2d), dérivé de souris BALB/c, a été généreusement fournie par Dr Jacques Thibodeau (Université de Montréal). Les RAW 264.7 *CIITA* expriment le CMH II de manière constitutive, et ne nécessitent donc d'activation par l'IFN- γ . Ces cellules ont été cultivées par passages successifs dans des pétris non-traités pour l'adhérence (Fisher Scientific, CO, PA, USA), à une température de 37°C avec 5% de CO₂. Le milieu de culture des macrophages (DMEM complet) était composé de DMEM (Dubelcco's modified Eagle's Medium) avec glutamine (Life Technologies, Mississauga, ON, Canada) auquel était ajouté 10% de sérum de veau foetal (Hyclone, Logan, UT) inactivé à la chaleur (30 minutes à 65°C); 20 mM d'Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pH 7.0 (Sigma, St-Louis, Missouri, USA); 1% v/v d'un mélange de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (100 U/ml) (Gibco, Grand Island, NY, USA) et de G418 (500 μ g/ml).

1.2 *Leishmania*

Les promastigotes de *Leishmania donovani* de type sauvage (souche 1S) et déficients en phosphoglycans *lpg2* KO ont été cultivés par passages successifs, à 26°C, dans du milieu de culture pour promastigotes à pH 7.4. Les promastigotes *lpg2* KO ne synthétisent pas les unités répétées Gal β 1,4Man α 1-PO₄ (Descoteaux *et al.*, 1995) et ont été décrits précédemment (Scianimanico *et al.* 1999). Le milieu pour promastigote consiste en du milieu M199 pH 7.4 modifié (Life Technologies). À un volume de 500 ml de milieu M199 sont ajoutés 10% de sérum de veau foetal (Hyclone, Logan, UT) inactivé à la chaleur (30 minutes à 65°C); 40 mM d'HEPES pH 7.0 (Sigma); 5 ml de pénicilline/streptomycine (Gibco); 5 ml d'adénine 100X (10 mM dissout dans H₂O) (Sigma); 1 ml d'hémine 500X (0,25% dans 50% de triethanolamine) (Sigma); 0.5 ml de biotine (0.1% dans 95% d'éthanol) (Sigma) et 2 ml de 6-bioptérine (0.25 mg/ml) (Sigma). Le milieu est ensuite filtré avant d'être utilisé. Les promastigotes subissaient

un passage à une concentration de 0.2×10^6 promastigotes/ml lorsqu'ils étaient en phase stationnaire de croissance (50 à 100×10^6 promastigotes/ml). Cette méthode permettait d'obtenir des promastigotes en phase log (5 à 10×10^6 promastigotes/ml) le lendemain, et de les passer à nouveau le surlendemain lorsqu'ils atteignaient à nouveau la phase stationnaire. Les promastigotes *pKS-NEO-SP-OVA* exprimant l'antigène OVA_t sécrétée ont été cultivés dans ce même milieu, auquel ont été ajouté 100 mg/ml de G418 pour favoriser la sélection des transfectants.

1.3 DO.11.10

Les hybridomes de cellule T DO.11.10 (dérivé de souris BALB/c, spécifiques au complexe OVA-H-2d) ont été gracieusement fournis par le Dr Claude Daniel (INRS-IAF, Laval, QC, Canada) (Murphy *et al.*, 1990). Ces cellules ont été cultivées dans des flacons 25 cm² dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO_2 . Le milieu de culture était composé de milieu DMEM complet (voir section 1.1) auquel était ajouté 0.5 mM de 2-mercaptoéthanol. Le milieu était ensuite filtré et conservé à 4°C . Les cellules DO.11.10 sont en phase log entre 0.4 et 0.8×10^6 cellules/ml et atteignent leur confluence entre 0.9 et 1.5×10^6 cellules/ml. Une fois en état stationnaire, un passage des hybridomes était fait à $0,2 \times 10^6$ cellules/ml dans 5 ml de milieu de culture pour obtenir, le lendemain, des cellules en phase log. C'est lorsqu'ils sont en phase log que les hybridomes sécrètent le plus d'IL-2, en réponse à la reconnaissance du complexe OVA₃₂₃₋₃₃₉-H-2d sur le macrophage.

1.4 CTLL

Les cellules CTLL, gentiment fournies par le Dr Claude Daniel (INRS-IAF, Laval, QC, Canada), ont été cultivées dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO_2 . Le milieu de culture pour cellules CTLL était composé de RPMI 1640 (Gibco) avec de la glutamine (Gibco), auquel était ajouté 10% de sérum de veau foetal (Hyclone, Logan, UT), 0.5% v/v d'un mélange de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (100 U/ml) (Gibco) et 0.3 ng/ml d'IL-2 recombinante de souris (R&D Systems, Minneapolis, MN USA). Les

cellules CTLL ont été maintenues en culture de deux façons : par passages successifs en flacon aux deux jours et par passages aux cinq jours en plaque. Pour les passages en flacon, 250 000 cellules sevrées en IL-2 (les cellules deviennent déformées) ont été mises dans 5 ml de milieu de culture pour cellules CTLL, en flacon, et ce pour 48 h. Pour les passages en plaque de 24 puits, 1 ml par puits de milieu de culture a été déposé dans six puits. Ensuite, 500 µL de milieu contenant 100 000 cellules sevrées en IL-2 ont été ajoutés et mélangés au premier puits. Le même volume a ensuite été prélevé du premier puits et mélangé au second et ainsi de suite, de manière à faire des dilutions jusqu'au sixième puits. Après cinq jours d'incubation, les puits contenant des cellules s'étant multipliées et sevrées ont servi à faire des passages de la même manière, ou en flacon tel que décrit précédemment.

2. Isolement de macrophages

Pour les analyses d'activation d'hybridomes et les analyses par microscopie, des macrophages dérivés de la moelle osseuse et péritonéaux ont été utilisés en plus de ceux provenant de lignées cellulaires.

2.1 Macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM)

Les BMM ont été obtenus à partir de souris femelles BALB/c de 6 à 8 semaines (Charles River, St-Constant, Québec, Canada), comme décrit précédemment (Privé and Descoteaux, 2000). La moelle osseuse a été prélevée de fémurs de souris en injectant, à l'aide d'une seringue, une solution composée de Hank's Balanced Salt Solution froid (HBSS) (Gibco), d'un mélange d'antibiotiques P/S et d'HEPES 20 mM. Le HBSS contenant la moelle osseuse a ensuite été centrifugé à 2000 tours/min, à 4°C, pendant 5 min. Pour lyser les globules rouges, le culot a été resuspendu avec 10 ml d'une solution à 0.17M pH 7.35 de NH₄CL, pendant 7 min sur glace. Après avoir ajouté 10 ml de solution de HBSS pour arrêter la lyse, le mélange a été centrifugé à nouveau pendant 5 min à 2000 tours/min, à 4°C. Après avoir enlevé le surnageant, les cellules restantes ont été resuspendues dans du DMEM complet (voir section 1.1) auquel étaient ajoutés 15%

(v/v) de L929 cell-conditioned medium (LCM), qui contient du CSF-1 (colony-stimulating factor). Cette solution a été déposée dans des pétris adhérents pendant 24 h à 37°C/5% CO₂ pour laisser adhérer les cellules matures. Ensuite, les surnageants contenant les précurseurs de BMM ont été prélevés et déposés dans des pétris non-traités pour l'adhérence, de manière à avoir un volume total de 8 ml par pétri. Les cellules ont été incubées pendant sept jours à 37°C à 5% CO₂. Durant cette incubation, 1 ml de LCM par pétri était ajouté à tous les deux jours. À la fin de la différenciation, les macrophages adhérents ont été décollés à l'aide d'un grattoir, dans une solution de HBSS froid. Une période d'incubation à 37°C/5% CO₂ d'au moins 18 h dans du milieu DMEM complet sans LCM précédait toujours les expériences.

2.2 Macrophages péritonéaux

Contrairement aux BMM, les macrophages péritonéaux peuvent être directement extraits des souris sans passer par une étape de différenciation *in vitro*. Pour ce faire, des souris femelles BALB/c de 6 à 8 semaines (Charles River) ont été injectées, dans la cavité intra péritonéale, avec une solution de protéose-peptone 3%. Après trois jours, les souris ont été sacrifiées pour permettre de récupérer les macrophages. En lavant la cavité intra péritonéale à l'aide de HBSS sans calcium ni magnésium (Gibco), les macrophages ont été extraits et gardés sur glace dans cette solution. Après une centrifugation à 1000 rpm, pendant 7 min, à 4°C, les cellules ont été resuspendues dans 5 ml de NH₄Cl à 0.17M pH 7.35 pour lyser les globules rouges et laissés sur glace pendant 5 min. Après avoir ajouté 10 ml de DMEM (Gibco) pour arrêter la lyse, une centrifugation à 1000 rpm, pendant 7 min à 4°C a permis d'isoler les macrophages. Les cellules ont finalement été resuspendues dans du DMEM complet (voir section 1.1) avant de servir aux expériences.

3. Transfection de *Leishmania* par électroporation

Pour leur permettre d'exprimer OVA_t, nous avons transfecté, par électroporation, les promastigotes *L. donovani* de type sauvage et *lpg2* KO avec le plasmide *pKS NEO-PS-OVA*, gracieusement donné par Dr Alain Debrabant. Dans 0.4 ml de tampon

d'électroporation (Hepes pH 7.5, 21 mM; NaCl 137 mM; KCl 5 mM; Na₂PO₄ 0.7 mM; glucose 6 mM) (Descoteaux *et al.* 1994), 4 X 10⁷ promastigotes ont été électroporés à 500 µF et à 450 volts avec 10 µg d'ADN plasmidique *pKS NEO-PS-OVA*. L'électroporation s'est déroulée dans des cuvettes de 0.2 cm (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) avec l'appareil Gene Pulser (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Les échantillons ont été conservés sur glace avant l'électroporation et ont été remis sur glace pendant 10 min par la suite. Les promastigotes électroporés ont ensuite été transférés dans un flacon 25 cm² contenant 10 ml de milieu pour promastigotes pH 7.4 (voir section 1.2) et incubés à 26°C. Après 24 h, 50 µg/ml de G418 ont été ajoutés pour sélectionner les cellules transfectées. Environ deux semaines après l'électroporation, les promastigotes ont pu être cultivés par passages successifs et être utilisés pour les analyses.

4. Détection par immunoprécipitation de la production d'ovalbumine tronquée (OVAt) par *Leishmania*

L'immunoprécipitation de protéines contenant de la méthionine marquée au [³⁵S] permet une détection accrue en comparaison avec une révélation par immunobuvardage de type western. La protéine ovalbumine tronquée sécrétée par les transfectants devait être détectée dans le milieu extracellulaire et sa détection nécessitait donc une méthode très sensible, étant donné son faible niveau d'expression. Les étapes menant à la détection incluent l'incorporation de la [³⁵S]Met par les promastigotes, la lyse de ceux-ci, l'immunoprécipitation, la séparation sur gel SDS-PAGE et la détection, tel que décrit précédemment pour des *Leishmania major* (Bertholet, S. et al. 2005).

4.1 Incorporation de la méthionine marquée au [³⁵S] dans les promastigotes et préparation des échantillons

Des promastigotes en phase log transfectés avec *pKS NEO-PS-OVA* (5 à 10 x 10⁶ cellules/ml) ont été lavés trois fois par centrifugation (2600 rpm, 7 min) dans du DMEM sans méthionine (Life Technologies) pour les sevrer en cet acide aminé. Les promastigotes ont ensuite été resuspendus à 2 x 10⁸ cellules/ml dans ce milieu additionné

de [³⁵S]Met (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) à une concentration finale de 100 µCi/ml et incubés à 26°C pendant 30 min. Après cette incorporation, les promastigotes ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 3 min, resuspendus dans du milieu pour promastigotes pH 7.4 à 0.5 x 10⁸ cellules/ml et incubés à 26°C pour des temps de chasse variant de 0 h à 24 h. Après le temps de chasse désiré, des aliquots de 1 ml contenant approximativement 0.5 x 10⁸ cellules/ml ont été pris et centrifugés à 5000 rpm pendant 5 min, de manière à récolter les surnageants. Ces surnageants ont été déposés dans d'autres tubes de microcentrifuge, centrifugés à nouveau à 10 000 rpm/15 min pour enlever les débris et gardés sur glace. Pendant ce temps, les culots de promastigotes ont été lavés dans un tampon phosphate froid (50 mM de Na₂HPO₄; 150 mM de NaCl; PBS pH 7.4) et centrifugés à 5000 rpm/ 5 min. Les promastigotes ont ensuite été lysés à 1 x 10⁸ cellules/ml dans un tampon de lyse (50 mM Tris pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% (v/v) NP-40, 5 mM EDTA; 0.5% acide desoxycholique; 0.1% (w/v) SDS) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche Applied Science, Suisse) pendant 30 min sur glace. Après avoir été vortexés pendant une minute, les échantillons contenant les extraits cellulaires ont été centrifugés à 10 000 rpm à 4°C pendant 30 min, puis les lysats dépourvus de débris ont été récupérés et gardés sur glace. Les lysats cellulaires et les surnageants ont été conservés sur glace jusqu'à l'immunoprécipitation.

4.2 Immunoprécipitation d'OVA

Pour immunoprécipiter OVA, 20 µL de billes IPA300 (Repligen Corporation, Waltham, MA, USA) par échantillon ont été lavées trois fois (20 sec à 10 000 rpm puis aspiration du surnageant) dans du tampon de lyse (voir section 4.1). Les billes lavées ont été resuspendues dans 500 µL de ce même tampon de lyse. Deux µg d'anticorps polyclonal anti-OVA de lapin (Sigma) ont été ajoutés à ces billes, avant d'incuber à 4°C avec rotation pendant environ 18 h pour favoriser l'adsorption des anticorps sur les billes. Les anticorps non liés aux billes ont ensuite été enlevés par trois lavages successifs dans du tampon de lyse puis les billes ont été resuspendues dans du tampon de lyse jusqu'à leur utilisation.

Après avoir obtenu les lysats cellulaires et les milieux de culture de promastigotes (voir section 4.1), chacun de ces échantillons a été resuspendu dans 20 μ l de billes vierges préalablement lavées pour faire adsorber les protéines non spécifiques sur les billes. Après une heure d'incubation à 4°C avec rotation, les échantillons ont été centrifugés (10 000 rpm/5 min) pour faire descendre les billes puis les surnageants contenant les protéines non adsorbées ont été récupérés. Les échantillons ont ensuite été ajoutés aux billes couplées aux anticorps anti-OVA dans un volume total de 500 μ L dans du tampon de lyse et incubés à 4°C, avec rotation, pendant 18 h. Cette incubation a permis aux billes couplées aux anticorps de former des complexes avec OVA. Après cette période de liaison, les échantillons ont été lavés trois fois puis les billes ont été resuspendues dans 20 ml de tampon de chargement (2% SDS, 60 mM Tris-HCl pH 6.8 et 2.5% β -mercaptoethanal) (Descoteaux, A. *et al.*, 2002) pendant 5 min à 100°C pour libérer les protéines. Les échantillons ont finalement été centrifugés pendant 20 sec à 10 000 rpm pour permettre de récupérer les surnageants à charger sur gel SDS-PAGE.

4.3 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE et détection d'ovalbumine

Les protéines retrouvées dans les échantillons immunoprécipités ont été séparées sur gel SDS-polyacrylamide de 10%, composé d'un gel de regroupement (4% d'acrylamide/Bis, 0.125 M de Tris-HCL pH 6.8, 0.001% de SDS, 0.05% de persulfate d'ammonium et 0.001% (v/v) de TEMED) et d'un gel de séparation (10% d'acrylamide/Bis, 0.375 M de Tris-HCL pH 8.8, 0.1% de SDS, 0.1% de persulfate d'ammonium et 0.0005% (v/v) de TEMED). Les protéines ont migré à 200 Volts pendant environ 50 min à l'aide de l'appareil Mini-Protean II (Bio-Rad). L'électrophorèse s'est fait dans un tampon de migration 1X dilué avec du H₂O déionisé à partir d'une solution 5X (15g/L de Tris, 72g/L de glycine et 5 g/L de SDS dans de l'eau déionisée).

