

**Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier**

**Rôle des phosphatidylinositol 3-kinases dans la phagocytose des
promastigotes de *Leishmania donovani* par les macrophages RAW 264.7**

**Par
Silvana Jananji**

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

Jury d'évaluation

Président du jury

Mathieu Cellier, IAF

Examineur externe

**Danielle Malo
Département de génétique humaine
Université McGill**

Directeur de recherche

Albert Descoteaux, IAF

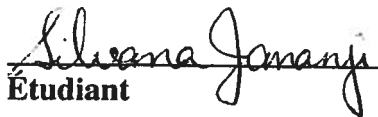
Sommaire

La phagocytose est un processus essentiel à la défense contre les microorganismes. Malheureusement, plusieurs pathogènes ont évolué afin d'exploiter ce mécanisme de défense de l'hôte. Tel est le cas pour le parasite protozoaire *Leishmania donovani*. Ce dernier a pour avantage d'inhiber la formation du phagolysosome pour se donner le temps de se transformer de sa forme promastigote, susceptible à l'environnement hostile du phagosome mature, en sa forme amastigote, résistante et ayant le potentiel de se multiplier à l'intérieur même de ce compartiment. Ce pouvoir d'inhiber la maturation du phagosome lui est transmis par la molécule de surface, le lipophosphoglycan (LPG). Celle-ci s'insère dans la membrane du phagosome et altère ses propriétés fusogéniques.

Lors de ce projet, nous avons cherché à comprendre les premières étapes de l'internalisation des promastigotes *L. donovani* opsonisés au complément par les macrophages RAW 264.7. Nous nous sommes donc attardé sur le rôle que pouvaient avoir la PI3-kinase ainsi que les radeaux lipidiques dans la phagocytose des promastigotes. Nous voulions par le fait même, déterminer si le LPG avait un effet au niveau de la phagocytose de *Leishmania* à des étapes précédant l'inhibition de la maturation du phagosome. Pour ce faire, toutes nos expériences ont été faites en parallèle avec des promastigotes déficients en LPG (*lpg2-KO*).

À l'aide de la wortmannin, un inhibiteur de la PI3-K en plus de la surexpression de la forme dominante-négative de la PI3-Kinase, $\Delta p85\alpha$, nous avons observé que l'inhibition de la kinase diminue significativement l'efficacité de phagocytose des promastigotes. De plus, nous avons observé une accumulation de la kinase au phagosome et ce, à l'aide de deux approches; la première en utilisant un anticorps spécifique à la sous-unité adaptatrice de la PI3-K de classe I, la seconde, plus indirecte, en surexprimant le domaine AKT-PH-GFP qui se lie aux $PI(3,4)P_2$ et $PI(3,4,5)P_3$ produits par la kinase. Grâce à la surexpression du domaine FYVE-GFP de la protéine EEA1, nous avons démontré que la PI3-kinase de classe III est aussi présente aux phagosomes contenant des promastigotes *lpg2-KO* ainsi que des promastigotes de type sauvage.

Enfin, la désorganisation des radeaux lipidiques par la déplétion en cholestérol des macrophages supprimait aussi l'internalisation des promastigotes ainsi que le recrutement de la PI3-Kinase au phagosome. Finalement, nous avons conclu que le LPG n'affectait pas le recrutement de la PI3-Kinase au phagosome, puisque celle-ci est nécessaire à la phagocytose de *Leishmania donovani*. De plus, l'intégrité des radeaux lipidiques est aussi importante pour l'internalisation des promastigotes autant en présence des lipophosphoglycans ou en leur absence.


Étudiant


Directeur de recherche

Liste des abréviations

ADF :	actin depolymerizing factor
ARF6 :	ADP-ribosylation factor
Bcr:	break cluster region
BH:	Bcr homology
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CR:	complement receptor
CRD:	carbohydrate recognition domains
CSF-1:	colony stimulating factor 1 receptor
DAG:	diacylglycérol
Domaine C2:	protein kinase C homology domain 2
EEA1:	Early Endosome Antigen 1
EpoR:	erythropoietin receptor
FGFR:	fibroblast growth factor receptor
FYVE:	Fab 1p, YOTB, Vac 1p and EEA1
Gab:	Grb2-associated binders
GAP:	GTPase activating protein
GFP :	green fluorescent protein
GIPLs:	glycosylinositolphospholipides
GM-CSF:	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
GPI:	glycosylphosphatidylinositol
GRB2:	growth factor receptor-bound protein 2
GSL:	glycosphingolipide
GTP:	guanine triphosphate
HA:	hemagglutinine
IRS1-4:	insulin receptor substrates
ITAM:	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
LAMP:	lysosomal-associated membrane protein
LPG:	lipophosphoglycan
LRR:	leucine-rich repeat

NADPH:	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate hydrogéné
NSF:	N-ethylmaleimide-sensitive factor
PAMP:	pathogen-associated molecular pattern
PDGFR:	platelet-derived growth factor
PH:	pleckstrin homology
PI :	phosphoinositides
PKC:	protéine kinase C
PLC:	phospholipase C
PMA:	phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR:	pattern-recognition receptor
PtdIns :	phosphatidylinositol
RE:	réticulum endoplasmique
SNARE:	soluble NSF attachment protein receptor
SOS:	son of sevenless
SPH:	sphingomyeline
TGN:	trans-Golgi network
TIR:	Toll/IL-1 receptor
TLR:	Toll-like receptor
VAMP:	vesicle-associated membrane protein
Vps34p :	vesicular protein-sorting protein
WASP:	Wiskott-Aldrich Syndrome protein

Table des matières

SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE	5
1. LE MACROPHAGE.....	6
2. LA PHAGOCYTOSE	6
2.1 <i>L'internalisation</i>	7
2.1.1 Les récepteurs.....	8
2.1.1.1 Les récepteurs Fc.....	9
2.1.1.2 Les récepteurs du complément	10
2.1.1.3 Les récepteurs de mannose.....	11
2.1.1.4 Les récepteurs Toll-like.....	12
2.1.2 Le modèle « Zipper Mechanism »	13
2.1.3 La polymérisation des filaments d'actine	13
2.1.3.1 L'actine-F.....	14
2.1.3.2 La gelsoline	14
2.1.3.3 Les ADF/cofilines	15
2.1.3.4 Les petites GTPases	16
2.1.3.5 Les PI(4,5)P ₂	16
2.1.4 L'extension des pseudopodes	17
2.1.4.1 La réorganisation des filaments d'actine	17
2.1.4.2 L'exocytose d'endomembranes.....	17
2.1.4.3 La dynamine II	19
2.1.4.4 Rôle du réticulum endoplasmique dans la phagocytose	20
2.1.5 La fusion des pseudopodes.....	21
2.1.6 La dépolymérisation des filaments d'actine	21
2.2 <i>La biogenèse du phagolysosome</i>	23
2.2.1 Les interactions du phagosome avec la voie endocytique.....	25
3. LES RADEAUX LIPIDIQUES ET LES CAVEOLAE	26
3.1 <i>La signalisation via les radeaux lipidiques</i>	27
3.2 <i>Le rôle des radeaux lipidiques dans la phagocytose de Leishmania donovani</i>	28
4. PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE ET LES PHOSPHOINOSITIDES	29

4.1 Les différentes classes de PI3K	30
4.1.1 La classe IA	30
4.1.2 La classe IB	33
4.1.3 La classe II	34
4.1.4 La classe III	34
4.2 L'activation des PI3-K de la classe IA	35
4.3 La signalisation via les PI3K.....	36
4.3.1 Les domaines d'homologie à la pleckstrine (PH)	36
4.3.2 Les domaines FYVE.....	37
4.3.3 Les domaines PX.....	37
4.4 Rôle des PI3 Kinases de classe I et III dans la phagocytose	37
4.4.1 Rôle de PI3K dans l'internalisation.....	37
4.4.2 Rôle de PI3K dans la maturation du phagosome	39
4.5 Les PI3-kinases et l'invasion par divers microorganismes	40
5. LES PARASITES LEISHMANIA	40
5.1 Les leishmanioses	41
5.1.1 La leishmaniose cutanée.....	41
5.1.2 La leishmaniose mucocutanée	42
5.1.3 La leishmaniose viscérale.....	42
5.2 Le cycle de vie de Leishmania	42
5.4 Les glycoconjugués de Leishmania donovani.....	43
5.4.1 Le lipophosphoglycan	43
5.4.2 Autres molécules apparentées au LPG	45
5.5 Mécanismes d'évasion de Leishmania aux systèmes de défense de l'hôte	45
5.5.1 Le système du complément	45
5.5.2 Inhibition de la biogénèse du phagolysosome	46
ARTICLE	49
DISCUSSION	76
CONCLUSION.....	86
REMERCIEMENTS	89
LISTE DES RÉFÉRENCES	90

Liste des figures

Figure A : Les différentes étapes menant à l'internalisation	8
Figure B. La dynamique des phosphoinositides PI(3,4)P2 et PI(3,4,5)P3 lors de la phagocytose.....	22
Figure C : Les étapes de la biogénèse du phagolysosome	24
Figure D: La famille des Phosphoinositide 3-kinases.....	30
Figure E : Les sous-unités adaptatrices de la PI3-K de classe IA	31
Figure F : Les sous-unités catalytiques de la PI3-Kinase	33
Figure G : Structures de la forme sauvage du lipophosphoglycan de <i>Leishmania donovani</i> et de la forme tronquée exprimée par le mutant <i>lpg2-KO</i>	43
Figure H : Schéma représentant le lipophosphoglycan et les autres molécules de surface apparentées au LPG exprimées par les promastigotes de type sauvage et <i>lpg2-KO</i>	44

Introduction

Leishmania donovani est un parasite protozoaire transmis sous sa forme promastigote par la mouche des sables (genres *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*). Ce parasite est l'agent de la leishmaniose viscérale, une maladie aussi connue sous le nom de Kala-azar et très répandue dans les pays tropicaux et sub-tropicaux (Descoteaux, A. et Turco, S.J.1999; Descoteaux, A. et Turco, S.J.2002; Sacks, D.L.2001). Les macrophages internalisent les promastigotes via les récepteurs du complément, CR1 et CR3, ainsi que via les récepteurs mannose (Alexander, J. *et al.*1999; Green, P.J. *et al.*1994; Herwaldt, B.L.1999; Mosser, D.M. et Rosenthal, L.A.1993). Une fois à l'intérieur de la cellule, les promastigotes inhibent la biogenèse du phagolysosome leur permettant ainsi de se différencier en leur forme amastigote (Desjardins, M. *et al.*1997) (Desjardins, M. et Descoteaux, A.1997; Scianimanico, S. *et al.*1999). La surface des promastigotes est recouverte d'approximativement 5 à 10 millions de copies de lipophosphoglycans (LPG), des polymères d'unités répétitives Gal β (1,4)Man α -PO₄ ancrés à la surface du parasite par une ancre GPI (Turco, S.J. et Descoteaux, A.1992). Cette molécule joue un rôle essentiel dans l'arrêt de la maturation du phagolysosome en s'insérant dans la membrane du phagosome et en agissant ainsi sur ses propriétés fusogéniques (Desjardins, M.*et al.*1997; Tolson, D.L. *et al.*1989).

Plusieurs groupes se concentrent majoritairement sur les événements menant à l'arrêt de la maturation du phagosome par *L. donovani*. Cependant, il en reste beaucoup à apprendre sur les toutes premières étapes de leur internalisation qui précèdent l'inhibition de la biogénèse du phagolysosome. De plus, sachant que les molécules de LPG s'insèrent dans la membrane des macrophages au site d'attachement des promastigotes dès le début de la phagocytose (Tolson, D.L.*et al.*1989), nous trouvons pertinent de vérifier si les molécules de LPG ont un effet à des étapes plus préliminaires. À cet effet, nos expériences ont été effectuées simultanément avec des promastigotes déficients en LPG (*lpg2-KO*), qui se sont avérés indispensables pour démontrer que le LPG est bien le principal responsable de l'inhibition de la biogénèse du phagolysosome (Descoteaux, A. *et al.*1995; McNeely, T.B. et Turco, S.J.1990).

La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) est responsable de la production des phosphoinositides PI(3)P, PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ qui sont d'importants seconds messagers dans divers processus cellulaires, incluant la phagocytose. Il existe plusieurs classes de PI3-K, dont la PI3-K de classe I qui joue un rôle au niveau de l'internalisation via les récepteurs Fc et les récepteurs du complément (Araki, N. *et al.*1996; Cox, D. *et al.*1999; Leverrier, Y. *et al.*2003; Marshall, J.G. *et al.*2001; Ninomiya, N. *et al.*1994; Vieira, O.V. *et al.*2001). Elle est constituée de la sous-unité adaptatrice p85 et de la sous-unité catalytique p110. À l'aide de la GTPase Ras-GTP (Rodriguez-Viciano, P. *et al.*1994), les hétérodimères phosphorylent les phosphoinositides à la position D3 hydroxy de l'anneau inositol pour générer les phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate et les phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (Vanhaesebroeck, B. *et al.*2001). Par contre, la PI3-K de classe III entre en scène au tout début de la maturation du phagosome en générant exclusivement des phosphatidylinositol (3)-phosphate. Celle-ci est composée de la sous-unité catalytique, un analogue de la Vps34p chez la levure et d'une sous-unité adaptatrice p150 chez l'humain (Stein, R.C.2001; Vanhaesebroeck, B. et Waterfield, M.D.1999).