Une fois la migration terminée, le marqueur moléculaire a été marqué en piquant le gel à l'aide d'une aiguille trempée dans une dilution 20 :1 de [³⁵S]Met . Pour sécher le

gel, ce dernier a tout d'abord été déposé sur un papier de 3 mm absorbant en prenant soin d'éliminer les bulles d'air. Ce carton a été déposé sur l'appareil Gel Slab Dryer Model 224 (Biorad) et recouvert d'une pellicule de plastique avant d'être déshydraté. Une fois le séchage terminé, le gel séché sur le carton a été déposé dans une cassette sensible au rayonnement émis par l'isotope, pour une période allant de 24 h à 7 jours. La présence d'OVA^t comportant de la méthionine marquée au [³⁵S] a finalement été détectée avec l'appareil PhosphoImager (GE Healthcare).

5. Opsonisation de particules avec de l'ovalbumine

Pour permettre aux macrophages de phagocyter des particules comportant de plus grandes quantités d'ovalbumine par rapport aux promastigotes *pKS NEO-PS-OVA*, des promastigotes et des particules de zymosan ont été recouvertes d'ovalbumine soluble. Des billes de latex recouvertes d'ovalbumine ont de plus servi de témoins positifs pour toutes les expériences d'activation des cellules DO.11.10.

5.1 Préparation des billes de latex recouvertes d'ovalbumine

Des billes de latex de 3 µm (Polysciences, Warrington, PA, USA) ont été conjuguées à de l'ovalbumine de manière non covalente tel que décrit précédemment (Ramachandra and Harding, 2000). Dans un tube de microcentrifuge, 15 µL de billes de latex 3 µm ont subi trois lavages dans du tampon citrate pH 4.2, par centrifugation à 6000 rpm pendant 3 min. Au dernier lavage, les billes ont été resuspendues dans 500 µL de tampon citrate contenant de l'ovalbumine (Sigma) à 10 mg/ml. Ces tubes ont été incubés à 4°C pendant 48 h avec rotation, avant de subir deux lavages dans le tampon citrate pour être conservés à 4°C jusqu'au jour de l'expérience. Avant les expériences impliquant la phagocytose de billes, celles-ci ont été lavées à nouveau deux fois dans du tampon citrate, resuspendues dans du DMEM complet puis utilisées pour les expériences.

5.2 Opsonisation de promastigotes avec de l'ovalbumine

Des promastigotes de *L. donovani* (1×10^7 cellules) en phase stationnaire de croissance ont été centrifugés dans des tubes de microcentrifuge à 6 000 rpm pendant 4 min. Les parasites ont été resuspendus dans 100 μ L de DMEM (Life Technologies) auquel était ajouté de l'ovalbumine soluble (Sigma) à des concentrations de 0.1, 1 et 10 mg/ml. Pour les expériences impliquant une phagocytose des promastigotes, 10% de sérum de souris DBA/2 déficientes pour le facteur du complément C5 (Charles River) était ajouté au milieu DMEM en même temps que l'ovalbumine. Après l'ajout de DMEM contenant de l'ovalbumine, les tubes ont été vortexés pendant environ 10 sec pour resuspendre uniformément les promastigotes. Les promastigotes ont ainsi été incubés à température pièce pendant 30 min, en étant vortexés quelques secondes à toutes les 10 min. Après trois lavages successifs dans du DMEM pour enlever l'ovalbumine non liée, les promastigotes étaient prêts à être utilisés pour les expériences de phagocytose.

5.3 Opsonisation d'ovalbumine sur des particules de zymosan

Le protocole pour l'opsonisation de particules de zymosan avec l'ovalbumine est le même que celui utilisé pour les promastigotes (section 5.2), la seule différence se situant au niveau de l'incubation qui se déroule à 37°C plutôt qu'à température pièce lors de la liaison de l'ovalbumine.

6. Détection de la présence d'ovalbumine chez les promastigotes transfectés et recouverts d'ovalbumine par immunobuvardage de type Western

Pour s'assurer de l'efficacité de l'opsonisation des promastigotes avec de l'ovalbumine, l'immunobuvardage de type Western a été utilisée. Cette technique a permis de faire des comparaisons quantitatives de la présence d'ovalbumine entre les promastigotes opsonisés avec l'ovalbumine et les transfectants exprimant OVA_t.

6.1 Lysats cellulaires de *Leishmania*

Des promastigotes (1×10^8 cellules) de type sauvage et *lpg2* KO ont été recouverts avec de l'ovalbumine à une concentration de 10 mg/ml tel que décrit précédemment (section 5.2). Après les trois lavages avec du DMEM, les promastigotes ont été lavés deux fois avec du PBS puis lysés dans 150 μ L de tampon de lyse NP40 (voir section 4.1) pendant 30 min sur glace. En parallèle, des promastigotes *pKS NEO-PS-OVA* ont également été lysés de la même façon.

6.2 Dosage des protéines BCA (Pierce, Rockfort, IL)

Pour déterminer la concentration en protéines de chaque lysat cellulaire, la trousse « BCA Protein » de la compagnie Pierce a été utilisée. Dans une plaque de 96 puits, dix μ L provenant de solutions d'albumine (Pierce) à concentrations croissantes (courbe standard) et de chacun des lysats (dilué 1/5) ont été incubés pendant 30 min en présence de 200 μ L des réactifs fournis, soit 50 parties de la solution A avec 1 partie de la solution B (trousse « BCA Protein », Pierce). Avec un spectrophotomètre, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 540 nm, ce qui a permis d'obtenir une courbe standard à laquelle correspondait une équation du type $y = ax+b$. Cette équation a finalement mené à la détermination des concentrations protéiques des échantillons.

6.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) et transfert sur membrane de nitrocellulose

Quinze μ g par échantillon de protéines ont été incubés à 100°C pendant 5 min dans du tampon de chargement (voir section 4.2) avant d'être séparés sur gel de SDS-polyacrylamide 10% (voir section 4.3). Un électro-transfert de type semi-sec a ensuite servi à transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Amersham Life Science, ON, Canada). Pour ce faire, le gel et la membrane de nitrocellulose ont été placés dans l'appareil Transblot SD semi-sec transfer cell (Biorad)

et gardés humectés grâce au tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0.037%, méthanol 20% (v/v) dans H₂O déionisé). Un courant de 15 Volts pendant 30 min a permis aux protéines de migrer sur la membrane de nitrocellulose. L'efficacité de migration a été vérifiée par révélation au rouge Ponceau (0.5% de rouge Ponceau (Sigma), 0.1% d'acide acétique dans H₂O). Finalement, les membranes ont été incubées pendant une heure, dans une solution de blocage (PBS 1X, 0.1% Tween-20, 5% BSA (ICN Biomedicals, Ohio, USA)) à température pièce sur un plateau rotateur.

6.4 Immunobuvardage de type Western

Après le blocage, les membranes ont tout d'abord subi des lavages successifs (4 fois 15 min) avec la solution de lavage (PBS 1X, 0.1% Tween-20). Elles ont ensuite été incubées à 4°C, pendant la nuit sur plateau rotateur, avec l'anticorps anti-ovalbumine polyclonal (Sigma) dilué 1/10 000 dans une solution de blocage (voir section 6.3). Après des lavages successifs, les membranes ont été placées en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin 1/10 000 couplé à la peroxydase (Amersham Life Science), pendant 1 h à température ambiante sur plateau rotateur. Les membranes ont subi une dernière série de lavages avant d'être incubées pendant 1 min à température pièce dans un mélange de solution A et de solution B de la trousse de réactifs ECL (Amersham Life Science), selon les recommandations du fabricant. La révélation d'ovalbumine s'est faite avec le développeur de type mini-med/90 (AFP Imaging, NY, USA).

7. Détection de l'accumulation d'actine périphagosomale par immunofluorescence

Pour vérifier l'effet du LPG sur la présentation antigénique, des particules de zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ont été opsonisées avec du LPG et de l'ovalbumine. Pour vérifier l'effet de la présence de LPG sur les particules de zymosan, l'accumulation d'actine périphagosomale de macrophages ayant phagocyté ces particules a été vérifiée par immunofluorescence.

7.1 Préparation des particules de zymosan recouvertes de LPG

Du LPG purifié de *L. donovani* (gracieusement fourni par Dr S. Turco, Université du Kentucky, Lexington, KY, USA) a été passé au sonicateur pendant 5 min avant d'être resuspendu à 1 mg/ml dans du PBS pH 7.3 et conservé à -20°C. Avant l'opsonisation, un aliquot de LPG a été décongelé, soniqué et dilué à 25µM dans 500 µL de PBS pH 7.3. Pendant ce temps, 3×10^7 particules de zymosan ont été lavées trois fois dans du PBS pH 7.3 et resuspendues avec le 500 ml de PBS contenant du LPG à 25 mM. Les particules de zymosan ont été incubées à 37°C avec rotation pendant 1 h, lavées deux fois dans du PBS pH 7.4 et resuspendues dans 600 µL de PBS pH 7.4 (Holm *et al.*, 2001). Les particules de zymosan-LPG ont ensuite été incubées à 37°C pendant 30 min dans 500 µL de PBS pH 7,4 contenant de l'ovalbumine à 10 mg/ml. Les particules de zymosan recouvertes de LPG ont finalement été lavées trois fois dans du PBS. Pour s'assurer de la présence de LPG sur les particules de zymosan, un test d'agglutination a été fait. Pour ce faire des anticorps anti-LPG (gentiment fourni par Dr S. Turco, Université du Kentucky, Lexington, KY, USA) ont été mélangés aux particules de zymosan à une concentration 1/100 et l'agglutination a été vérifiée au microscope optique.

7.2 Internalisation des particules de zymosan par les macrophages

Dans des plateaux de 24 puits contenant des lamelles rondes, 50 000 BMM par puits ont adhérents pendant la nuit dans du DMEM complet (voir section 1.1). Le lendemain, des particules de zymosan recouvertes de LPG et d'ovalbumine et opsonisées par du sérum de souris BALB/c (Charles River) ont été incubées à 37°C avec les macrophages à un ratio 5 :1. Après une phagocytose de 20 min, les cellules ont été lavées trois fois dans du DMEM pour enlever les particules non internalisées, puis incubées à nouveau à 37°C pendant un temps de chasse de 40 min dans du DMEM complet. En parallèle, des témoins négatifs étaient faits en utilisant des particules de zymosan recouvertes d'ovalbumine et opsonisées par du sérum.

7.3 Détection de l'accumulation d'actine périphagosomale chez le macrophage par immunofluorescence

L'accumulation d'actine périphagosomale chez le macrophage dérivé de la moelle osseuse a été vérifiée tel que décrit précédemment (Lodge and Descoteaux, 2005a). Après le temps de chasse, les macrophages ont été lavés une fois dans du PBS froid puis fixés avec une solution de paraformaldéhyde 4% dans du PBS pendant 10 min. Après quatre lavages de 5 min dans du PBS, les cellules ont été perméabilisées avec une solution de triton X-100, et les liens non spécifiques et les récepteurs de surface Fc γ ont été bloqués avec de la BSA 10 mg/ml et 20 % de sérum normal de chèvre respectivement, pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, les lamelles ont été lavées trois fois, dont un dernier lavage de 10 min, avant d'être recouvertes avec une solution contenant de la phalloïdine-Alexa 568 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluée 1/100 dans du PBS, pendant 30 min à température pièce. Les lamelles ont finalement été montées sur des lames en utilisant du Fluoromount (Southern Biotech, Interscience, Markham, ON, Canada) puis scellées à l'aide de verni à ongle. L'accumulation d'actine au phagosome a été vérifiée par microscopie confocale à 100X à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse E800 équipé d'un système d'imagerie confocale Radiance 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Les images présentées sont représentatives d'au moins 50 phagosomes observés.

8. Quantification de la présentation antigénique

L'effet du LPG sur la capacité des macrophages à stimuler des cellules T spécifiques à l'ovalbumine a été vérifié en quantifiant la sécrétion d'IL-2 par les hybridomes DO.11.10 (adapté de Ramachandra, L. *et al.*, 1999). Cette méthode consiste tout d'abord en l'internalisation de particules par des macrophages suivie d'un temps de chasse. Les macrophages sont ensuite mis en présence de cellules DO.11.10, qui sécrètent de l'IL-2 suite à leur activation par la liaison au complexe CMH II-OVA₃₂₃₋₃₃₉. Le milieu contenant de l'IL-2 est ensuite ajouté à des cellules CTLL dépendantes de

l'IL-2, et leur multiplication est quantifiée grâce au compte d'incorporation de thymidine marquée au tritium.

8.1 Infection des macrophages

Les macrophages RAW 264.7 *CIITA* (2×10^4 cellules/puits) ont été adhérents sur une plaque 96 puits dans 200 μL de DMEM complet auxquels était ajouté du G418 (500 $\mu\text{g/ml}$) pendant un maximum de 18 h. Pour leur part, les BMM ont été adhérents en plaque 96 puits dans du DMEM complet pendant 4 h, avant que les cellules non adhérentes soient enlevées par aspiration. Les BMM ont ensuite été incubés pendant 18 h à 37°C , dans 200 μL de DMEM complet avec de l'IFN- γ (10 U/ μl). Les macrophages adhérents ont été mis en présence de billes-ovalbumine, de particules de zymosan ou de promastigotes, à des ratios de 20:1, dans du DMEM complet. Dans le cas des promastigotes et des particules de zymosan, les particules ont été préalablement opsonisées avec du sérum de souris et avec de l'ovalbumine (voir section 5). L'ajout des billes, promastigotes et des particules de zymosan a été suivi d'une incubation de 10 min à 4°C pour faire descendre par gravité les particules sur les macrophages. Dans le cas de la co-internalisation de promastigotes et de billes-ovalbumine par les macrophages, les deux types de particules ont été mélangés dans le même milieu, tous deux à un ratio de 20 :1, avant d'être mis en contact avec les macrophages. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pour un temps de phagocytose de 2 h, suivi de trois lavages avec du DMEM froid, et de temps de chasse variables (2 h, 4 h ou 8 h) à 37°C . À la fin des temps de chasse, les macrophages ont été lavés avec du PBS froid, fixés pendant 10 min avec de la formaldéhyde 0.5% dans du PBS puis lavés à nouveau avec du PBS.

8.2 Expériences d'activation des hybridomes DO.11.10

Suite à la fixation à la paraformaldéhyde, 1×10^5 cellules DO.11.10 en phase log de croissance ont été ajoutés aux macrophages pour 24 h à 37°C , dans du milieu pour DO.11.10 (voir section 1.3). Suite à l'incubation, 100 μL /puits de surnageant ont été prélevés et ajoutés à 5 000 cellules CTLL sevrées en IL-2, dans un volume total de 200

μL par puits. Les surnageants pouvaient également être congelés à -20°C , jusqu'à l'ajout de cellules CTLL. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant environ 18 h, soit jusqu'à ce que les cellules CTLL incubées sans IL-2 deviennent crénelées. À ce moment, $0.4 \mu\text{Ci}$ /puits de $[^3\text{H}]$ Thymidine a été ajouté aux cellules et celles-ci ont été incubées pendant un autre 18 h. Pour mesurer l'incorporation de $[^3\text{H}]$ Thymidine, l'ADN des cellules CTLL a été recueilli sur un filtre imprimé (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) avec le Harvester (Tomtec, Hamden, CT, USA) puis l'incorporation de radioactivité a été quantifiée à l'aide du compteur à scintillation Trilux 1450 microbeta (Wallac-PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Pour chaque expérience de prolifération des cellules CTLL, une courbe standard comportant des concentrations croissantes en IL-2 a été effectuée. Chaque analyse a été réalisée en triplicata, et les résultats montrés sont les plus représentatifs d'au moins trois expériences.

9. Comptes d'internalisation des promastigotes par les macrophages

De manière à normaliser les taux d'infection des macrophages par les promastigotes de type sauvage et déficients en LPG, nous avons procédé à des comptes de l'internalisation. Pour ce faire, des macrophages infectés ont été colorés avec de l'orange acridine, un marqueur d'acides nucléiques. L'orange acridine s'intercale dans l'ADN et fluoresce en vert (525 nm), et se lie à l'ARN de manière électrostatique et émet une fluorescence orange (630 nm) dans ce cas (Darzynkiewicz, Z., 1990)

La veille de l'infection, 80 000 BMM ont été adhérents en plaques de 24 puits sur des lamelles rondes dans du DMEM complet pendant 18 h à 37°C (voir section 1.1). Suite à l'incubation, des promastigotes de type sauvage (ratio 20 :1) et *lpg2* KO (ratios 10 :1, 15 :1 et 20 :1) opsonisés avec de l'ovalbumine et avec du sérum de souris C57 (voir section 5.1) ont été ajoutés aux macrophages pendant 2 h à 37°C dans du DMEM complet. Les lamelles ont ensuite été lavées, dans l'ordre, avec les solutions suivantes : 1 ml d'EtOH 95%, 1 ml d'EtOH 70%, 1 ml d'EtOH 50%, 1 ml de H_2O , 1 ml d'acide acétique 1%, 1 ml de H_2O et 1 ml d'acridine orange 0.05% (Sigma) pendant 3 min. Les

lamelles ont ensuite été submergées pendant 1 min dans un tampon de Sorensen 0.066 M pH 6 (Na_2HPO_4 0.01 M, KH_2PO_4 0.056 M dans d' H_2O) puis quelques secondes dans du CaCl_2 0.033 M. Les lamelles ont finalement reposé jusqu'au lendemain dans du tampon de Sorensen 0.066 M pH 6.8 (Na_2HPO_4 0.033 M, KH_2PO_4 0.033 M dans d' H_2O), et ce à 4°C dans l'obscurité (Gueron, E. *et al.*, 1993). Les lamelles ont été montées comme décrit à la section 8.3, et les comptes d'incorporation se sont faits par observation au microscope à fluorescence à 100X. Les résultats montrés proviennent de lames faites en triplicata et au moins 100 macrophages ont été analysés pour chacune de ces lames.