Vue l'importance de cette protéine dans la phagocytose de plusieurs pathogènes, notre objectif premier était de déterminer si la PI3-K est impliquée dans l'internalisation des promastigotes de *L. donovani* par la lignée de macrophages murins RAW 264.7. À cette fin, nous avons déterminé l'effet de la wortmannin, un inhibiteur de la PI3-K, ainsi que l'effet d'un mutant dominant-négatif de la sous-unité p85 sur l'efficacité de phagocytose des promastigotes de type sauvage (WT) ou des promastigotes déficients en LPG (*LPG2-KO*) à leur surface. Dans les deux cas, nous avons observé une diminution significative de la phagocytose du WT et du mutant *lpg2-KO*, indiquant un rôle pour la PI 3-K dans l'internalisation des promastigotes de *L. donovani*. Par la suite, nous avons étudié le recrutement et l'activité des PI3-K de classe I et de classe III au phagosome, afin d'évaluer l'impact du LPG sur ce processus. La présence de la PI3-K de classe I fut déterminée par immunofluorescence, tandis que son activité fut déterminée indirectement en détectant la présence des PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ à l'aide de la protéine de fusion

AKT-PH-GFP. La présence des PI(3)P au phagosome fut observée grâce à la protéine de fusion FYVE-GFP. Nos résultats indiquent que le LPG n'affecte ni le recrutement au phagosome ni l'activité des PI3-K de classe I et III. L'inhibition de la maturation du phagosome par le LPG ne peut donc pas être expliquée par l'absence de la PI3-K au phagosome ou une inhibition de son activité.

Le second objectif de ce travail fut d'étudier le rôle des radeaux lipidiques dans la phagocytose des promastigotes. Ces microdomaines sont composés de cholestérol, de sphingolipides, de glycosphingolipides et de protéines ancrées par le GPI (Brown, D.A. et London, E.2000; Jacobson, K. et Dietrich, C.1999; Rosenberger, C.M. *et al.*2000; Zajchowski, L.D. et Robbins, S.M.2002). On les retrouve à la membrane plasmique, sur des endosomes par lesquels ils sont recyclés au Golgi et au réticulum endoplasmique où ils jouent un rôle dans le tri des protéines (Brown, D.A. et Rose, J.K.1992; Pagano, R.E. et Chen, C.S.1998; Pralle, A. *et al.*2000; Simons, K. et Ikonen, E.1997). Plusieurs molécules de signalisation s'associent aux radeaux lipidiques dont la PI3-Kinase (Liu, J. *et al.*1997; Liu, P. *et al.*1996). Tout récemment, Dermine *et al.* leurs ont découvert un rôle dans la maturation du phagosome lors de la phagocytose par les récepteurs Fc (Dermine, J.F. *et al.*2001). Ils ont également démontré que les promastigotes de *Leishmania donovani* empêchait le recrutement au phagosome de la flotilline-1, un des marqueurs spécifiques aux radeaux lipidiques (Dermine, J.F. *et al.*2001). Toutes ces raisons nous ont menés à déterminer si les radeaux lipidiques étaient impliqués au niveau de l'internalisation des promastigotes de *Leishmania donovani*. Comme première approche, nous avons déplété les macrophages en cholestérol en les traitant avec de la méthyl- β -cyclodextrine. Ceci nous a permis d'observer une inhibition de l'internalisation des promastigotes ainsi qu'une diminution dans la génération des PI(3,4)P₂ et de PI(3,4,5)P₃ à la membrane du phagosome. Ces expériences ont démontré que le maintien de l'intégrité des radeaux lipidiques est indispensable à l'internalisation des promastigotes de *L. donovani*, possiblement en raison de leur rôle dans le recrutement de la PI 3-K de classe I au phagosome ainsi que plusieurs autres protéines clés.

Revue de littérature

1. Le macrophage

Les macrophages sont des leucocytes mononucléaires issus de monocytes périphériques dans le sang. Ils exercent des fonctions immunitaires et non-immunitaires indispensables au bon fonctionnement de notre organisme. Afin d'acquérir ces fonctions et de pouvoir devenir des cellules ayant leur plein potentiel, les macrophages doivent entreprendre trois processus importants. Tout d'abord, les monoblastes, les toutes premières cellules identifiables appartenant à la lignée des monocytes, entreprennent des divisions cellulaires pour devenir des promonocytes. Ces derniers se diviseront une dernière fois avant de se transformer en monocytes. Cette étape est nommée la différenciation. Ensuite, le monocyte, incapable de se diviser, entreprend un processus de maturation lors duquel il migrera du système sanguin aux organes périphériques. Cette étape sera caractérisée par une augmentation de la taille de la cellule. Enfin, la dernière étape sera l'activation durant laquelle les macrophages vont acquérir des fonctions spécifiques selon les signaux captés et entreprendront des changements morphologiques et biochimiques. Leurs activités principales peuvent être divisées comme suit : ils ont un rôle immunorégulatoire comprenant le « processing » et la présentation antigénique; ils régulent la prolifération de plusieurs types cellulaires; ils sont des protecteurs de l'hôte par leurs activités antimicrobiennes, antivirales et antitumorales; ils sont importants dans la sécrétion de cytokines, de protéases, de molécules du complément et de facteurs de coagulation; finalement, ils catalysent la production d'intermédiaires d'oxygène toxiques. Mais par-dessus tout, le rôle primordial pour lequel le macrophage est reconnu est sa capacité à englober des particules plus grosses que la totalité de sa taille, c'est-à-dire, la phagocytose (Russell, S.W. et Gordon, S.1992).

2. La phagocytose

La phagocytose est un phénomène essentiel aux organismes puisqu'elle leur permet de se défendre contre de multiples agents infectieux. Elle favorise aussi la

régénération des tissus et elle mène à l'élimination de cellules apoptotiques lors du développement. Le processus de phagocytose peut être divisé en deux étapes principales : tout d'abord la formation du phagosome à la surface cellulaire et ensuite, la transformation de celui-ci en phagolysosome. C'est à l'intérieur même de ce compartiment que seront dégradés les microorganismes et les cellules apoptotiques qui s'y trouvent.

2.1 L'internalisation

L'internalisation de particules peut être subdivisée en 5 autres étapes (Figure A). Elle est initiée lors de l'interaction entre des récepteurs spécifiques et leurs ligands à la surface de la membrane plasmique du macrophage (I). Ceci mènera à la polymérisation de l'actine à la coupe phagocytaire. Ensuite, des pseudopodes vont se former autour de la particule. Leur extension sera réalisée par la réorganisation des filaments d'actine et par l'exocytose d'endomembranes à la membrane plasmique (II). Le RE participerait également à l'apport de membrane (III). Éventuellement, les pseudopodes vont se fusionner et s'ensuivra la dépolymérisation de l'actine-F autour du phagosome (IV). Une fois l'internalisation achevée (V), des séries de fusions et fissions auront lieu entre le phagosome et les endosomes/lysosomes, complétant ainsi la biogenèse du phagolysosome.

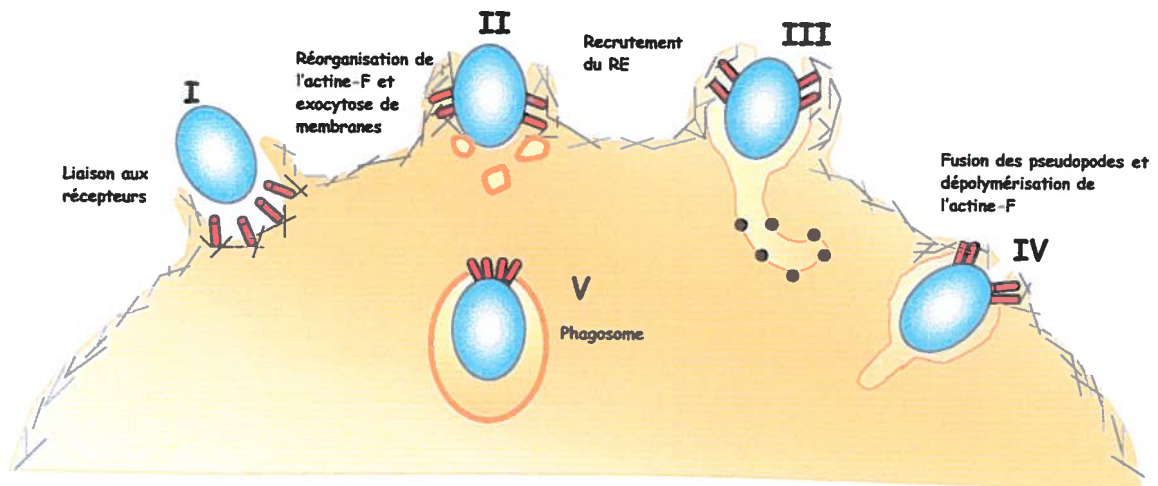


Figure A. Les différentes étapes menant à l'internalisation
(Adapté de Desjardins M., 2003)

2.1.1 Les récepteurs

La phagocytose est un phénomène complexe, entre autre dû aux multiples récepteurs qui vont reconnaître une multitude de ligands et vont interagir en synergie pour mener à leur l'internalisation (Aderem, A. et Underhill, D.M.1999). Les macrophages possèdent plusieurs récepteurs à leur surface pouvant reconnaître une grande variété de ligands. Il a été proposé par Janeway de qualifier les récepteurs de microorganismes «pattern-recognition receptors» (PRRs) et les motifs reconnus par ces récepteurs «pathogen-associated molecular patterns» (PAMPs) (Janeway, C.A., Jr.1992). Tout d'abord, ces motifs sont conservés à travers les multiples classes microbiennes car ils proviennent d'éléments essentiels à leur survie. De plus, les PAMPs sont absents chez les cellules hôtes car ils sont propres aux microorganismes pathogéniques et non pathogéniques. Ces motifs peuvent être des mannans présents sur la paroi cellulaire des levures, des peptides formylés chez les bactéries, des lipopolysaccharides et des acides lipoteichoic à la surface de bactéries Gram positives et Gram négatives. Les récepteurs Toll, les intégrines telles que CD11b/CD18 et les récepteurs scavenger sont des exemples de récepteurs PRR apte à reconnaître des PAMPs (Aderem, A. et Underhill, D.M.1999; Medzhitov, R.2001). Cependant, ce ne sont pas tous les récepteurs qui sont capables de

phagocytose. Certains vont simplement se lier à leur ligand pour aider à renforcer l'interaction de ceux-ci avec les récepteurs de phagocytose.

2.1.1.1 Les récepteurs Fc

Les immunoglobulines G (IgG) sont des opsonines dont le domaine conservé Fc est reconnu spécifiquement par les récepteurs Fc présents à la surface des phagocytes professionnels. Chez les humains, les récepteurs Fc impliqués dans la phagocytose par le macrophage sont FcγRI (Indik, Z.K. *et al.* 1994), FcγRIIA (Tuijnman, W.B. *et al.* 1992) et FcγRIII (Park, J.G. *et al.* 1993; Ravetch, J.V. 1997). Le récepteur FcγRIIA humain est une protéine simple chaîne pourvue d'un domaine de liaison Fc extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique qui contient deux motifs ITAM YXXL (Reth, M. 1989). Toutefois, les récepteurs FcγRI et les récepteurs FcγRIIIA ne possèdent que le domaine extracellulaire se liant au ligand et sont dépourvus d'une queue cytoplasmique comprenant les motifs ITAM. Afin qu'il y ait activation, ces derniers doivent interagir avec les sous-unités γ ou ζ dimérisées. Ces sous-unités sont munies des motifs ITAMs nécessaires à l'activation des récepteurs et à la signalisation qui s'en suivra. Il est à noter que les macrophages murins ne possèdent pas d'homologue de FcγRIIA (Ravetch, J.V. 1994). La liaison d'un ligand à son récepteur mène à l'agrégation des récepteurs et ensuite à un changement conformationnel du domaine cytoplasmique. Ceci mènera ensuite à la phosphorylation rapide de résidus tyrosine spécifiques à l'intérieur des motifs ITAMs par un membre de la famille Src (Ghazizadeh, S. et Fleit, H.B. 1994). Les phagocytes professionnels expriment 5 membres de la famille Src, soit Src, Hck, Fgr, Lyn et Fyn. Cependant, leur contribution relative dans la phagocytose via les récepteurs Fc reste à être élucidée. Subséquemment, une seconde protéine tyrosine kinase, p72 Syk, sera recrutée aux résidus tyrosine phosphorylés et deviendra phosphorylée et activée à son tour. Puis s'ensuivront plusieurs cascades de signalisation (Ghazizadeh, S. *et al.* 1995; Greenberg, S. 1995). Néanmoins, le rôle exact de Syk reste controversé. Certains groupes proposent que la protéine est requise lors de la formation des filaments d'actine à la coupe phagocytaire (Greenberg, S. *et al.* 1996).

D'autres ont démontré que la formation de l'actine-F au phagosome était intacte, mais que la phagocytose était réduite dans des cellules dépourvues de la protéine Syk (Crowley, M.T. *et al.* 1997). Les macrophages humains et murins expriment le récepteur FcγRIIB qui a pour fonction d'inhiber la phagocytose car il ne possède pas de motif ITAM. Ce récepteur est indispensable au maintien de l'équilibre nécessaire au bon fonctionnement de la phagocytose via les récepteurs Fc (Ravetch, J.V. 1994).