Chapitre 3

Résultats

1. La phagocytose de promastigotes par les macrophages n'entraîne pas une diminution de la présentation d'OVA₃₂₃₋₃₃₉ adhérent à des billes de latex

Le LPG du promastigote *L. donovani* inhibe la maturation du phagosome chez le macrophage. Cette altération se fait de manière localisée au phagosome contenant le promastigote, et a lieu dans les moments suivants la formation du phagosome (Desjardins and Descoteaux, 1997). En considérant ces faits, nous avons initialement voulu vérifier que le défaut de maturation de phagosomes contenant des promastigotes n'influait pas la capacité d'apprêter des antigènes chez un même macrophage, suite à la phagocytose.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons incubé des macrophages RAW 264.7 *CIITA* en présence de promastigotes et de billes de latex recouvertes d'ovalbumine (10 mg/ml). L'ovalbumine est une protéine qui possède entre autres l'épitope OVA₃₂₃₋₃₃₉ qui peut être chargé sur le CMH II de type Ia^d entre autres. Les cellules RAW 264.7 *CIITA* expriment le CMH II à de hauts niveaux de façon constitutive, sans toutefois devoir être activés. Après 2 h d'incubation, des observations au microscope optique ont démontré que la majorité des macrophages avaient internalisé des billes de latex et des promastigotes dans des phagosomes distincts. Après les lavages pour enlever les particules non phagocytées, les macrophages ont été incubés pour une courte période de chasse (2 h), avant d'être fixés avec du paraformaldéhyde. Le compte d'incorporation de [³H]Thymidine dans les cellules CTLL a été utilisé pour quantifier l'activation des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ par les macrophages. Les résultats présentés à la Figure 11 montrent que les surnageants provenant des co-cultures d'hybridomes DO.11.10 et de cellules RAW264.7 *CIITA* infectés ou non ont stimulé des niveaux similaires de prolifération des cellules CTLL. Ces résultats indiquent que l'hybridome DO.11.10 a sécrété des niveaux similaires d'IL-2 au contact de RAW264.7 *CIITA* ayant phagocyté des billes de latex recouvertes d'ovalbumine en présence ou non de promastigotes de *L. donovani*. Ceci signifie que la présence de promastigotes n'interfère pas avec la capacité des cellules RAW264.7 à apprêter et présenter le peptide

OVA₃₂₃₋₃₃₉. Ces résultats montrent que, dans ces conditions, l'inhibition de maturation du phagosome par le promastigote ne semble pas entraîner d'altération de la présentation antigénique liée à d'autres phagosomes. Des billes de latex sur lesquelles était adsorbée l'ovalbumine à une concentration de 10 mg/ml ont été utilisées comme témoin positif pour les autres expériences de présentation antigénique. De plus, la courbe standard montrant la prolifération des CTLL en fonction de la concentration en Il-2 démontre que les niveaux d'incorporation pour les billes-OVA à 10 mg/ml n'étaient pas obtenus en milieux saturant en Il-2. Tous les résultats de quantification de la présentation antigénique correspondent au plus représentatif d'au moins trois expériences identiques.

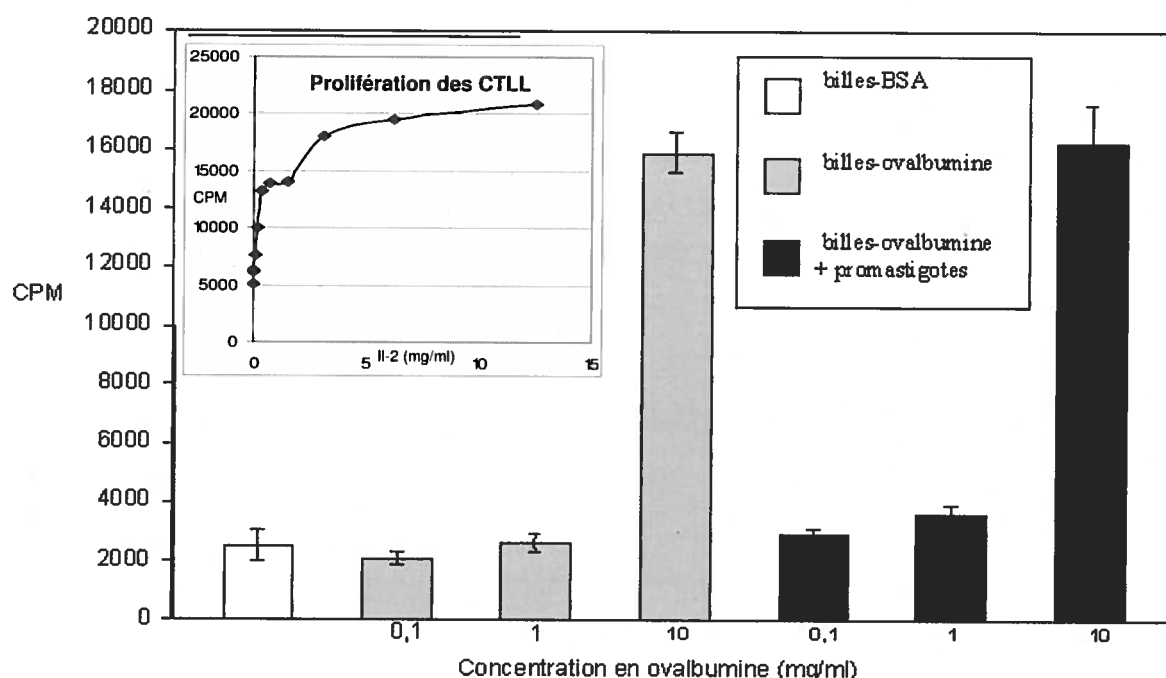


Figure 11. Niveaux d'incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTLL mises en contact avec des surnageants de cellules DO.11.10 incubées avec des macrophages RAW 264.7 CIITA non infectés et infectés.

Après avoir adhéré à des pétris pendant 18 h, des macrophages RAW 264.7 CIITA ont été incubés pendant 120 minutes en présence de billes de latex recouvertes d'ovalbumine à des concentrations variant de 0 à 10 mg/ml (barres grises). En parallèle, d'autres macrophages ont également été infectés par des promastigotes *L. donovani* à un ratio parasites : macrophage de 20 :1 (barres noires). Pour chaque expérience, des macrophages non infectés ayant internalisé des billes de latex recouvertes de BSA ont servi de témoins négatifs (barre blanche). Après 120 minutes de chasse, des cellules

DO.11.10 spécifiques à OVA₃₂₃₋₃₃₉ ont été ajoutées pour une période de 24 h. Le compte d'incorporation de [³H]Thymidine dans les cellules CTLL a ensuite servi à quantifier la quantité d'IL-2 sécrétée par les cellules DO.11.10 (CPM). Une courbe standard de la prolifération des CTLL en fonction de la concentration en Il-2 (dans l'encadré à gauche) permettait de titrer la concentration en Il-2 pour chaque résultat. Dans ces conditions, les macrophages infectés stimulaient les hybridomes au même niveau que des macrophages non infectés lorsque mis en présence de billes de latex-ovalbumine (10mg/ml).

2. Expression d'une forme tronquée de l'ovalbumine (OVAt) par *L. donovani*

Pour étudier l'effet de l'inhibition de la maturation du phagosome sur la présentation antigénique, il fallait tout d'abord se doter de promastigotes capables de sécréter l'antigène modèle, l'ovalbumine. De cette façon, un phagosome pourrait contenir à la fois un promastigote et l'antigène modèle. Ainsi, la détection de la présentation d'OVA₃₂₃₋₃₃₉ par les cellules DO.11.10 dépendrait uniquement de la capacité des phagosomes contenant les promastigotes à apprêter et charger l'antigène modèle, puis à migrer à la surface. À cette fin, nous avons transfecté des promastigotes avec un plasmide codant pour une forme tronquée de l'ovalbumine (OVAt). Cette protéine contient l'épitope chargé le CMH II (323-339). Pour que la protéine tronquée soit exprimée de façon sécrétée, une région codant pour un peptide signal (PS) précède le segment OVA (Figure 12A). Le plasmide *pKS NEO-PS-OVA* a donc été transfecté dans des promastigotes *L. donovani* de type sauvage et mutants *lpg2 KO*.

Les promastigotes de type sauvage et déficients en phosphoglycans qui ont été transfectés avec le plasmide *pKS NEO-PS-OVA* exprimaient bien la forme tronquée de l'ovalbumine (Figure 12B). La protéine a été détectée dans le milieu extracellulaire et, de manière plus importante, au niveau intracellulaire. Par immunoprécipitation, l'anticorps polyclonal spécifique à l'ovalbumine a permis la détection de la protéine tronquée (32 kDa) dans le milieu extracellulaire, sur une période allant de 2 h à 24 h suite à l'incorporation du [³⁵S]Met (résultats pour 0 h, 4 h et 18 h montrés). Par comparaison, des promastigotes transfectés avec le vecteur *pLEISH NEO* (témoin négatif) n'exprimaient pas la protéine d'intérêt. Nous n'avons pas détecté OVAt dans le

surnageant au temps zéro, puisque le prélèvement du milieu à ce temps se faisait immédiatement après les lavages pour enlever l'excédant de méthionine marquée au [³⁵S]. Pour tous les temps de chasse observés, les niveaux d'expression de l'ovalbumine tronquée étaient similaires en comparant les promastigotes de type sauvage aux mutants *lpg2* KO. De plus, ces promastigotes sécrétaient OVAt à des niveaux détectables autant à 2 h que 24 h de chasse, ce qui fait de ces transfectants des outils convenables pour l'étude du phagosome contenant un promastigote comme organelle impliqué dans la présentation antigénique.

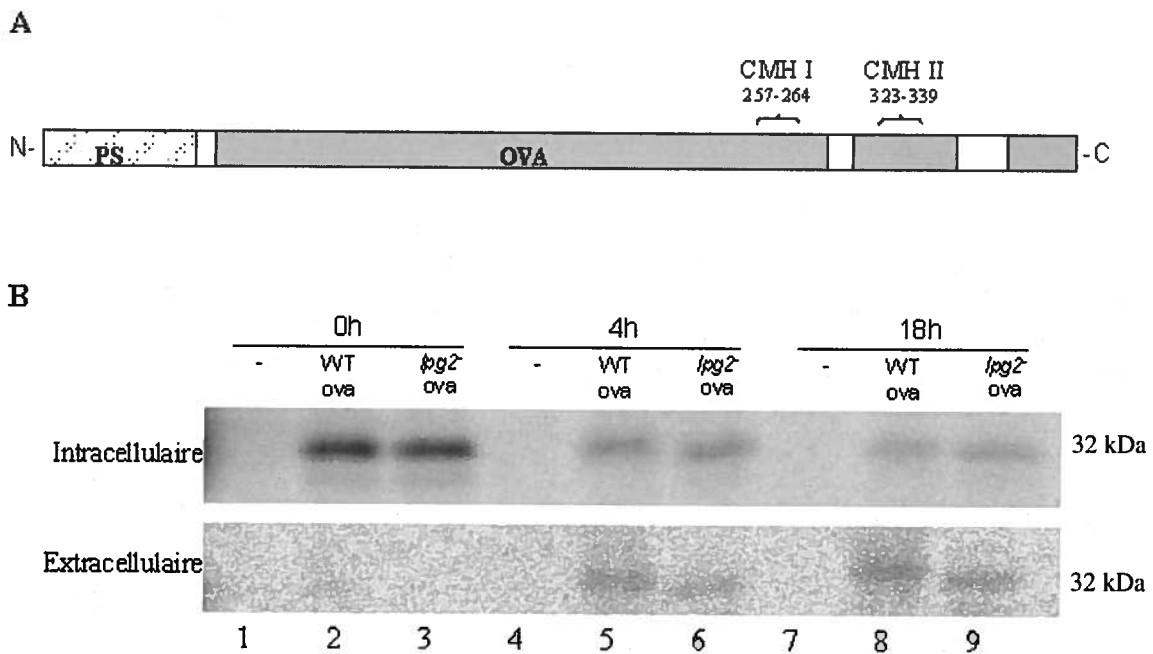


Figure 12. Expression d'OVAt par des promastigotes de type sauvage et déficients en phosphoglycans. A,

Le plasmide transfecté dans les promastigotes code pour un peptide signal (PS) qui cible la protéine OVAt nouvellement formée vers le réseau golgien pour permettre sa libération extracellulaire. La protéine OVAt possède les épitopes qui sont chargés respectivement sur le CMH I et le CMH II. **B,** les promastigotes transfectés expriment OVAt au niveau intracellulaire et sous forme sécrétée. Des promastigotes en phase *Log* transfectés avec *pKS NEO-PS-OVA* ont incorporé de la méthionine marquée au [³⁵S] pendant 30 min avant de subir de multiples lavages. À 0 h, 4 h et 18 h, les surnageants ont été récupérés et les parasites ont été lysés. Une immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-

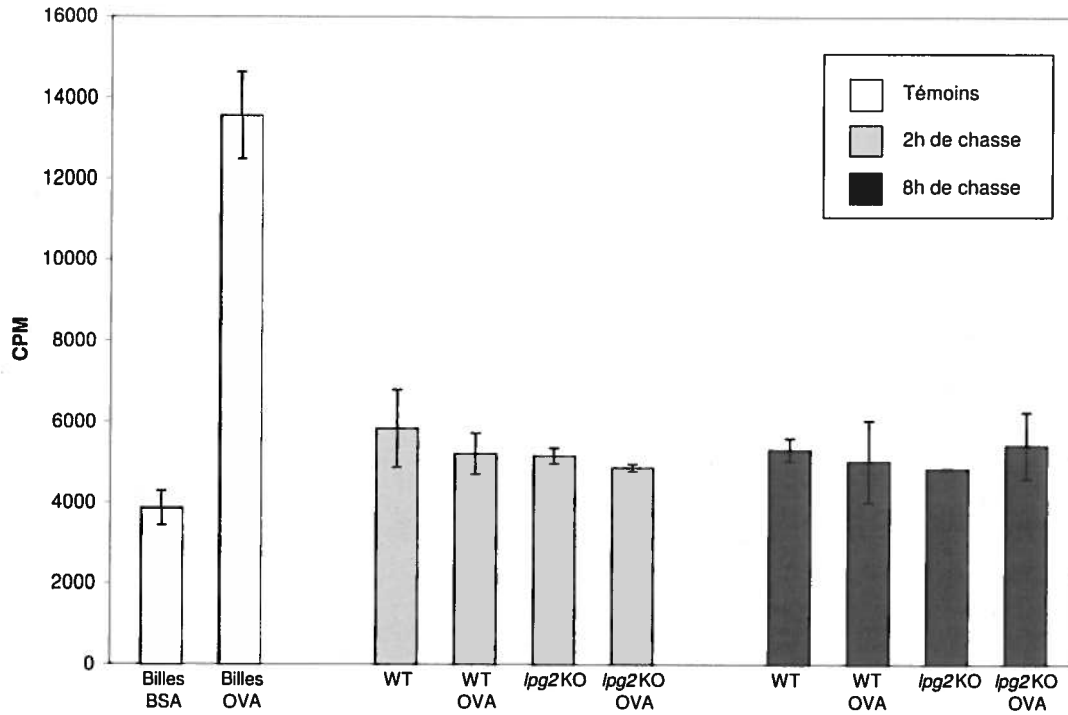
ovalbumine polyclonal de lapin a servi à révéler la présence d'OVA_t à 32 kDa. Des promastigotes non transfectés ont servi de témoin négatif.