2.1.1.2 Les récepteurs du complément

La phagocytose via les récepteurs du complément est distincte morphologiquement de celle médiée par les récepteurs Fc. Bien que les deux requièrent une polymérisation des filaments d'actine, la phagocytose via les récepteurs du complément se caractérise par l'engloutissement des particules opsonisées dans le phagocyte. Ainsi, le besoin de membrane aux pseudopodes demeure minimal. De plus, elle ne mènera pas à une réponse inflammatoire ou de flambée oxydative telles que déclenchées lors d'une phagocytose via les récepteurs Fc (May, R.C. et Machesky, L.M. 2001; Wright, S.D. et Silverstein, S.C. 1983).

Chez les vertébrés, le système du complément est composé d'environ 30 protéines pouvant être activées simplement par une exposition à une macromolécule sur un agent pathogène ou par une liaison aux anticorps déjà présents à la surface d'un microorganisme. Cependant seulement quelques protéines du complément peuvent agir en tant qu'opsonines. C3b possède un groupement thioester capable de se lier de façon covalente à un groupe hydroxy ou amino présents sur une surface microbienne et est reconnu par le récepteur de complément 1 (CR1), aussi connu sous le nom de CD35. Lorsque C3b est modifié par les Facteurs H et I que l'on retrouve dans le sérum, il devient iC3b et est reconnu par les récepteurs du complément 3 et 4 (CR3 et CR4). Le CR3 est aussi connu sous le nom de Mac-1, CD11b/CD18 ou $\alpha_M\beta_2$ intégrine. Le CR4 est aussi connu sous le nom de Cd11c/CD18 ou $\alpha_X\beta_2$. Les récepteurs CR1, CR3 et CR4

sont tous les trois exprimés chez le macrophage et vont mener à la phagocytose lorsqu'ils sont activés par des cytokines (TNF- α), des chimiokines, le PMA (phorbol 12-myristate 13 acetate), des facteurs de croissance (GM-CSF) ou par l'attachement à la fibronectine (Aderem, A. et Underhill, D.M.1999; Brown, E.J.1991) Cette activation conduit non seulement au changement conformationnel des récepteurs mais aussi à leur agglutination qui est nécessaire à une meilleure liaison aux ligands.

Le CR1 est composé d'une simple chaîne transmembranaire possédant un large domaine extracellulaire «lectin-like». Son domaine cytosolique est beaucoup plus petit avec seulement 43 acides aminés. Son rôle majeur est la liaison de particules opsonisées plutôt que l'internalisation de celles-ci (Brown, E.J.1991).

En ce qui concerne CR3 et CR4, en se liant à iC3b, ils mènent à l'internalisation. Cependant, CR3 est capable d'internaliser des particules non opsonisées simplement en se liant à une molécule telle que la β -glucan (Thornton, B.P. *et al.*1996). Les récepteurs CR3 et CR4 sont des hétérodimères et leur chaîne α sont constitutivement phosphorylées, tandis que les chaînes β deviennent phosphorylées aux résidus serine suite à l'activation des récepteurs (Allen, L.A. et Aderem, A.1996). Ceci mènera à l'association rapide de la partie cytoplasmique des récepteurs à des protéines du cytosquelette telle que α -actinine (Pavalko, F.M. et LaRoche, S.M.1993).

2.1.1.3 Les récepteurs de mannose

Le récepteur mannose (MR) reconnaît les sucres mannose, fucose, N-acetylglucosamine et sucrose à la surface des pathogènes et mène à leur phagocytose par le macrophage (Apostolopoulos, V. et McKenzie, I.F.2001; Fraser, I.P. *et al.*1998). Ce récepteur joue un rôle considérable dans l'immunité innée car il est capable de reconnaître une grande variété de microorganismes. Le MR peut être divisé en cinq modules dont: une région amino-terminale riche en cystéine, une seconde région constituée de deux domaines fibronectine de type II, 8 domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD) «lectin-like» rangés en tandem, un domaine transmembranaire et

enfin, une queue cytoplasmique carboxy-terminale (Mullin, N.P. *et al.*1997; Taylor, M.E. *et al.*1992). Ce sont les domaines CRD 4, CRD 5 et CRD 7 qui possèdent les résidus essentiels à la liaison efficace des ligands saccharidiques (Mullin, N.P. *et al.*1994). L'expression de ce récepteur est régulée par plusieurs facteurs dont les récepteurs d'immunoglobulines, des cytokines ainsi que des produits pathogéniques. Le MR est également important au niveau de l'immunité acquise ayant un rôle à jouer dans la présentation antigénique. De plus, ce récepteur est autant capable de phagocytose que d'endocytose (Stahl, P.D. et Ezekowitz, R.A.1998; Tietze, C. *et al.*1982).

2.1.1.4 Les récepteurs Toll-like

Les récepteurs Toll-like (TLRs) ont été identifiés pour la première fois chez la Drosophile (Hashimoto, C. *et al.*1988). Ils font partie de la famille de protéines transmembranaires de type I. Ils sont caractérisés par un domaine extracellulaire riche en leucine LRR «leucine-rich repeat» et un domaine intracellulaire «Toll/IL-1 receptor» (TIR). Ce dernier est un domaine d'interaction protéine-protéine conservé (Vasselon, T. et Detmers, P.A.2002). Chez les mammifères, au moins 13 TLRs et une douzaine de leurs ligands ont été identifiés. Le récepteur TLR4 a été caractérisé le premier. Il se lie spécifiquement au LPS à l'aide d'autres protéines accessoires (Shimazu, R. *et al.*1999). TLR2 possède une grande variété de ligands dont des lipopeptides, des lipoprotéines, des acides lipoteichoic et beaucoup d'autres produits microbiens et ce, en formant des hétérodimères avec TLR1 et TLR6 (Ozinsky, A. *et al.*2000; Vasselon, T. *et al.*2002). TLR3 lie les ARN double-brin et joue donc un rôle important dans la reconnaissance d'infections virales (Alexopoulou, L. *et al.*2001). TLR5 reconnaît spécifiquement la flagelline des bactéries telles que *Salmonella* (Hayashi, F. *et al.*2001). Finalement, TLR9 demeure le plus énigmatique car il reconnaît le motif CpG non-méthylé de l'ADN bactérien (Hemmi, H. *et al.*2000). L'activation des TLRs mène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, à l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ainsi qu'à l'induction de iNOS pour finalement aboutir à la destruction des microorganismes (Sieling, P.A. et Modlin, R.L.2002; Vasselon, T. et Detmers,

P.A.2002). Plusieurs ligands des TLR, tels que LPS de *E. coli* et l'acide lipoteichoïque (LTA) de *S. aureus*, favorisent spécifiquement la phagocytose bactérienne. Doyle SE et ses collègues ont observé que les TLR transmettent des signaux via MyD88, IRAK4 et p38. Cette transduction de signaux a pour effet d'augmenter l'expression des récepteurs scavenger (SR) tels que SR-A, LOX-1 et MARCO qui mèneront à leur tour à une augmentation de la liaison et de la phagocytose de bactéries à gram-négatif et -positif par les macrophages et les monocytes (Doyle, S.E. *et al.* 2004).