3. Les macrophages infectés par des promastigotes exprimant une forme sécrétée d'OVA_t n'induisent pas l'activation des cellules DO.11.10

Puisque les promastigotes transfectés exprimaient OVA_t, nous pouvions mettre des macrophages en présence de ces parasites et ensuite quantifier la présentation antigénique. Les macrophages RAW 264.7 *CIITA* ont donc été incubés pendant 120 min avec des promastigotes de type sauvage et mutants *lpg2* KO exprimant OVA_t. Les cellules ont ensuite subi des lavages successifs et ont été incubées pendant de courts temps de chasse, soit 2 h et 8 h. En théorie, les transfectants pouvaient sécréter OVA_t dans le milieu phagosomal des macrophages pendant ces périodes de temps. Des expériences de présentation antigénique, précédemment décrites, ont suivi ces incubations pour vérifier la capacité des macrophages infectés à présenter OVA₃₂₃₋₃₃₉. Une telle façon de procéder permettait de vérifier l'impact du LPG sur la présentation antigénique, et ce de façon localisée au phagosome. Il est à noter que, pour toutes expériences qui impliquaient la phagocytose de promastigotes, une opsonisation au sérum de souris déficientes en C5 précédait l'internalisation. Puisque ce sérum ne contient pas le facteur C5, on s'assure que les promastigotes ne seront pas lysés avant leur liaison aux macrophages.

Tel que démontré à la figure 13, les macrophages RAW 264.7 *CIITA* infectés par les promastigotes de type sauvage exprimant OVA_t n'ont pas engendré de réponse de la part des cellules DO.11.10. Étonnamment, la phagocytose des transfectants *lpg2* KO par les macrophages n'a pas non plus causé l'activation des hybridomes de cellules T spécifiques. Contrairement à ce qui était attendu, l'absence de LPG sur *Leishmania* n'a pas amélioré la capacité des macrophages infectés à stimuler la réponse des cellules T. Ces résultats ont également été obtenus en utilisant des BMM comme phagocytes (résultats non montrés). Avant de tirer une conclusion sur l'effet du LPG sur la

présentation antigénique, il était important de poursuivre l'investigation puisque de nombreux facteurs pouvaient expliquer de tels résultats. La quantité d'antigène retrouvée dans le phagosome était peut-être insuffisante pour permettre la détection du complexe OVA₃₂₃₋₃₃₉-IA^d. Ou bien, il se pouvait que des molécules autres que le LPG puissent



causer l'inhibition de la présentation antigénique. Pour pallier au problème de la quantité d'antigène disponible, nous avons ensuite utilisé des particules de zymosan recouvertes de LPG et d'ovalbumine.

Figure 13. Niveaux d'incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTLL mises en contact avec des surnageants de cellules DO.11.10 incubées avec des macrophages infectés par des promastigotes.

Des macrophages RAW 264.7 *CIITA* ont phagocyté pendant 120 minutes des promastigotes en phase *Log* de type sauvage et *lpg2* KO transfectés de manière à sécréter OVA_t. Après trois lavages, les macrophages ont été incubés à 37°C pendant des temps de chasse de 2 h (barres grises) et 8 h (barres noires) avant d'être mis en contact avec des cellules DO.11.10. Des macrophages ayant phagocyté des billes de latex recouvertes de BSA et à l'ovalbumine (10 mg/ml) ont servi de témoins négatifs et positifs respectivement.

4. La présence de LPG sur des particules de zymosan n'altère pas la présentation antigénique par le macrophage

La liaison de LPG purifié sur des particules inertes a comme avantage de permettre l'observation d'effets qui ne peuvent être liés à aucune autre molécule de *Leishmania*. Des études antérieures ont permis de démontrer que la présence de LPG à la surface de particules de zymosan induit une accumulation de F-actine au phagosome (Holm *et al.*, 2001). Nous avons donc confirmé ces résultats par immunofluorescence en marquant l'actine de BMM, suite à l'internalisation de particules de zymosan recouvertes de LPG (Figure 14). L'observation au microscope confocal a révélé l'accumulation de F-actine autour de la majorité des phagosomes contenant du zymosan-LPG. En comparaison, les phagosomes contenant du zymosan sans LPG étaient décelables seulement par l'absence de signal dans le lumen de la vésicule. La membrane de ces phagosomes n'était que peu ou pas décelable. L'accumulation de F-actine autour des phagosomes suggère que les particules de zymosan étaient suffisamment recouvertes de LPG pour inhiber la maturation des phagosomes.

Puisque le LPG se fixe adéquatement aux particules de zymosan, nous avons utilisé ces particules de zymosan-LPG pour étudier l'impact du LPG sur la présentation antigénique. Des particules de zymosan-LPG ont donc été incubées en présence d'ovalbumine à 10 mg/ml, une concentration jugée supérieure par rapport à celle sécrétée par les promastigotes transfectés. Cette concentration en ovalbumine était également utilisée pour recouvrir les billes de latex. Encore une fois, ces expériences de présentation antigénique se déroulaient sur de courtes périodes d'incubation. Après deux heures de phagocytose, les BMM ont été incubés pour des temps de chasse variant de 2 h à 8 h. Dans ces conditions, le LPG n'a pas eu d'effet sur la présentation antigénique des BMM (Figure 15). Les particules recouvertes de LPG et d'ovalbumine entraînaient une présentation antigénique similaire à celle observée avec du zymosan non recouvert de LPG. Suite à l'internalisation de particules recouvertes ou non au LPG par les macrophages, le niveau d'activation des hybridomes DO.11.10 a atteint des valeurs

presque similaires à celles engendrées par le témoin positif. Après 8 h de temps de chasse, les niveaux d'incorporation de thymidine tritiée diminuaient mais la présence de LPG ne modifiait toujours pas les résultats. Ces résultats laissent entrevoir que dans ces conditions, le LPG n'a pas d'impact sur la présentation du peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ chez le macrophage. Il est connu que le LPG altère de nombreux mécanismes chez le macrophage. Si, dans nos conditions expérimentales, le LPG n'inhibe pas la présentation antigénique, il ne faut pas exclure la possibilité qu'une autre molécule provenant de *L. donovani* puisse le faire. Cette possibilité a donc ensuite été vérifiée.

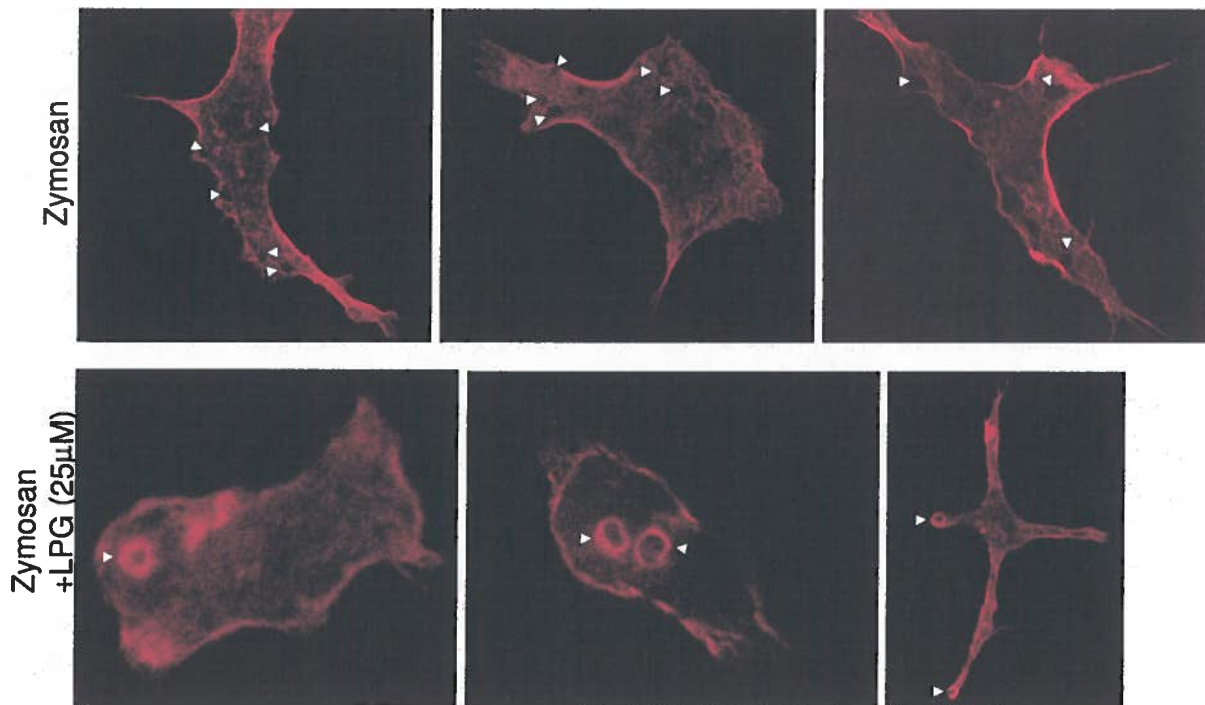


Figure 14. Immunomarquage de la F-actine chez des BMM ayant internalisé des particules de zymosan.

La F-actine est retenue au niveau périphagosomale chez les BMM lorsqu'il y a présence de LPG lié à une particule de zymosan dans le phagosome. Des macrophages péritonéaux ont été adhérents sur des lamelles avant d'être mis en contact pendant 120 minutes avec des particules de zymosan recouvertes de LPG à une concentration de 25 µM. De la phalloïdine 647 a été ajoutée aux cellules pour permettre de visualiser l'actine.

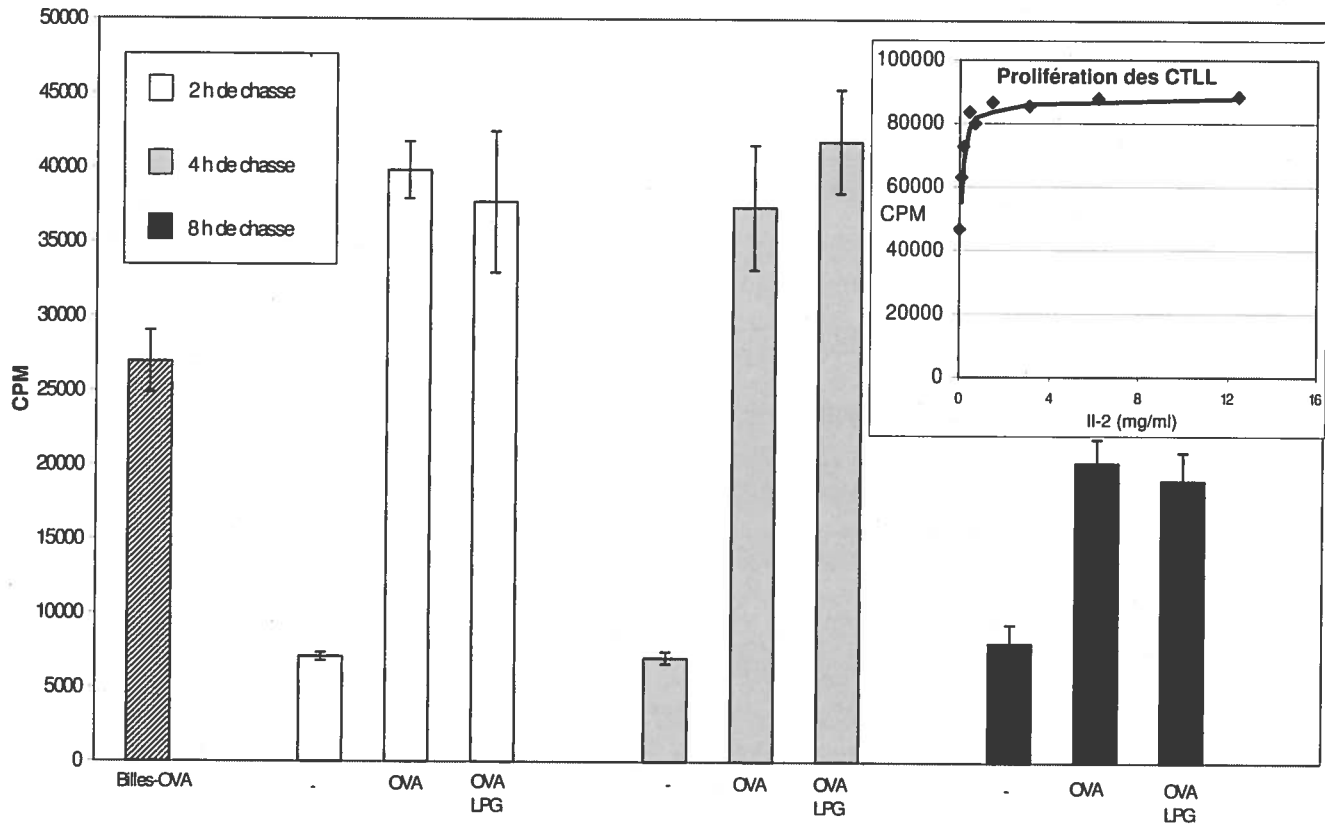


Figure 15. Niveaux d'incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTLL mises en contact avec des surnageants de cellules DO.11.10 incubées avec des macrophages ayant internalisé des particules de zymosan recouverte de LPG.

Le LPG lié aux particules de zymosan n'altère pas la présentation antigénique par les macrophages dérivés de la moelle osseuse. Des BMM activés pendant 18 h à l'IFN- γ (10 U/ml) ont été incubés en présence de particules de zymosan recouvertes d'ovalbumine (10 mg/ml) et de LPG (+LPG) pendant 120 min. Le ratio zymosan : macrophages était de 20 :1. Après 2 h (barres blanches), 4 h (barres grises) et 8 h (barres noires) de temps de chasse, la capacité des macrophages à activer les cellules DO.11.10 a été vérifiée. Des billes de latex recouvertes d'ovalbumine (10 mg/ml) ont servi de témoins positifs. Une courbe standard de la prolifération des CTLL en fonction de la concentration en IL-2 (dans l'encadré à droite) permettait de titrer la concentration en IL-2 pour chaque résultat.

5. Les promastigotes de type sauvage et *lpg2* KO recouverts d'ovalbumine n'altèrent pas la présentation antigénique par les macrophages

La trop faible quantité d'OVA_t sécrétée par les promastigotes transfectés pouvait possiblement expliquer l'absence d'activation des hybridomes de cellules T spécifiques à cet antigène. Donc, pour vérifier l'hypothèse qu'une molécule autre que le LPG puisse être à l'origine de l'altération de la présentation antigénique, il fallait trouver un moyen pour que les macrophages phagocytent des promastigotes possédant à leur surface une plus grande quantité de protéines ovalbumine que les transfectants précédemment testés. Pour ce faire, les promastigotes *L. donovani* ont été recouverts d'ovalbumine (10 mg/ml), tout comme les particules de zymosan décrites précédemment.

Avant de procéder aux expériences de présentation antigénique, nous nous sommes assurés que l'ovalbumine pouvait bien se fixer aux promastigotes de *L. donovani*. Après une incubation de trente minutes dans un milieu de culture contenant 10 mg/ml d'ovalbumine, les promastigotes ont subi de nombreux lavages et ont été lysés. En parallèle, des promastigotes transfectés de manière à sécréter OVA_t ont également été lysés sans toutefois être préalablement incubés avec de l'ovalbumine. Un immunobuvardage de type western a ensuite été réalisé sur les lysats en utilisant un anticorps polyclonal anti-ovalbumine pour détecter la protéine. L'immunobuvardage a démontré que la technique de liaison de l'ovalbumine fonctionnait bien. En effet, l'ovalbumine se liait aux promastigotes de type sauvage et *lpg2* KO avec la même avidité, comme en témoigne la révélation de la protéine à 45 kDa (Figure 16). Sans surprise, ces parasites recouverts d'ovalbumine engendraient une détection de la protéine beaucoup plus grande en comparaison avec les transfectants (puits 2, encadré), qui eux expriment une forme tronquée à 32 kDa. À titre indicatif, les trois derniers puits de droite avaient été chargés avec différentes quantités d'ovalbumine. Suite à ces vérifications, nous avons procédé à des expériences de présentation antigénique avec les promastigotes pré-incubés avec de l'ovalbumine (10 mg/ml).