2.1.2 Le modèle « Zipper Mechanism »

La phagocytose via les récepteurs Fc se déroule selon un modèle nommé «Zipper Mechanism». Ce modèle se définit par le fait qu'une ingestion d'une particule n'a pas nécessairement lieu lors de sa liaison au phagocyte. Pour être internalisée, la particule doit être recouverte d'IgG pour que les pseudopodes puissent avancer autour de celle-ci au fur et à mesure que les récepteurs se lient à leur ligand (Swanson, J.A. et Baer, S.C.1995).

2.1.3 La polymérisation des filaments d'actine

Lors de l'internalisation, l'extension de la membrane plasmique autour d'une particule, aurait lieu indépendamment de la polymérisation de l'actine. Le processus d'internalisation peut être divisé en quatre étapes distinctes : 1) des particules se lient à des récepteurs; 2) ceci déclenche une protubérance de membrane au site de liaison qui ne requiert pas la polymérisation de l'actine; 3) la formation de la coupe phagocytaire devient plus prononcée et c'est à ce moment que la formation des filaments d'actine entre en jeu; 4) finalement, les membranes fusionnent pour mener à une internalisation complète (Lowry, M.B. *et al.* 1998).

2.1.3.1 L'actine-F

L'actine est une protéine d'environ 43 kDa qui est présente dans la cellule sous deux formes : l'actine-G (globulaire) est la forme monomérique de l'actine pouvant s'assembler en filaments polarisés nommés actine-F. L'actine peut être liée aux nucléotides ATP ou ADP. Les monomères liés à l'ATP ont plus d'affinité pour les filaments et donc s'associent à ceux-ci. La quantité d'actine-G diminue à mesure que les filaments s'allongent jusqu'à ce qu'un équilibre s'établisse. C'est alors que l'hydrolyse de l'ATP s'active, ce qui confère une polarité aux filaments. C'est l'extrémité positive qui contient l'actine liée à l'ATP. Cette extrémité s'allonge rapidement à l'état dynamique stable. L'extrémité négative s'allonge lentement et se désassemble à l'état stable (Stenmark, H.É.2004).

La nucléation est la toute première étape de la polymérisation de l'actine qui se traduit par la formation de nouveaux filaments d'actine. Le complexe Arp2/3 composé de 7 sous-unités est le facteur principal menant à la nucléation (Machesky, L.M. et Gould, K.L.1999). Ce complexe multi-protéique est activé par la protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein) et son homologue N-WASP. (Machesky, L.M. et Insall, R.H.1999; Rohatgi, R. *et al.*1999). Il a été démontré que le complexe Arp2/3 est recruté aux phagosomes durant la phagocytose via les récepteurs Fc et CR3. De plus, WASP est recruté lors de l'internalisation via le récepteur Fc (May, R.C. et Machesky, L.M.2001). Dans d'autres systèmes, il a été démontré que la GTPase Cdc42 qui agit en synergie avec les PtdIns(4,5)P₂, active N-WASP et déclenche la polymérisation des filaments d'actine via le complexe Arp 2/3 (Rohatgi, R.*et al.*1999).

2.1.3.2 La gelsoline

La régulation de l'actine est nécessaire pour le bon fonctionnement de la phagocytose. Plusieurs protéines responsables de la dépolymérisation de l'actine ainsi

que du démantèlement du réseau de filaments d'actine sont recrutées au phagosome. La gelsoline peut scinder ou coiffer les filaments d'actine. Son activation est Ca^{2+} dépendante. Tout d'abord, elle se lie rapidement aux côtés des filaments. Ceci déclenche le sectionnement des filaments en deux en provoquant un changement conformationnel. Ensuite, cette dernière coiffe l'extrémité positive du filament d'actine pour empêcher une élongation. Lorsque la gelsoline est dissociée de l'actine soit par $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ou par Rac-GTP, ceci favorise la polymérisation rapide de l'actine (Hartwig, J.H.1995). La gelsoline pourrait avoir un rôle à jouer dans la phagocytose puisqu'elle se localise à la coupe phagocytaire (Yin, H.L. *et al.*1981).

2.1.3.3 Les ADF/cofilines

Les ADF/cofilines sont de petites protéines qui possèdent un seul domaine d'homologie ADF (actin depolymerizing factor). Les ADF et les cofilines sont des produits de gènes différents (Bamburg, J.R.1999; Bamburg, J.R. *et al.*1999). Elles interagissent directement avec les monomères d'actine ou avec les filaments, cependant, elles ont plus d'affinité pour l'actine-ADP. Les ADF/cofilines interviennent dans la rotation des filaments d'actine soit en dépolymérisant les filaments de l'extrémité négative (Carlier, M.F. *et al.*1997), soit en les scindant (Blanchoin, L. et Pollard, T.D.1999). L'activité des ADF/cofilines est régulée par le pH et la déphosphorylation (Bamburg, J.R.*et al.*1999). La phosphatase qui serait responsable de l'activation de l'ADF/cofiline est inconnue. Cependant, il a été démontré que les LIM-kinases 1 et 2 sont responsables de sa phosphorylation et agissent dans la voie de signalisation de Rac (Arber, S. *et al.*1998). Chez les neutrophiles, il a été démontré que la micro-injection d'anticorps dirigés contre la cofiline inhibe la phagocytose (Nagaishi, K. *et al.*1999).

La profiline aussi est une petite protéine qui lie les monomères d'actine mais possède une plus grande affinité pour l'actine-ATP, comparativement à l'ADF/cofiline. Elle favorise la polymérisation des filaments d'actine uniquement en présence d'extrémités positives (Pollard, T.D. *et al.*2000).

2.1.3.4 Les petites GTPases

Les « petites » GTPases monomériques ont un rôle important à jouer dans la phagocytose, plus spécifiquement les GTPases de la famille Rho et de la famille ARF. Ces GTPases sont importantes pour des phénomènes tels que la réorganisation du cytosquelette, l'activation transcriptionnelle et la production de superoxydes. Les GTPases Rac1 et Cdc42 sont liées à la phagocytose via les récepteurs Fc et ne sont pas requises pour l'internalisation via les récepteurs du complément (Caron, E. et Hall, A.1998). Par contre, lors de l'internalisation via le récepteur CR3, c'est la GTPase Rho qui est importante. De plus, Rho ne semble pas avoir sa place lors de la phagocytose via les récepteurs Fc (Caron, E. et Hall, A.1998). Le fait que différentes GTPases soient impliquées dans la phagocytose via des récepteurs différents pourrait expliquer la différence morphologique entre ces deux types d'internalisations (Allen, L.A. et Aderem, A.1996). Il a été démontré que la GTPase ARF6 (ADP-ribosylation factor) est essentielle à l'assemblage de l'actine-F ainsi qu'à l'internalisation de particules via le récepteur Fc (Zhang, Q. *et al.*1998). ARF6 se retrouve sous la voie de signalisation de Rac 1 chez le macrophage et interagirait avec POR-1, un effecteur de Rac (Zhang, Q. *et al.*1999). Une autre GTPase nommée Rap1 se retrouve en quantité abondante dans des phagosomes ayant été isolés de macrophages de mammifères. Cependant, il n'est pas encore clair si elle a un rôle à jouer lors de l'internalisation (Caron, E. *et al.*2000).

2.1.3.5 Les PI(4,5)P₂

Chez les macrophages au repos, les PI(4,5)P₂ sont distribués de façon homogène à la membrane plasmique (Tall, E.G. *et al.*2000). Peu de temps suivant le contact d'une particule avec des récepteurs, on observe à l'aide d'une sonde, une accumulation des PI(4,5)P₂ à la coupe phagocytaire (Figure B, tableau II). Cette accumulation coïncide avec les sites d'enrichissement en actine filamentueuse (Botelho, R.J. *et al.*2000). De plus, un traitement des cellules phagocytant des billes de latex avec de la phospholipase

C, qui transforme les PI(4,5)P₂ en diacylglycérol (DAG) ou avec de l'adénosine, inhibant l'activité de la PI4-K de type II, ainsi que l'utilisation d'anticorps dirigés contre les PI(4)P et les PI(4,5)P₂, a pour effet de diminuer l'assemblage de l'actine (Defacque, H. *et al.*2002). Ensemble, ces observations démontrent que la synthèse *de novo* des PtdIns (4,5)P₂ est requise pour une phagocytose optimale.

2.1.4 L'extension des pseudopodes

2.1.4.1 La réorganisation des filaments d'actine

Suite à leur polymérisation, les filaments d'actines sont réorganisés en structures plus complexes par enchevêtrements («actin-bundling») et par réactions entrecroisées («crosslinking»). Plusieurs protéines sont responsables des interactions croisées des filaments d'actine dont le complexe Arp 2/3 (Mullins, R.D. *et al.*1998) lors de la formation des lamellipodes (Svitkina, T.M. et Borisy, G.G.1999). L'implication de Arp 2/3 dans la réorganisation de l'actine-F lors de la phagocytose n'est pas encore claire. Néanmoins, une autre protéine, α -actinine, est recrutée aux phagosomes lors de l'internalisation via les récepteurs Fc et CR3 (Allen, L.A. et Aderem, A.1996). Cette protéine lie le cytosquelette aux intégrines (Otto, J.J.1994). Cependant, elle n'est pas essentielle à la phagocytose chez *Dictyostelium*. Par contre, une seconde protéine ayant un même rôle que α -actinine, ABP-120, est nécessaire à une phagocytose efficace chez *Dictyostelium* (Cox, D. *et al.*1996; Rivero, F. *et al.*1996).

2.1.4.2 L'exocytose d'endomembranes

Il a longtemps été considéré que la force générée par le cytosquelette et la polymérisation des filaments d'actine à elles seules pouvait engendrer l'extension des pseudopodes. Le modèle « Zipper Mechanism » selon lequel la membrane plasmique

s'enrobe autour de la particule ingérée, prédit que la surface membranaire du phagocyte devrait diminuer considérablement. Cependant, il est loin d'être ce qui se produit puisqu'un macrophage est capable d'internaliser l'équivalent de 100% de sa surface sans aucune diminution de celle-ci. Une augmentation de la surface membranaire a été détectée à l'aide de mesures électrophysiologiques de la capacitance membranaire. Cette même observation a été faite avec le marqueur FMI-43 qui fluoresce lorsqu'il est intercalé dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Lorsque les cellules phagocytent, une augmentation de la fluorescence de 35% a été mesurée par cytométrie en flux, la fluorescence représentant la surface membranaire (Booth, J.W. *et al.* 2001; Hackam, D.J. *et al.* 1998). Or, la membrane plasmique ne peut à elle seule, contribuer à la formation du phagosome.

Ces études ont mené vers l'hypothèse qu'il existe un mécanisme d'exocytose endomembranaire essentiel à l'extension des pseudopodes. Ces membranes proviendraient d'endosomes de recyclage. Des études récentes ont permis de démontrer que les protéines SNAREs (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor) seraient impliquées dans cette exocytose. Les SNAREs sont au centre de la fusion de membranaire. La formation de complexes entre les v-SNAREs que l'on retrouve sur les vésicules et les t-SNAREs présents sur les membranes cibles permettraient cette fusion. Des toxines telles que le tetanus ou botulinum qui clivent certains v-SNAREs tels que VAMP2 et VAMP3, diminuent l'efficacité de phagocytose (Hackam, D.J. *et al.* 1998). De plus, la localisation de VAMP3-GFP au phagosome a été observée (Bajno, L. *et al.* 2000). Plusieurs observations supportent l'idée que ce processus d'exocytose serait localisé au phagosome au lieu de se dérouler dans plusieurs directions à la fois dans la cellule. Une étude par microscopie électronique a révélé que des vésicules s'accumulaient dans la région directement au dessous du site de liaison de la particule, lorsque la phagocytose était bloquée par des inhibiteurs de la phospholipase A2 (Lennartz, M.R. *et al.* 1997). Aussi, des récepteurs de transferrin s'accumulent au phagosome natif, ce qui concorderait avec l'exocytose d'endosomes de recyclage (Cox, D. *et al.* 2000).

2.1.4.3 La dynamine II

Il a été récemment découvert que la dynamine II aurait également un rôle à jouer dans la phagocytose via les récepteurs Fc. Cette protéine appartient à une famille de GTPases impliquées dans la fission des vésicules endocytaires avec la membrane plasmique. Ces protéines sont également impliquées dans le trafic membranaire au TGN (trans-Golgi network). Elles se localisent aux phagosomes en formation et lorsqu'elles sont inhibées, l'internalisation est arrêtée au niveau de l'extension des pseudopodes (Gold, E.S. *et al.*1999). Cependant, le rôle exact de la dynamine II reste à être éclairci. Elle pourrait favoriser le recrutement de membrane au phagosome ou agir directement avec le réseau d'actine, puisqu'elle interagit directement avec la profiline. Elle peut être responsable de la fission du phagosome avec la membrane plasmique puisqu'elle en est responsable lors de l'endocytose. À l'aide d'études électrophysiologiques, une équipe de chercheurs a démontré que la dynamine II est responsable de l'exocytose membranaire. De plus, on la retrouve à l'extrémité des pseudopodes en extension. Une inhibition de l'exocytose membranaire a été démontrée lors de l'utilisation d'antagonistes de la dynamine (Di, A. *et al.*2003). Amphiphysin II_m est également enrichie aux sites de fermeture du phagosome et régulerait l'extension de membrane autour de la particule sur le point d'être internalisée (David, C. *et al.*1996; Gold, E.S.*et al.*1999; Morrissette, N.S. *et al.*1999). Il est connu que la dynamine II est recrutée aux endosomes par son interaction avec l'amphiphysin via le domaine SH3 (Src homology domain) (David, C.*et al.*1996).