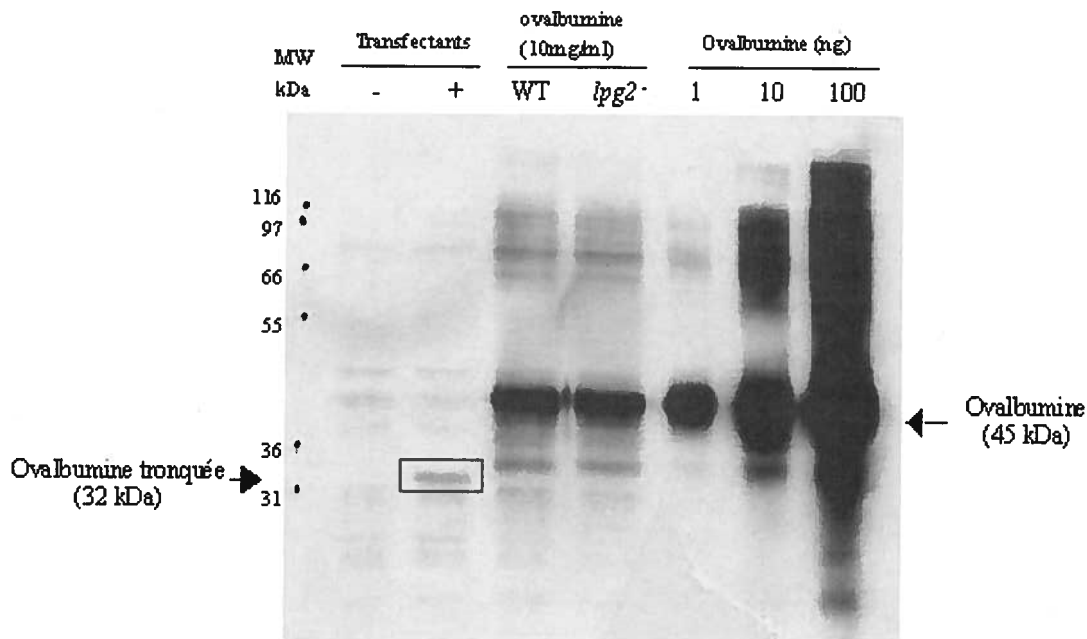


Figure 16. Détection de l'ovalbumine et de sa forme tronquée chez des promastigotes de type sauvage et mutant *lpg2* KO.

Des promastigotes transfectés avec *pKS NEO-PS-OVA* (puits 2, encadré) et des promastigotes incubés à température pièce pendant 30 minutes dans un milieu de culture contenant 10 mg/ml d'ovalbumine (puits 3 et 4) ont été lysés. Par immunobuvardage de type western, l'anticorps polyclonal anti-ovalbumine de lapin a révélé la présence de la protéine à 45 kDa principalement dans les lysats de promastigotes incubés avec l'ovalbumine. L'anticorps a aussi montré la présence de la protéine OVA_t exprimé par le transfectant à 32 kDa. À titre comparatif, des quantités de 1, 10 et 100 ng d'ovalbumine ont également été détectées (puits 5, 6 et 7). Le témoin négatif consistait en un lysat de promastigotes transfectés avec *pLEISH NEO*. L'échelle de masses moléculaires est indiquée à gauche.

Des BMM ont donc phagocyté des promastigotes recouverts d'ovalbumine pendant 2 h. Après trois lavages successifs, les cellules ont été incubées sur une période de 2 h à 8 h avant d'être fixées. Suite aux expériences d'activation d'hybridomes de

cellules T, on remarquait toujours une diminution d'activation lorsque les macrophages avaient phagocyté des promastigotes de type sauvage par rapport aux mutants *lpg2* KO (résultats non montrés). Selon ces résultats, le LPG aurait bel et bien un effet négatif sur la présentation antigénique. Toutefois, avant de valider cette affirmation, il fallait s'assurer que le nombre de parasites internalisés par les macrophages ne variait pas en fonction de la présence de LPG. Nous avons donc incubé des promastigotes avec des BMM pendant 2 h, avant de procéder à une coloration à l'orange acridine pour faire des comptes d'internalisation. L'observation au microscope a révélé que ces macrophages avaient une plus grande avidité pour les mutants *lpg2* KO que pour les promastigotes de type sauvage (Figure 17). Pour un ratio d'infection de 20:1, les macrophages phagocytèrent, en 120 minutes, en moyenne 4,8 promastigotes de type sauvage. En présence de parasites déficients en LPG, ce nombre augmentait d'une fois et demie à 7,6 promastigotes par macrophage infecté. Notons que les taux d'infection étaient de 97,3% en présence de *L. donovani* de type sauvage et de 99,3% avec le mutant *lpg2* KO.

Puisque les macrophages avaient une plus grande avidité pour les mutants LPG, nous avons ajusté les ratios d'infection (MOI) afin d'obtenir un niveau d'internalisation égal entre promastigotes de type sauvage et mutant en LPG. Avec des promastigotes *lpg2* KO, un ratio de 10:1 menait à une internalisation moyenne de 4,4 promastigotes/macrophage infecté et de 5,15 avec un ratio de 15:1. Nous avons donc conclu qu'un ratio d'infection de 13:1 avec des mutants *lpg2* KO menait à une internalisation similaire à celle que l'on retrouve en présence de promastigotes de type sauvage avec un ratio de 20:1.

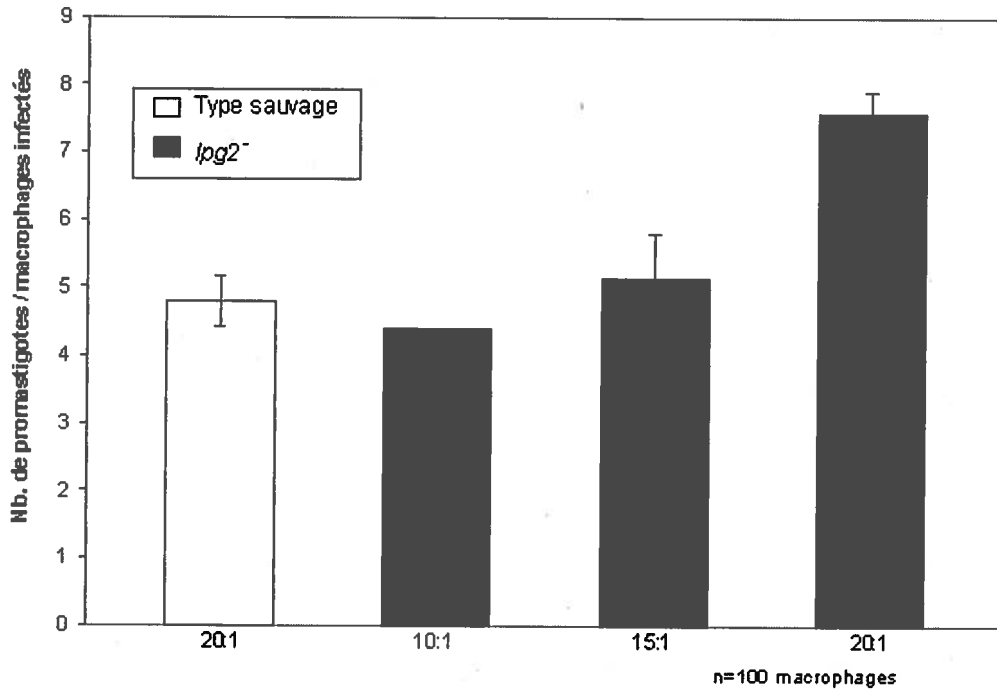


Figure 17. Les macrophages n'ont pas la même avidité de phagocytose pour les promastigotes de type sauvage que pour le mutant *lpg2* KO.

Des macrophages dérivés de la moelle osseuse ont phagocyté, pendant 120 minutes, des promastigotes de type sauvage opsonisés au sérum C5 déficient à un ratio parasite : macrophage de 20 :1 (barre blanche). D'autres macrophages ont phagocyté des promastigotes déficients en LPG avec des ratios de 10 :1, 15 :1 et 20 :1 selon les mêmes conditions. Les cellules ont été fixées puis colorées à l'orange acridine pour permettre le compte du nombre de promastigotes phagocytés par les macrophages.

Nous avons ensuite quantifié la présentation antigénique de macrophages infectés par des promastigotes recouverts d'ovalbumine (10 mg/ml), mais cette fois-ci en utilisant des ratios d'infections normalisés. Des macrophages dérivés de la moelle osseuse ont donc été incubés avec un ratio de 20 :1 avec des promastigotes de type sauvage et de

13 :1 avec des mutants déficients en LPG. Pour tous les temps de chasse testés, les promastigotes de type sauvage entraînaient une activation des hybridomes égale par rapport aux mutants *lpg2* KO (Figure 18). Par comparaison avec les billes de latex recouvertes d'ovalbumine (témoin positif), les macrophages infectés par les parasites présentaient l'antigène de manière égale ou supérieure. Ces résultats suggèrent que, pour les conditions testées, le LPG n'a pas d'effet sur la présentation antigénique des macrophages infectés.

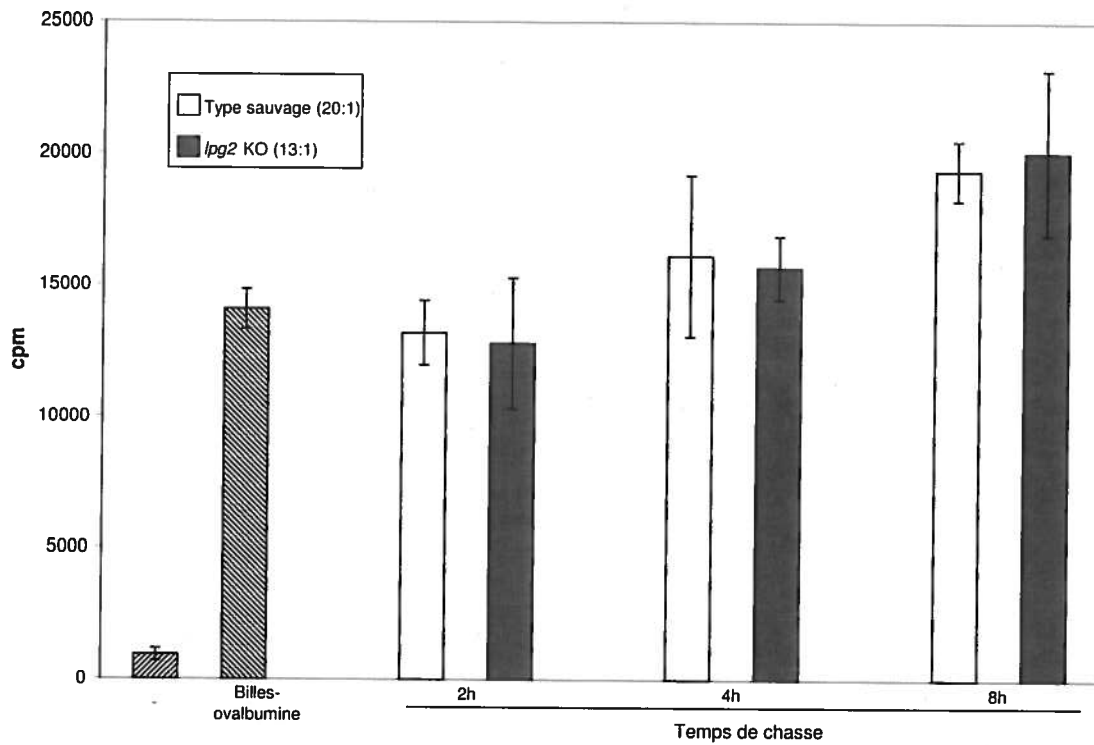


Figure 18. Niveaux d'incorporation de thymidine tritiée par des cellules CTLL mises en contact avec des surnageants de cellules DO.11.10 incubées avec des macrophages ayant internalisé des promastigotes pré-incubés avec de l'ovalbumine.

Des promastigotes de type sauvage et mutants *lpg2* KO ont été incubés pendant 30 minutes dans un milieu de culture contenant 10 mg/ml d'ovalbumine. Après de multiples lavages, ces parasites ont infecté, pendant 2 h, à un ratio de 20 : 1 pour les promastigotes de type sauvage (barres blanches) et de 13 : 1 pour les promastigotes déficients en LPG (barres noires), des macrophages dérivés de la moelle osseuse et activés à l'IFN- γ . Les macrophages infectés ont ensuite subi des temps de chasse de 2 h, 4 h et 8 h avant d'être mis en présence d'hybridomes de cellules T DO.11.10. Des macrophages ayant internalisé billes de latex recouvertes d'ovalbumine (10 mg/ml) ont servi de témoin positif (barre hachurée).

Chapitre 4

Discussion

Antérieurement, des équipes ont observé que *Leishmania* pouvait altérer la capacité des macrophages à présenter les antigènes via le CMH II. Selon l'espèce et le stade de différenciation de *Leishmania*, ces résultats peuvent toutefois grandement varier. De manière générale, il est accepté que les amastigotes de *L. donovani* inhibent la présentation antigénique par le macrophage (Courret *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 1986; Prina *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 1992). Toutefois, l'effet qu'ont les promastigotes de *L. donovani* sur la présentation antigénique est plus nébuleux, et peu nombreuses sont les équipes à s'y être intéressées.

Un premier groupe a démontré que dans les premières heures suivant l'infection par des promastigotes de *L. donovani*, les macrophages infectés activent des cellules T spécifiques à l'antigène LACK. Toutefois, cette capacité à présenter LACK diminue au bout de 24 h à 48 h. Les auteurs expliquent ce phénomène par le fait que les promastigotes ont le temps d'entamer la différenciation en amastigotes (Courret *et al.*, 1999; Prina *et al.*, 1996). Ce changement morphologique entraîne une réduction de la disponibilité en antigène, puisque les promastigotes métacycliques et les amastigotes résistent mieux à la destruction par le macrophage. Ainsi donc, l'utilisation de LACK comme antigène modèle n'indique pas fidèlement la capacité réelle des macrophages à apprêter et présenter l'antigène.

Plus récemment, une autre équipe a également démontré une altération de la présentation antigénique chez des macrophages infectés pendant 48 h avec des promastigotes de *L. donovani*. Pour arriver à de tels résultats, des macrophages P388D1 ont dû être lourdement infectés (12 promastigotes/macrophage) avant qu'on ne leur administre l'antigène λR_{12-26} de manière exogène (Chakraborty *et al.*, 2005). Cette étude ne démontre toutefois pas si les promastigotes altèrent la présentation antigénique chez les macrophages infectés dans les heures suivants la phagocytose. De plus, puisque l'antigène est administré de façon soluble, cette étude n'inclut pas le rôle du phagosome dans la présentation antigénique.

Bien que les promastigotes de *L. donovani* altèrent clairement la capacité des macrophages à présenter des antigènes dans le contexte du CMH II après 48 heures, bien peu de choses sont connues dans ce domaine en ce qui a trait à l'effet dans les moments suivant l'infection. Paradoxalement, c'est dans les moments suivant la phagocytose que le promastigote, grâce à son LPG, réussit à survivre dans le phagosome, en inhibant la maturation de celui-ci (Desjardins and Descoteaux, 1997). Or, le phagosome possède normalement toute la machinerie nécessaire pour digérer et présenter l'antigène via le CMH II (Ramachandra *et al.*, 1999; Ramachandra and Harding, 2000). Lors de sa maturation, le phagosome acquiert un pH de plus en plus acide. Cette acidité contribue directement à la destruction des microorganismes. De plus, un pH acide favorise la dégradation des protéines en peptides par les GILT, les AEP et les cathepsines (Manoury *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2000; Phan *et al.*, 2000). La dégradation du fragment Ii et le transfert du peptide antigénique dans la niche peptidique du CMH II par la molécule H-2M sont aussi des phénomènes qui se déroulent dans des compartiments acides (Ferrari *et al.*, 1997). Compte tenu du fait que le LPG inhibe la maturation du phagosome dans les instants suivant la phagocytose, nous avons donc vérifié l'impact de ce phénomène sur la présentation antigénique chez le macrophage.

Le LPG des promastigotes de *L. donovani* cause un ralentissement de la maturation du phagosome, et ce de manière localisée. En considérant le phagosome comme un organelle capable de présentation antigénique, nous avons voulu vérifier la capacité des phagosomes contenant des promastigotes de *L. donovani* à apprêter et présenter OVA₃₂₃₋₃₃₉. Comme prévu, après une phagocytose simultanée de billes-ovalbumine et de promastigotes et un court temps de chasse, les macrophages murins RAW 264.7 *CIITA* infectés activent les cellules DO.11.10 au même niveau que des macrophages non infectés. La majorité des macrophages internalisent les deux types de particules en même temps (résultats non montrés). Ceci indique que les macrophages infectés présentent OVA₃₂₃₋₃₃₉ malgré la présence de promastigotes dans ces CPA. Les phagosomes contenant une bille-ovalbumine ne sont donc possiblement pas affectés par la présence de phagosomes contenant des promastigotes dans la même cellule. Ce

résultat est donc fidèle au modèle de l'inhibition localisée de la maturation du phagosome par le LPG.

Pour étudier l'impact de l'altération de la maturation du phagosome sur la présentation antigénique, nous avons transfecté des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage et déficients en phosphoglycans avec le plasmide *pKS NEO-PS-OVA*. Ce plasmide code pour un segment de la protéine ovalbumine qui comporte l'épitope 323-339 (OVA₃₂₃₋₃₃₉) reconnu par le TCR des cellules T spécifiques. Le peptide signal placé en amont sert pour sa part à cibler la protéine vers le transport exocyttaire. Contrairement à l'antigène LACK, la forme tronquée de l'ovalbumine se retrouve dans le milieu extracellulaire, sans que le promastigote n'ait à être lysé par le macrophage. Ces transfectants permettent donc d'étudier la capacité du phagosome à apprêter et présenter l'antigène malgré la survie du promastigote.

Suite à la transfection, nous avons tout d'abord confirmé l'expression d'OVAt grâce au plasmide *pKS NEO-PS-OVA* en pratiquant des immunobuvardages de type western sur des lysats cellulaires de promastigotes avec un anticorps polyclonal anti-ovalbumine (résultats non montrés). Ces résultats indiquent que les promastigotes en phase *log* expriment plus OVAt que les promastigotes en phase stationnaire. Les promastigotes en phase *log* ont donc été utilisés pour la suite des analyses de détection d'OVAt. Suite à une incorporation de [³⁵S]Met par des promastigotes, l'immunoprécipitation d'OVAt (32 kDa) a démontré la présence de la protéine tronquée dans le milieu de culture ainsi que dans les lysats cellulaires. Au temps zéro, on ne détecte pas la protéine dans le milieu, ce à quoi nous nous attendions, puisqu'à ce moment les promastigotes venaient tout juste de subir de nombreux lavages pour enlever l'excès de [³⁵S]Met. Au même moment, l'immunoprécipitation révélait une très forte quantité d'OVAt au niveau intracellulaire. Avec le temps, les promastigotes sécrètent dans le milieu externe les protéines marquées au [³⁵S]Met, ce qui se traduit par une diminution de la détection au niveau intracellulaire. Toutefois, on n'observe pas de différence de détection importante entre 4 h et 18 h dans le milieu de culture. En comparant avec la diminution au niveau intracellulaire, on pourrait s'attendre à ce que

l'augmentation d'OVA_t dans le milieu soit plus importante. Ce fait peut être expliqué par la dégradation possible de la protéine dans le milieu, étant donné le temps d'incubation prolongé (18 h). Puisque toutes les expériences se sont déroulées *in vitro*, les promastigotes ont toujours été incubés en présence de néomycine pour favoriser la sélection de transfectants.

Après avoir vérifié la production d'OVA_t sécrétée par les promastigotes de type sauvage et mutant *lpg2* KO transfectés, nous avons utilisé ces transfectants comme particules à phagocyter par des macrophages. Ces promastigotes sécrétaient OVA_t à des niveaux détectables après deux heures d'incubation (résultats non montrés), ce qui faisait en sorte que de courts temps de phagocytose et de chasse pouvaient laisser le temps nécessaire aux promastigotes pour exprimer OVA_t. Avant d'infecter les macrophages, les promastigotes étaient toujours incubés dans un milieu de culture contenant du sérum déficient en C5 de souris BALB/C. Cette opsonisation par le complément favorise la phagocytose des promastigotes, sans pour autant causer la lyse initiée par le complément, étant donné l'absence du facteur C5.

Les expériences de présentation antigénique chez des macrophages infectés par des promastigotes exprimant OVA_t de type sauvage et déficients en phosphoglycans n'ont révélé, en aucun temps, la moindre activation d'hybridomes de cellules T spécifiques au peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉. Malgré des temps de chasse variant de 2 h à 8 h et l'utilisation de promastigotes en phase log et stationnaire, aucune combinaison n'a permis de détecter l'activation des cellules DO.11.10. Puisque les macrophages RAW 264.7 *CIITA* ne semblaient pas pouvoir activer les cellules DO.11.10 suite à l'infection, nous avons utilisé des lignées primaires. Des macrophages dérivés de la moelle osseuse et péritonéaux, activés pendant 18 h à l'IFN- γ , ont phagocyté des promastigotes transfectés de type sauvage et *lpg2* KO pendant 120 minutes. Après lavages, les macrophages ont ensuite été incubés à 37°C pendant une période supplémentaire de 2 h, 4 h ou 8 h avant d'être fixés et mis en présence de cellules DO.11.10. Une fois de plus, malgré les nombreuses conditions testées, les expériences de présentation n'ont pas révélé d'activation des cellules T. Étonnement, même la phagocytose de promastigotes

déficients en phosphoglycans et sécrétant OVA n'entraînait pas l'activation des cellules DO.11.10. Avant de conclure que le LPG n'a pas d'effet direct sur la capacité des macrophages à présenter adéquatement les antigènes, il ne faut pas négliger le fait que les promastigotes transfectés n'expriment peut-être pas suffisamment OVA. Les immunoprécipitations décrites précédemment démontrent bien que les promastigotes transfectés expriment OVA dans le milieu. Toutefois, les conditions d'incubation des promastigotes précédant la détection d'OVA maximisent la production de cette protéine tronquée. Suite à la phagocytose, le milieu intraphagosomal peut possiblement être modifié au point de nuire à la synthèse de protéines par les promastigotes. Il est aussi important de noter que le plasmide *pKS NEO-PS-OVA* avait à l'origine été construit pour être transfecté chez des promastigotes de *L. major*, par l'équipe du Dr. Sacks (Bertholet *et al.*, 2005). Dans cette étude, des promastigotes *L. major* sécrétant OVA entraînent une activation de cellules T CD8+ via le CMH I par des cellules dendritiques, mais pas par les macrophages. Dans ce contexte, les promastigotes expriment donc suffisamment OVA, à tout de moins dans les cellules dendritiques, pour entraîner une activation des cellules T spécifiques. Toutefois, il est difficile ici de comparer ces résultats avec les nôtres puisque les conditions étaient complètement différentes. Plusieurs raisons peuvent donc possiblement expliquer les différences entre les deux études. Premièrement, les différentes espèces de *Leishmania* possèdent des caractéristiques qui leur sont propres et l'expression protéinique est l'une d'entre elles. Les promastigotes de *L. major* expriment peut-être mieux OVA que *L. donovani*. En comparaison avec nos immunoprécipitations démontrant la sécrétion d'OVA avec *L. donovani*, celles de l'équipe de Sacks par *L. major* révèlent une production qui semble supérieure. De plus, dans l'étude de Bertholet *et al.* les CPAs sont incubées en présence de promastigotes de *L. major* pendant 24 heures, contrairement à 2 heures dans nos expériences. Un temps d'infection aussi long laisse possiblement le temps aux promastigotes *L. major* de produire une quantité supérieure de protéines. Finalement, cette équipe a utilisé dans ses expériences les cellules dendritiques comme CPA. Les promastigotes infectent beaucoup moins bien ce type cellulaire que les macrophages, mais les cellules dendritiques présentent les antigènes plus efficacement. Cette différence cruciale est possiblement la raison principale pour laquelle ce groupe a détecté une activation des cellules T CD 8+ par les

cellules dendritiques par rapport aux macrophages, qui eux en étaient incapables. Nos résultats sont donc similaires à ceux du groupe de Sacks en ce qui a trait à l'effet des promastigotes sur la présentation antigénique des macrophages.

Donc, pour détecter une activation des cellules DO.11.10 par les macrophages infectés, il aurait probablement fallu que les promastigotes transfectés expriment plus OVAt. Nous avons voulu contourner ce problème en utilisant des particules de zymosan auxquelles nous avons lié du LPG et de l'ovalbumine. Cette façon de faire permet de lier à des particules une quantité d'ovalbumine supérieure à celle qui était sécrétée par les promastigotes transfectés. Pour s'assurer de la liaison du LPG purifié sur les particules de zymosan, nous avons marqué la F-actine de macrophages péritonéaux ayant internalisé du zymosan-ovalbumine incubé avec du LPG. Le marquage de la F-actine est une façon de vérifier la présence de LPG puisque ce glycolipide provoque l'accumulation de f-actine au phagosome (Holm *et al.*, 2001). Comme attendu, l'observation au microscope confocale a révélé une accumulation de F-actine aux phagosomes contenant des particules de zymosan recouvertes de LPG, et ce après une phagocytose de deux heures. De plus, le fait de lier également de l'ovalbumine ne nuit pas à l'adhérence du LPG sur les particules de zymosan. Comme précédemment démontré, le LPG est une molécule essentielle à l'établissement de l'infection par les promastigotes, et la seule présence de cette molécule suffit à causer l'inhibition de la maturation du phagosome (Desjardins and Descoteaux, 1997). Le fait que le LPG puisse se lier à des particules de zymosan consiste donc en un outil très utile lorsque l'on veut en étudier les effets. Nous avons donc utilisé ces particules recouvertes d'ovalbumine et de LPG pour quantifier l'activation d'hybridomes DO.11.10 par les macrophages en fonction de la présence de LPG.

Avant de procéder à ces expériences, nous avons vérifié la concentration minimale d'ovalbumine à incuber avec les particules de zymosan nécessaire pour activer les hybridomes (résultats non montrés). Tout comme avec les billes de latex, une incubation de trente minutes dans un milieu de culture à 10 mg/ml en ovalbumine était suffisante. Nous avons ensuite mesuré l'activation des cellules DO.11.10 par des macrophages ayant phagocyté des particules de zymosan-ovalbumine recouvertes ou non

avec du LPG. Contrairement à la phagocytose de transfectants *pKS NEO-PS-OVA*, la phagocytose de particules de zymosan-ovalbumine-LPG entraînent l'activation des cellules DO.11.10. La présence de LPG n'a pas d'effet sur l'activation des hybridomes de cellules T, et ce à tous les temps de chasse testés. Ces résultats suggèrent que dans ces conditions, le LPG n'a pas d'effet sur la capacité des macrophages à activer les cellules T CD4⁺ spécifiques à OVA₃₂₃₋₃₃₉. Pour le confirmer, nous avons poursuivi l'étude en utilisant des promastigotes de type sauvage et mutants *lpg2* KO comme particules internalisées par les macrophages. Pour mimer l'effet d'une production accrue d'OVA par les promastigotes, nous avons incubé ceux-ci avec l'ovalbumine comme nous l'avions fait avec le zymosan. Comme le démontre l'analyse par immunobuvardage de type western, l'incubation de promastigotes avec l'ovalbumine (10 mg/ml) mène à une détection de la protéine dans les lysats cellulaires. Quantitativement, la lyse des promastigotes recouverts d'ovalbumine mène à une détection de l'ovalbumine largement supérieure par rapport aux promastigotes transfectés. De plus, la présence de LPG sur les promastigotes n'influence pas la liaison de l'ovalbumine, puisque les niveaux détectés étaient similaires chez les promastigotes de type sauvage et déficients en LPG.

Nous avons évalué la capacité des macrophages infectés par les promastigotes recouverts d'ovalbumine à activer les cellules DO.11.10. Pour ce faire, nous avons incubé des macrophages avec des promastigotes pendant 120 minutes avec des ratios de 20 : 1. Les expériences d'activation ont démontré que, dans ces conditions, les promastigotes de type sauvage entraînent une altération de la présentation antigénique par rapport aux mutants déficients en LPG (résultat non montré). Cette altération n'est pas totale, les niveaux d'activation demeurant toujours supérieurs aux témoins négatifs, et légèrement inférieurs à ceux engendrés par une infection avec des promastigotes *lpg2* KO. Puisque la présentation antigénique dépend de la disponibilité en antigène, nous devons vérifier les niveaux d'internalisation avant de conclure que le LPG avait un effet négatif sur la présentation antigénique. En effet, les comptes d'internalisation des promastigotes révèlent que les macrophages possèdent une avidité supérieure pour les promastigotes déficients en LPG. Le LPG forme un dense glycocalix autour du promastigote, et possiblement que son absence expose des ligands favorisant la

phagocytose. En normalisant les ratios d'infection de manière à observer des niveaux d'internalisation semblables, les promastigotes de type sauvage engendrent une activation des cellules DO.11.10 égales par rapport aux promastigotes déficients en LPG. Donc, tout comme les particules de zymosan, les promastigotes recouverts d'ovalbumine n'entraînent pas d'altération de la présentation antigénique par le macrophage. L'utilisation de promastigotes de type sauvage recouverts d'ovalbumine confirme le fait que le LPG n'a pas d'effet sur l'activation des cellules CD4⁺ dans ces conditions. De plus, puisque les promastigotes déficients en LPG entraînent des niveaux normaux d'activation de DO.11.10, nous ne sommes pas en mesure de croire qu'une molécule autre que le LPG pourrait interférer avec la présentation antigénique dans les moments suivants la phagocytose.

Bref, cette étude démontre que dans les heures suivant la phagocytose, les macrophages infectés par des promastigotes *L. donovani* activent les cellules T CD4⁺ spécifiques, malgré l'altération de la maturation du phagosome par le LPG. Ces travaux mettent en relief la complexité des processus impliqués dans la présentation antigénique. Tout d'abord, les expériences présentées démontrent l'importance de la disponibilité en antigènes pour l'activation efficace des cellules DO.11.10 par le macrophage. L'inefficacité des macrophages infectés par des promastigotes type sauvage ou mutant *lpg2* KO transfectés avec *pKS NEO-PS-OVA* à activer les hybridomes DO.11.10 était fort probablement due à une présence insuffisante d'OVAt.

L'incubation de particules de zymosan et de promastigotes avec de l'ovalbumine avait pour but d'augmenter la quantité d'antigène disponible pour la présentation antigénique. La phagocytose de ces particules a résulté en une activation des cellules T CD4⁺ spécifiques, malgré la présence de LPG. Peu de temps après la phagocytose, le phagosome acquiert normalement tout ce qui lui est nécessaire pour mener à la présentation d'antigène. La maturation se fait au travers d'interactions de type « kiss and run » avec les endosomes précoces, tardifs et les lysosomes (Desjardins *et al.*, 1997). Toutefois, le LPG inhibe temporairement la maturation du phagosome en bloquant sa capacité à fusionner avec les endosomes tardifs et les lysosomes. Nous nous attendions

donc à observer une altération de la présentation antigénique par les macrophages ayant phagocyté des particules recouvertes de LPG. Nos résultats démontrent plutôt que l'inhibition de la maturation du phagosome n'entraîne pas d'altération de la présentation antigénique. Ceci laisse présager que même si les antigènes ne peuvent pas se rendre aux lysosomes, il peut tout de même y avoir une présentation antigénique. Ces résultats sont inattendus puisque le transfert des antigènes aux lysosomes est important pour l'apprêtement et la présentation des antigènes (Delamarre *et al.*, 2005).

Nos résultats peuvent être expliqués de différentes façons. Premièrement, même si les échanges entre le phagosome contenant le promastigote et les endosomes tardifs et les lysosomes sont réduits à cause du LPG, il ne faut pas exclure la possibilité qu'il y ait quelques endosomes qui puissent tout de même interagir avec le phagosome. Lors de ces contacts, l'ovalbumine pourrait être transférée à des endosomes enrichis en enzymes et en CMH II (MIIC), ce qui mènerait à l'apprêtement et à la présentation antigénique de l'épitope. Cette hypothèse est d'autant plus plausible si les particules phagocytées possèdent une grande quantité d'antigènes à leur surface.

De plus, il se peut que la cause de l'activation des cellules T CD4⁺ réside avant même que la phagocytose soit complétée. Lors du contact initial des particules recouvertes d'ovalbumine avec le macrophage, la protéine exogène peut se détacher pour être internalisée sans impliquer la phagocytose. L'antigène se trouverait alors dans le macrophage, sans nécessairement être associé au phagosome contenant le LPG. Une fois internalisée, la protéine peut être apprêtée et présentée via le CMH II, malgré la présence de promastigotes dans le macrophage.

Comme le démontrent nos résultats, le ralentissement de la maturation du phagosome par le LPG de *L. donovani* n'altère pas l'activation des cellules T CD4⁺ spécifiques par le macrophage. Pour étudier l'effet localisé du LPG, nous devons procéder à des temps de phagocytose et de chasse relativement courts, puisque cette molécule a des effets localisés au phagosome dans les premières heures post-infection. Les précédentes études qui démontrent une altération de la présentation antigénique via le

CMH II par les promastigotes de *L. donovani*, pour leur part, se faisaient toujours en infectant des macrophages pendant 24 à 48 heures (Chakraborty *et al.*, 2005; Courret *et al.*, 1999; Prina *et al.*, 1996). Il existe donc un lien entre le temps d'infection des macrophages par les promastigotes de *L. donovani* et la capacité des macrophages à activer les cellules T CD4⁺ spécifiques. Ce phénomène peut être expliqué d'une part par la différenciation des promastigotes en amastigotes, qui eux inhibent la présentation antigénique. De plus, l'altération des radeaux lipidiques par *L. donovani* peut nuire à la présentation antigénique via le CMH II (Chakraborty *et al.*, 2005). Cet effet survient après 24 à 48 heures d'infection, et les auteurs démontrent clairement que l'intégrité des radeaux lipidiques est essentielle pour permettre aux macrophages d'activer les cellules T CD4⁺. Toutefois, cette étude ne met pas la lumière sur le ou les mécanismes utilisés par les promastigotes pour altérer l'intégrité des radeaux lipidiques. Le LPG altère les microdomaines lipidiques au phagosome (Dermine *et al.*, 2005). De plus, après 24 heures d'infection par des promastigotes *L. major*, le LPG des parasites est détecté à la membrane plasmique du macrophage (Handman, E. 1990). Il serait donc intéressant de vérifier si le LPG de *L. donovani* peut causer la désorganisation à la membrane plasmique du macrophage, et ainsi en altérer la capacité d'activer les cellules T CD4⁺ spécifiques.

Bref, l'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG n'empêche pas la présentation antigénique. Par des phénomènes encore inconnus, le macrophage réussit à exposer à sa surface des antigènes malgré la présence de promastigotes dans les phagosomes. Toutefois, cette présentation antigénique n'est que temporaire, puisque les amastigotes, pour leur part, inhibent la présentation d'antigènes (Courret *et al.*, 1999; Prina *et al.*, 1996). C'est ici que l'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG prend toute son importance, car elle permet la survie du promastigote dans le macrophage. Le LPG empêche aussi l'assemblage de la NADPH oxydase au niveau du phagosome, ce qui permet au parasite d'échapper à la destruction par les ROS (Lodge *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que les résultats présentés dans ce travail corroborent ceux obtenus par une autre équipe, qui elle a étudié la présentation antigénique dans le cadre d'infections causées par *M. bovis*. Comme les promastigotes de *L. donovani*, cette

bactérie entraîne l'inhibition de la maturation du phagosome pour favoriser sa réplication (Clemens and Horwitz, 1995). Comme pour le LPG chez *L. donovani*, la protéine PknG de *M. bovis* bloque la fusion du phagosome avec les lysosomes (Walburger *et al.*, 2004). En utilisant des bactéries déficientes en PknG, l'équipe de Claude Leclerc a montré que l'altération de la maturation du phagosome par *M. bovis* n'entraîne pas de défaut de présentation antigénique chez le macrophage (Majlessi *et al.*, 2007). Nos résultats et ceux précédemment mentionnés démontrent bien la complexité des interactions des vésicules intracellulaires menant à la présentation antigénique et les difficultés à bien les caractériser.

Conclusion

Les promastigotes de *L. donovani* réussissent à établir l'infection chez les mammifères en résistant à l'action microbicide des macrophages. Une fois phagocyté, le promastigote ralentit la maturation du phagosome de façon localisée. Ceci est possible grâce au LPG qui empêche entre autres l'acquisition d'enzymes hydrolytiques apportées par les endosomes tardifs et les lysosomes (Desjardins and Descoteaux, 1997; Dermine *et al.*, 2000). En évitant l'acidité et les enzymes microbicides, les promastigotes survivent suffisamment longtemps pour se différencier en leur forme amastigote, capable de résister au pH acide des phagolysosomes. La présence de LPG dans le phagosome entraîne une accumulation de F-actine autour du phagosome, ce qui l'empêcherait d'interagir avec les autres vésicules du réseau endocyttaire (Holm *et al.*, 2001). Or, il a aussi été démontré que *Leishmania* pouvait inhiber la présentation antigénique via le CMH II. Toutefois, les amastigotes entraînent une altération de la présentation antigénique beaucoup plus importante que les promastigotes (Courret *et al.*, 1999; Prina *et al.*, 1996). Puisque les phagosomes des macrophages acquièrent très rapidement toutes les molécules nécessaires pour présenter les antigènes sur le CMH II (Ramachandra *et al.*, 1999), nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG pouvait entraîner un défaut dans la capacité d'un macrophage à présenter les antigènes dans le contexte du CMH II.

Pour étudier cette hypothèse, nous avons procédé à des expériences de présentation antigénique en respectant le modèle d'inhibition localisée de la maturation du phagosome par le LPG. Pour ce faire, différentes particules exprimant ou étant recouvertes de la protéine ovalbumine ont été incubées en présence de macrophages murins. Tout d'abord, des promastigotes de type sauvage et *lpg2* KO ont été transfectés pour exprimer une forme tronquée de l'ovalbumine. Ces promastigotes n'ont toutefois pas mené à la détection de présentation antigénique, possiblement à cause d'une expression protéinique trop faible.

Pour pallier à l'expression trop faible d'ovalbumine tronquée par les promastigotes, des particules de zymosan ont été recouvertes de LPG et d'ovalbumine à différentes concentrations. La présence de LPG sur les zymosans a été confirmée par microscopie confocale en détectant l'accumulation de F-actine périphagosomale. La phagocytose de ces particules a mené à une présentation antigénique mais la présence de LPG n'a pas eu d'effet inhibiteur. Finalement, pour s'assurer que des molécules de *Leishmania* autres que le LPG puissent inhiber la présentation antigénique, nous avons recouvert des promastigotes d'ovalbumine. Cette technique permettait de faire adhérer des quantités plus importantes d'ovalbumine que celles exprimées par les transfectants. Avec ces promastigotes recouverts d'ovalbumine comme particules phagocytées, nous avons remarqué que la présence de LPG sur les promastigotes ne nuisait pas à la présentation antigénique.

Les résultats obtenus suggèrent que l'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG ne semble pas altérer la capacité des macrophages à présenter les antigènes via le CMH II. Le LPG de *L. donovani* pourrait toutefois avoir un rôle à jouer au niveau de la présentation antigénique, mais plutôt en altérant les radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques servent à concentrer les complexes CMH II-Ag à la surface des macrophages pour ainsi optimiser la présentation antigénique (Hiltbold *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2000). Toutefois, le LPG de *L. donovani* entraîne la désorganisation des radeaux lipidiques au phagosome (Dermine *et al.*, 2005). L'inhibition de la présentation antigénique causée par l'altération des radeaux lipidiques par les promastigotes de *L. donovani* (Chakraborty *et al.*, 2005) pourrait donc être causée par LPG. Des expériences futures pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.

Liste de références

- Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 593-623.
- Agarwal, A., Salem, P. and Robbins, K.C. (1993) Involvement of p72syk, a protein-tyrosine kinase, in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem.* **268**: 15900-15905.
- Alexander, J., Satoskar, A.R. and Russell, D.G. (1999) Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* **112 Pt 18**: 2993-3002.
- Alfonso, C. and Karlsson, L. (2000) Nonclassical MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol.* **18**: 113-142.
- Allen, L.A. and Aderem, A. (1995a) Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts. *Embo J.* **14**: 1109-1121.
- Allen, L.A. and Aderem, A. (1996a) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med.* **184**: 627-637.
- Allen, L.A. and Aderem, A. (1996b) Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol.* **8**: 36-40.
- Allen, L.H. and Aderem, A. (1995b) 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, H.A., Hiltbold, E.M. and Roche, P.A. (2000) Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol.* **1**: 156-162.
- 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.
- Araki, N., Johnson, M.T. and Swanson, J.A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol.* **135**: 1249-1260.
- Arunachalam, B., Phan, U.T., Geuze, H.J. and Cresswell, P. (2000) Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 745-750.
- Bacellar, O., Brodskyn, C., Guerreiro, J., Barral-Netto, M., Costa, C.H., Coffman, R.L., et al (1996) Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* **173**: 1515-1518.

- Bell, J.I., Denny, D.W., Jr. and McDevitt, H.O. (1985) Structure and polymorphism of murine and human class II major histocompatibility antigens. *Immunol Rev.* **84**: 51-71.
- Bikoff, E.K., Huang, L.Y., Episkopou, V., van Meerwijk, J., Germain, R.N. and Robertson, E.J. (1993) Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med.* **177**: 1699-1712.
- Blocker, A., Severin, F.F., Burkhardt, J.K., Bingham, J.B., Yu, H., Olivo, J.C., *et al* (1997) Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol.* **137**: 113-129.
- Bonnerot, C., Marks, M.S., Cosson, P., Robertson, E.J., Bikoff, E.K., Germain, R.N. and Bonifacino, J.S. (1994) Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *Embo J.* **13**: 934-944.
- Brocke, P., Armandola, E., Garbi, N. and Hammerling, G.J. (2003) Downmodulation of antigen presentation by H2-O in B cell lines and primary B lymphocytes. *Eur J Immunol.* **33**: 411-421.
- Brown, D.A. and London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* **275**: 17221-17224.
- Brown, E.J. (1991) Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol.* **3**: 76-82.
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* **364**: 33-39.
- Brown, W.M. and Dziegielewska, K.M. (1997) Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution. *Protein Sci.* **6**: 5-12.
- Burlak, C., Whitney, A.R., Mead, D.J., Hackstadt, T. and Deleo, F.R. (2006) Maturation of human neutrophil phagosomes includes incorporation of molecular chaperones and endoplasmic reticulum quality control machinery. *Mol Cell Proteomics.* **5**: 620-634.
- Busch, R. and Mellins, E.D. (1996) Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Curr Opin Immunol.* **8**: 51-58.
- Busch, R., Cloutier, I., Sekaly, R.P. and Hammerling, G.J. (1996) Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *Embo J.* **15**: 418-428.
- Caron, E. and Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science.* **282**: 1717-1721.

- Carroll, M.C. (1998) The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* **16**: 545-568.
- Carvalho, E.M., Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Barral-Netto, M., Badaro, R., Rocha, H. and Johnson, W.D., Jr. (1992) Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *J Infect Dis.* **165**: 535-540.
- Castellino, F. and Germain, R.N. (1995) Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity.* **2**: 73-88.
- Chakraborty, D., Banerjee, S., Sen, A., Banerjee, K.K., Das, P. and Roy, S. (2005) *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *J Immunol.* **175**: 3214-3224.
- Chang, K.P. and Dwyer, D.M. (1976) Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science.* **193**: 678-680.
- Clemens, D.L. and Horwitz, M.A. (1995) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med.* **181**: 257-270.
- Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Menard, R., Mort, J.S. and Cygler, M. (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *Embo J.* **15**: 5492-5503.
- 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.
- Cresswell, P. (1996) Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell.* **84**: 505-507.
- Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Peaper, D.R. and Wearsch, P.A. (2005) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev.* **207**: 145-157.
- Culley, F.J., Harris, R.A., Kaye, P.M., McAdam, K.P. and Raynes, J.G. (1996) C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J Immunol.* **156**: 4691-4696.
- de Chastellier, C. and Thilo, L. (1997) Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol.* **74**: 49-62.

- De Souza Leao, S., Lang, T., Prina, E., Hellio, R. and Antoine, J.C. (1995) Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci.* **108** (Pt 10): 3219-3231.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. and Trombetta, E.S. (2005) Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science.* **307**: 1630-1634.
- DeLeo, F.R., Allen, L.A., Apicella, M. and Nauseef, W.M. (1999) NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol.* **163**: 6732-6740.
- Denzin, L.K., Hammond, C. and Cresswell, P. (1996) HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J Exp Med.* **184**: 2153-2165.
- Dermine, J.F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. and Desjardins, M. (2000) *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* **2**: 115-126.
- Dermine, J.F., Goyette, G., Houde, M., Turco, S.J. and Desjardins, M. (2005) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol.* **7**: 1263-1270.
- Dermine, J.F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G. and Desjardins, M. (2001) Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem.* **276**: 18507-18512.
- Descoteaux, A. and Turco, S.J. (1999) Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta.* **1455**: 341-352.
- 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., Turco, S.J., Sacks, D.L. and Matlashewski, G. (1991) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol.* **146**: 2747-2753.
- Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol.* **5**: 183-186.
- Desjardins, M. and Descoteaux, A. (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med.* **185**: 2061-2068.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. and Griffiths, G. (1994a) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol.* **124**: 677-688.

- Desjardins, M., Nzala, N.N., Corsini, R. and Rondeau, C. (1997) Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci.* **110 (Pt 18)**: 2303-2314.
- Desjardins, M., Celis, J.E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G. and Huber, L.A. (1994b) Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem.* **269**: 32194-32200.
- Deussing, J., Roth, W., Saftig, P., Peters, C., Ploegh, H.L. and Villadangos, J.A. (1998) Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 4516-4521.
- Dinauer, M.C. and Orkin, S.H. (1992) Chronic granulomatous disease. *Annu Rev Med.* **43**: 117-124.
- Driessen, C., Bryant, R.A., Lennon-Dumenil, A.M., Villadangos, J.A., Bryant, P.W., Shi, G.P., *et al* (1999) Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol.* **147**: 775-790.
- Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H. and Desjardins, M. (2000) Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Sci.* **113 Pt 19**: 3531-3541.
- El-Safi, S., Kheir, M.M., Bucheton, B., Argiro, L., Abel, L., Dereure, J., *et al* (2006) Genes and environment in susceptibility to visceral leishmaniasis. *C R Biol.* **329**: 863-870.
- Engelhard, V.H. (1994) Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol.* **12**: 181-207.
- Ferrari, G., Knight, A.M., Watts, C. and Pieters, J. (1997) Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J Cell Biol.* **139**: 1433-1446.
- 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.
- Fratti, R.A., Backer, J.M., Gruenberg, J., Corvera, S. and Deretic, V. (2001) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol.* **154**: 631-644.
- Fruth, U., Solioz, N. and Louis, J.A. (1993) *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol.* **150**: 1857-1864.

- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., *et al* (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*. **110**: 119-131.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., *et al* (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol*. **152**: 165-180.
- Ghalib, H.W., Whittle, J.A., Kubin, M., Hashim, F.A., el-Hassan, A.M., Grabstein, K.H., *et al* (1995) IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *J Immunol*. **154**: 4623-4629.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. and Fleit, H.B. (1994) Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem*. **269**: 8878-8884.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. and Fleit, H.B. (1995) Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *Biochem J*. **305 (Pt 2)**: 669-674.
- Gordon, S. (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. **111**: 927-930.
- Gotthardt, D., Blancheteau, V., Bosserhoff, A., Ruppert, T., Delorenzi, M. and Soldati, T. (2006) Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics*. **5**: 2228-2243.
- Green, P.J., Feizi, T., Stoll, M.S., Thiel, S., Prescott, A. and McConville, M.J. (1994) Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol*. **66**: 319-328.
- Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs, J.B., Jr. and Nancy, C.A. (1990) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol*. **144**: 278-283.
- Greenberg, S. (1995) Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol*. **5**: 93-99.
- Gresham, H.D., McGarr, J.A., Shackelford, P.G. and Brown, E.J. (1988) Studies on the molecular mechanisms of human Fc receptor-mediated phagocytosis. Amplification of ingestion is dependent on the generation of reactive oxygen metabolites and is deficient in polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. **82**: 1192-1201.
- Groothuis, T.A. and Neefjes, J. (2005) The many roads to cross-presentation. *J Exp Med*. **202**: 1313-1318.
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Sjolín, C., Schreiber, A.D., Trimble, W.S. and Grinstein, S. (1998) v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 11691-11696.

- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. **279**: 509-514.
- Hall, A.B., Gakidis, M.A., Glogauer, M., Wilsbacher, J.L., Gao, S., Swat, W. and Brugge, J.S. (2006) Requirements for Vav Guanine Nucleotide Exchange Factors and Rho GTPases in FcγR- and Complement-Mediated Phagocytosis. *Immunity*. **24**: 305-316.
- Hall, F.C., Rabinowitz, J.D., Busch, R., Visconti, K.C., Belmares, M., Patil, N.S., *et al* (2002) Relationship between kinetic stability and immunogenicity of HLA-DR4/peptide complexes. *Eur J Immunol*. **32**: 662-670.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. and Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*. **141**: 929-942.
- Harding, C.V., Song, R., Griffin, J., France, J., Wick, M.J., Pfeifer, J.D. and Geuze, H.J. (1995) Processing of bacterial antigens for presentation to class I and II MHC-restricted T lymphocytes. *Infect Agents Dis*. **4**: 1-12.
- Henry, R.M., Hoppe, A.D., Joshi, N. and Swanson, J.A. (2004) The uniformity of phagosome maturation in macrophages. *J Cell Biol*. **164**: 185-194.
- Hiltbold, E.M. and Roche, P.A. (2002) Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr Opin Immunol*. **14**: 30-35.
- Hiltbold, E.M., Poloso, N.J. and Roche, P.A. (2003) MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol*. **170**: 1329-1338.
- Holevinsky, K.O. and Nelson, D.J. (1998) Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophys J*. **75**: 2577-2586.
- Holm, A., Tejle, K., Magnusson, K.E., Descoteaux, A. and Rasmusson, B. (2001) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKCα and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol*. **3**: 439-447.
- Holm, A., Tejle, K., Gunnarsson, T., Magnusson, K.E., Descoteaux, A. and Rasmusson, B. (2003) Role of protein kinase C α for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. **302**: 653-658.
- Howard, J.G., Hale, C. and Chan-Liew, W.L. (1980) Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol*. **2**: 303-314.
- Huber, M., Timms, E., Mak, T.W., Rollinghoff, M. and Lohoff, M. (1998) Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun*. **66**: 3968-3970.

- 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.
- Ilg, T., Stierhof, Y.D., Wiese, M., McConville, M.J. and Overath, P. (1994) Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*. *Parasitology.* **108 Suppl**: S63-71.
- Ilg, T., Craik, D., Currie, G., Multhaup, G. and Bacic, A. (1998) Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides. *J Biol Chem.* **273**: 13509-13523.
- Ilg, T., Stierhof, Y.D., Craik, D., Simpson, R., Handman, E. and Bacic, A. (1996) Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *J Biol Chem.* **271**: 21583-21596.
- Indik, Z.K., Park, J.G., Hunter, S. and Schreiber, A.D. (1995) The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood.* **86**: 4389-4399.
- Jahraus, A., Tjelle, T.E., Berg, T., Habermann, A., Storrie, B., Ullrich, O. and Griffiths, G. (1998) In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. *J Biol Chem.* **273**: 30379-30390.
- Janeway, C. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today.*
- Kaplan, G. (1977) Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol.* **6**: 797-807.
- Kaye, P.M., Rogers, N.J., Curry, A.J. and Scott, J.C. (1994) Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol.* **24**: 2850-2854.
- Kiener, P.A., Rankin, B.M., Burkhardt, A.L., Schieven, G.L., Gilliland, L.K., Rowley, R.B., *et al* (1993) Cross-linking of Fc gamma receptor I (Fc gamma RI) and receptor II (Fc gamma RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem.* **268**: 24442-24448.
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S. and Hammerling, G.J. (1996) Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *Embo J.* **15**: 6144-6154.
- Kwiatkowska, K. and Sobota, A. (1999) Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays.* **21**: 422-431.

- LaLonde, J.M., Zhao, B., Janson, C.A., D'Alessio, K.J., McQueney, M.S., Orsini, M.J., *et al* (1999) The crystal structure of human procathepsin K. *Biochemistry*. **38**: 862-869.
- Lang, T., Hellio, R., Kaye, P.M. and Antoine, J.C. (1994a) Leishmania donovani-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci*. **107** (Pt 8): 2137-2150.
- Lang, T., Ave, P., Huerre, M., Milon, G. and Antoine, J.C. (2000) Macrophage subsets harbouring Leishmania donovani in spleens of infected BALB/c mice: localization and characterization. *Cell Microbiol*. **2**: 415-430.
- Lang, T., de Chastellier, C., Frehel, C., Hellio, R., Metezeau, P., Leao Sde, S. and Antoine, J.C. (1994b) Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with Leishmania amazonensis. *J Cell Sci*. **107** (Pt 1): 69-82.
- Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M. and Moncada, S. (1990) Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. **144**: 4794-4797.
- Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W.P., Jackson, M.R., Peterson, P.A. and Karlsson, L. (1996) HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *Embo J*. **15**: 4817-4824.
- Locksley, R.M., Reiner, S.L., Hatam, F., Littman, D.R. and Killeen, N. (1993) Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science*. **261**: 1448-1451.
- Lodge, R. and Descoteaux, A. (2005a) Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. *Clin Immunol*. **114**: 256-265.
- Lodge, R. and Descoteaux, A. (2005b) Leishmania donovani promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42. *Cell Microbiol*. **7**: 1647-1658.
- Lodge, R., Diallo, T.O. and Descoteaux, A. (2006) Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol*. **8**: 1922-1931.
- Madden, D.R. (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol*. **13**: 587-622.
- Majlessi, L., Combaluzier, B., Albrecht, I., Garcia, J.E., Nouze, C., Pieters, J. and Leclerc, C. (2007) Inhibition of phagosome maturation by mycobacteria does not interfere with presentation of mycobacterial antigens by MHC molecules. *J Immunol*. **179**: 1825-1833.

- Manoury, B., Hewitt, E.W., Morrice, N., Dando, P.M., Barrett, A.J. and Watts, C. (1998) An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature*. **396**: 695-699.
- Manoury, B., Mazzeo, D., Li, D.N., Billson, J., Loak, K., Benaroch, P. and Watts, C. (2003) Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone. *Immunity*. **18**: 489-498.
- Manoury, B., Mazzeo, D., Fugger, L., Viner, N., Ponsford, M., Streeter, H., *et al* (2002) Destructive processing by asparagine endopeptidase limits presentation of a dominant T cell epitope in MBP. *Nat Immunol*. **3**: 169-174.
- Maric, M., Arunachalam, B., Phan, U.T., Dong, C., Garrett, W.S., Cannon, K.S., *et al* (2001) Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science*. **294**: 1361-1365.
- Masternak, K., Muhlethaler-Mottet, A., Villard, J., Zufferey, M., Steimle, V. and Reith, W. (2000) CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev*. **14**: 1156-1166.
- McConville, M.J. and Ferguson, M.A. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J*. **294** (Pt 2): 305-324.
- 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.
- McNeely, T.B. and Turco, S.J. (1990) Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol*. **144**: 2745-2750.
- 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.
- Meier, C.L., Svensson, M. and Kaye, P.M. (2003) *Leishmania*-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level. *J Immunol*. **171**: 6706-6713.
- Mellins, E., Smith, L., Arp, B., Cotner, T., Celis, E. and Pious, D. (1990) Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature*. **343**: 71-74.
- Mengeling, B.J., Beverley, S.M. and Turco, S.J. (1997) Designing glycoconjugate biosynthesis for an insidious intent: phosphoglycan assembly in *Leishmania* parasites. *Glycobiology*. **7**: 873-880.

- Miao, L., Stafford, A., Nir, S., Turco, S.J., Flanagan, T.D. and Epand, R.M. (1995) Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry*. **34**: 4676-4683.
- Mohamed, H.S., Ibrahim, M.E., Miller, E.N., White, J.K., Cordell, H.J., Howson, J.M., *et al* (2004) SLC11A1 (formerly NRAM1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *Eur J Hum Genet*. **12**: 66-74.
- 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.
- Mouritsen, S., Meldal, M., Werdelin, O., Hansen, A.S. and Buus, S. (1992) MHC molecules protect T cell epitopes against proteolytic destruction. *J Immunol*. **149**: 1987-1993.
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N. and Maxfield, F.R. (1997) Endocytosis. *Physiol Rev*. **77**: 759-803.
- Murphy KM, Heimberger AB and Loh DY. (1990) Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo. *Science*. **250**(4988):1720-3
- Murray, H.W., Carriero, S.M. and Donnelly, D.M. (1986) Presence of a macrophage-mediated suppressor cell mechanism during cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. **54**: 487-493.
- Nagarajan, S., Chesla, S., Cobern, L., Anderson, P., Zhu, C. and Selvaraj, P. (1995) Ligand binding and phagocytosis by CD16 (Fc gamma receptor III) isoforms. Phagocytic signaling by associated zeta and gamma subunits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. **270**: 25762-25770.
- Nakagawa, T.Y., Brissette, W.H., Lira, P.D., Griffiths, R.J., Petrushova, N., Stock, J., *et al* (1999) Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity*. **10**: 207-217.
- Newman, S.L., Mikus, L.K. and Tucci, M.A. (1991) Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol*. **146**: 967-974.
- Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O. and Ui, M. (1994) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem*. **269**: 22732-22737.
- Nishimura, Y. and Kato, K. (1987) Intracellular transport and processing of lysosomal cathepsin B. *Biochem Biophys Res Commun*. **148**: 254-259.

- Okada, M., Huston, C.D., Oue, M., Mann, B.J., Petri, W.A., Jr., Kita, K. and Nozaki, T. (2006) Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol.* **145**: 171-183.
- Phan, U.T., Arunachalam, B. and Cresswell, P. (2000) Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). Maturation, activity, and mechanism of action. *J Biol Chem.* **275**: 25907-25914.
- Pinet, V.M. and Long, E.O. (1998) Peptide loading onto recycling HLA-DR molecules occurs in early endosomes. *Eur J Immunol.* **28**: 799-804.
- Pitt, A., Mayorga, L.S., Stahl, P.D. and Schwartz, A.L. (1992) Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest.* **90**: 1978-1983.
- Poloso, N.J. and Roche, P.A. (2004) Association of MHC class II-peptide complexes with plasma membrane lipid microdomains. *Curr Opin Immunol.* **16**: 103-107.
- 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.
- Prina, E., Jouanne, C., de Souza Lao, S., Szabo, A., Guillet, J.G. and Antoine, J.C. (1993) Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol.* **151**: 2050-2061.
- 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.
- Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.J., Wei, W.Q., Ferguson, M.A., Brimacombe, J.S. and Liew, F.Y. (1996) Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 10984-10989.
- Puentes, S.M., Sacks, D.L., da Silva, R.P. and Joiner, K.A. (1988) Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med.* **167**: 887-902.
- Puentes, S.M., Dwyer, D.M., Bates, P.A. and Joiner, K.A. (1989) Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol.* **143**: 3743-3749.
- Puentes, S.M., 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.

- Qi, L. and Ostrand-Rosenberg, S. (2001) H2-O inhibits presentation of bacterial superantigens, but not endogenous self antigens. *J Immunol.* **167**: 1371-1378.
- Rabinovitch, M. (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* **5**: 85-87.
- Rabinowitz, S., Horstmann, H., Gordon, S. and Griffiths, G. (1992) Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J Cell Biol.* **116**: 95-112.
- Ravetch, J.V. (1994) Fc receptors: rubor redux. *Cell.* **78**: 553-560.
- Ravetch, J.V. (1997) Fc receptors. *Curr Opin Immunol.* **9**: 121-125.
- Ravetch, J.V. and Clynes, R.A. (1998) Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol.* **16**: 421-432.
- 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. and Mach, B. (2001) The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol.* **19**: 331-373.
- Rittig, M.G. and Bogdan, C. (2000) Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today.* **16**: 292-297.
- Rodrigues Junior, V., Da Silva, J.S. and Campos-Neto, A. (1992) Selective inability of spleen antigen presenting cells from Leishmania donovani infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasite Immunol.* **14**: 49-58.
- Rogers, L.D. and Foster, L.J. (2007) The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 18520-18525.
- Rosenberger, C.M., Brumell, J.H. and Finlay, B.B. (2000) Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol.* **10**: R823-825.
- Sacks, D.L. (1989) Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes. *Exp Parasitol.* **69**: 100-103.
- Sacks, D.L., Pimenta, P.F., McConville, M.J., Schneider, P. and Turco, S.J. (1995) Stage-specific binding of Leishmania donovani to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med.* **181**: 685-697.
- Saha, B., Das, G., Vohra, H., Ganguly, N.K. and Mishra, G.C. (1995) Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory

molecules on Leishmania-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol.* **25**: 2492-2498.

Santamaria, I., Velasco, G., Pendas, A.M., Paz, A. and Lopez-Otin, C. (1999) Molecular cloning and structural and functional characterization of human cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain. *J Biol Chem.* **274**: 13800-13809.

Sastry, K. and Ezekowitz, R.A. (1993) Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr Opin Immunol.* **5**: 59-66.

Schneider, P., Ferguson, M.A., McConville, M.J., Mehler, A., Homans, S.W. and Bordier, C. (1990) Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the Leishmania major promastigote surface protease. *J Biol Chem.* **265**: 16955-16964.

Schneider, S.C., Ohmen, J., Fosdick, L., Gladstone, B., Guo, J., Ametani, A., *et al* (2000) Cutting edge: introduction of an endopeptidase cleavage motif into a determinant flanking region of hen egg lysozyme results in enhanced T cell determinant display. *J Immunol.* **165**: 20-23.

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

Sedwick, C.E., Morgan, M.M., Jusino, L., Cannon, J.L., Miller, J. and Burkhardt, J.K. (1999) TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J Immunol.* **162**: 1367-1375.

Sengelov, H. (1995) Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev Immunol.* **15**: 107-131.

Sette, A., Adorini, L., Colon, S.M., Buus, S. and Grey, H.M. (1989) Capacity of intact proteins to bind to MHC class II molecules. *J Immunol.* **143**: 1265-1267.

Shatwell, K.P. and Segal, A.W. (1996) NADPH oxidase. *Int J Biochem Cell Biol.* **28**: 1191-1195.

Shi, G.P., Bryant, R.A., Riese, R., Verhelst, S., Driessen, C., Li, Z., *et al* (2000) Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med.* **191**: 1177-1186.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**: 569-572.

Somsel Rodman, J. and Wandinger-Ness, A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci.* **113 Pt 2**: 183-192.

- Spath, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (2003) The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 9536-9541.
- Stahl, P.a.E., RA (1998) The mannose receptor is a pattern recognition involved in host defence. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 50-55.
- Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*. **368**: 215-221.
- Stuart, L.M., Boulais, J., Charriere, G.M., Hennessy, E.J., Brunet, S., Jutras, I., *et al* (2007) A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature*. **445**: 95-101.
- Swanson, J.A., Johnson, M.T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M. and Araki, N. (1999) A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci.* **112 (Pt 3)**: 307-316.
- Tao, K., Stearns, N.A., Dong, J., Wu, Q.L. and Sahagian, G.G. (1994) The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys.* **311**: 19-27.
- Tjelle, T.E., Lovdal, T. and Berg, T. (2000) Phagosome dynamics and function. *Bioessays.* **22**: 255-263.
- Tolson, D.L., Turco, S.J. and Pearson, T.W. (1990) Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* **58**: 3500-3507.
- Touret, N., Paroutis, P. and Grinstein, S. (2005a) The nature of the phagosomal membrane: endoplasmic reticulum versus plasmalemma. *J Leukoc Biol.* **77**: 878-885.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., *et al* (2005b) Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell.* **123**: 157-170.
- Turco, S.J. and Descoteaux, A. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* **46**: 65-94.
- Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M. and Turk, V. (1996) Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* **384**: 211-214.
- Unanue, E.R. (2002) Perspective on antigen processing and presentation. *Immunol Rev.* **185**: 86-102.
- Unkeless, J.C., Shen, Z., Lin, C.W. and DeBeus, E. (1995) Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB. *Semin Immunol.* **7**: 37-44.

- Uzonna, J.E., Joyce, K.L. and Scott, P. (2004) Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med.* **199**: 1559-1566.
- Valensin, S., Paccani, S.R., Ulivieri, C., Mercati, D., Pacini, S., Patrussi, L., *et al* (2002) F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts. *Eur J Immunol.* **32**: 435-446.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J. and Grinstein, S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J.* **366**: 689-704.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., *et al* (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol.* **155**: 19-25.
- Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., *et al* (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* **304**: 1800-1804.
- Wang, B., Shi, G.P., Yao, P.M., Li, Z., Chapman, H.A. and Bromme, D. (1998) Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. *J Biol Chem.* **273**: 32000-32008.
- Watts, C. (1997) Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol.* **15**: 821-850.
- Watts, C. (2001) Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol.* **13**: 26-31.
- Watts, C. (2004) The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol.* **5**: 685-692.
- Weber, D.A., Evavold, B.D. and Jensen, P.E. (1996) Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science.* **274**: 618-620.
- Zheleznyak, A. and Brown, E.J. (1992) Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. *J Biol Chem.* **267**: 12042-12048.