D'autres facteurs seraient impliqués dans l'exocytose de membrane tels que PI3-Kinase (Cox, D.*et al.*1999), Rab11 (Cox, D.*et al.*2000) et ARF6 (Booth, J.W.*et al.*2001; D'Souza-Schorey, C. *et al.*1998).

2.1.4.4 Rôle du réticulum endoplasmique dans la phagocytose

Le réticulum endoplasmique participerait aussi à l'apport de membrane nécessaire à l'extension des pseudopodes. Lors d'une analyse protéomique de phagosomes contenant des billes de latex et isolés par gradients de sucrose, Desjardins et son groupe ont détecté la présence de protéines du réticulum endoplasmique (RE) telles que la calnexine et la calreticuline (Garin, J. *et al.*2001). Afin d'éliminer toutes possibilités que ces protéines soient des contaminants, plusieurs autres analyses biologiques dont la microscopie électronique, ont été utilisées pour supporter la découverte que le RE est bien recruté à la membrane plasmique et se fusionne à la coupe phagocytaire (Gagnon, E. *et al.*2002). L'implication du RE dans la phagocytose a été vérifiée non seulement avec des billes de latex mais aussi avec des érythrocytes opsonisés aux IgG, avec la bactérie *Salmonella typhimurium* ainsi qu'avec la forme promastigote du parasite *Leishmania donovani* (Gagnon, E.*et al.*2002). Cependant, lors de la phagocytose de *Leishmania* par les neutrophiles, le RE ne semble pas être recruté à la membrane plasmique (Gagnon, E.*et al.*2002). Ce qui en a été conclu est que le RE fournit l'apport membranaire nécessaire à l'internalisation complète chez les macrophages. Néanmoins, d'autres types cellulaires utiliseraient d'autres mécanismes que le RE pour combler leur besoin membranaire. Ces observations restent toutefois controversées puisque jusqu'à ce jour, des résultats confirmant la présence du RE au phagosome ou la contredisant n'ont pas encore été publiés par des groupes de recherche indépendants. Il est certain que d'autres expérimentations sont requises afin de pouvoir s'avancer avec plus de certitude sur le sujet. Néanmoins, il est important de noter que le phagosome est un organelle hétérogène et que sa composition peut varier quelque peu d'un système à l'autre (Desjardins, M.2003).

2.1.5 La fusion des pseudopodes

Une force contractile est également requise pour la fermeture du phagosome. La superfamille des myosines, des protéines motrices, aurait donc un rôle à jouer dans ce processus.

Il a été démontré que la myosine I est recrutée aux phagosomes lorsque des cellules ingèrent des particules de zymosan (Allen, L.A. et Aderem, A.1995). Par contre, c'est la myosine IIA qui serait impliquée dans la phagocytose via les récepteurs Fc et les récepteurs du complément. Lorsqu'elles sont inhibées, l'internalisation de particules opsonisées s'en trouve diminuée de façon significative (Olazabal, I.M. *et al.*2002). Lors de la phagocytose via les récepteurs Fc, la myosine IIA est accompagnée des myosines IC, V et IXb, bien que ce soit la myosine IC qui se localise à l'extrémité des pseudopodes en extension (Mansfield, P.J. *et al.*2000; Swanson, J.A. *et al.*1999).

2.1.6 La dépolymérisation des filaments d'actine

Peu de temps précédant la fusion complète des pseudopodes, il est possible d'observer la disparition des PI(4,5)P₂ à la base de la coupe phagocytaire. Cet événement coïncide avec la dépolymérisation de l'actine filamentueuse du phagosome, ce qui démontre une relation possible entre la présence des PtdIns(4,5)P₂ et l'actine-F (Botelho, R.J. *et al.*2000). Trois types de réactions peuvent être envisagées afin d'expliquer la disparition de ces phosphoinositides : la déphosphorylation, l'hydrolyse par des phospholipases et la phosphorylation. À ce jour, aucune phosphatase n'a été identifiée pour les PI(4,5)P₂. Cependant, la phospholipase C (PLC) est reconnue pour générer le DAG à la coupe phagocytaire. L'apparition du DAG coïncide avec la disparition des PI(4,5)P₂, ce qui suggérerait qu'il y a un lien causal entre la PLC et la disparition des PI(4,5)P₂ (Figure B, tableau III). Malgré cela, on ne sait exactement si c'est la perte de PI(4,5)P₂ ou l'apparition du DAG qui provoquerait la dépolymérisation

de l'actine-F (Botelho, R.J.*et al.*2000). Bien qu'une fraction des $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ soient transformés en DAG, le restant est phosphorylé par la PI3-K pour être recyclés en $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ (Figure B, tableau III) (Brumell, J.H. et Grinstein, S.2003).

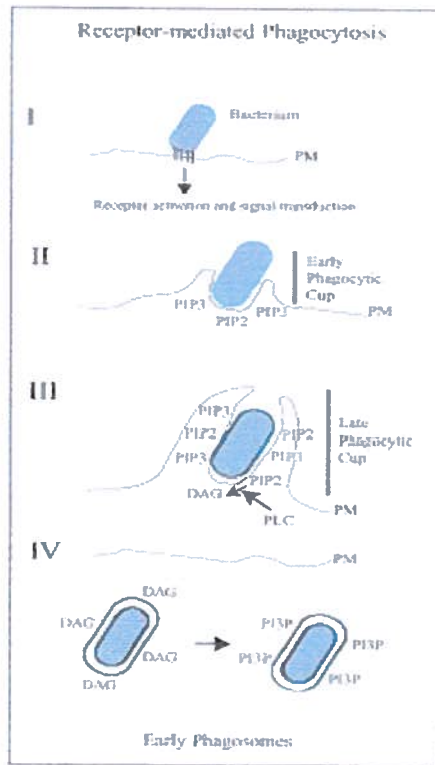


Figure B. La dynamique des phosphoinositides $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ et $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ lors de la phagocytose
(Brumell, J.H. et Grinstein, S.2003)

2.2 La biogenèse du phagolysosome

Immédiatement suivant sa formation complète et son détachement de la membrane, le phagosome ressemble principalement à la membrane plasmique et contient majoritairement des fluides provenant de l'environnement extracellulaire. Le phagosome naissant n'offre donc pas un environnement propice à la dégradation de son contenu. Afin d'acquérir ses propriétés microbicides, ce dernier doit alors entreprendre un processus de maturation à travers lequel auront lieu des changements critiques dans sa composition. Ces changements conduiront à la formation du phagolysosome, un organelle au pH acide et chargée d'enzymes hydrolytiques, de peptides bactéricides et d'oxide nitrique (Pitt, A. *et al.*1992; Rabinowitz, S. *et al.*1992).

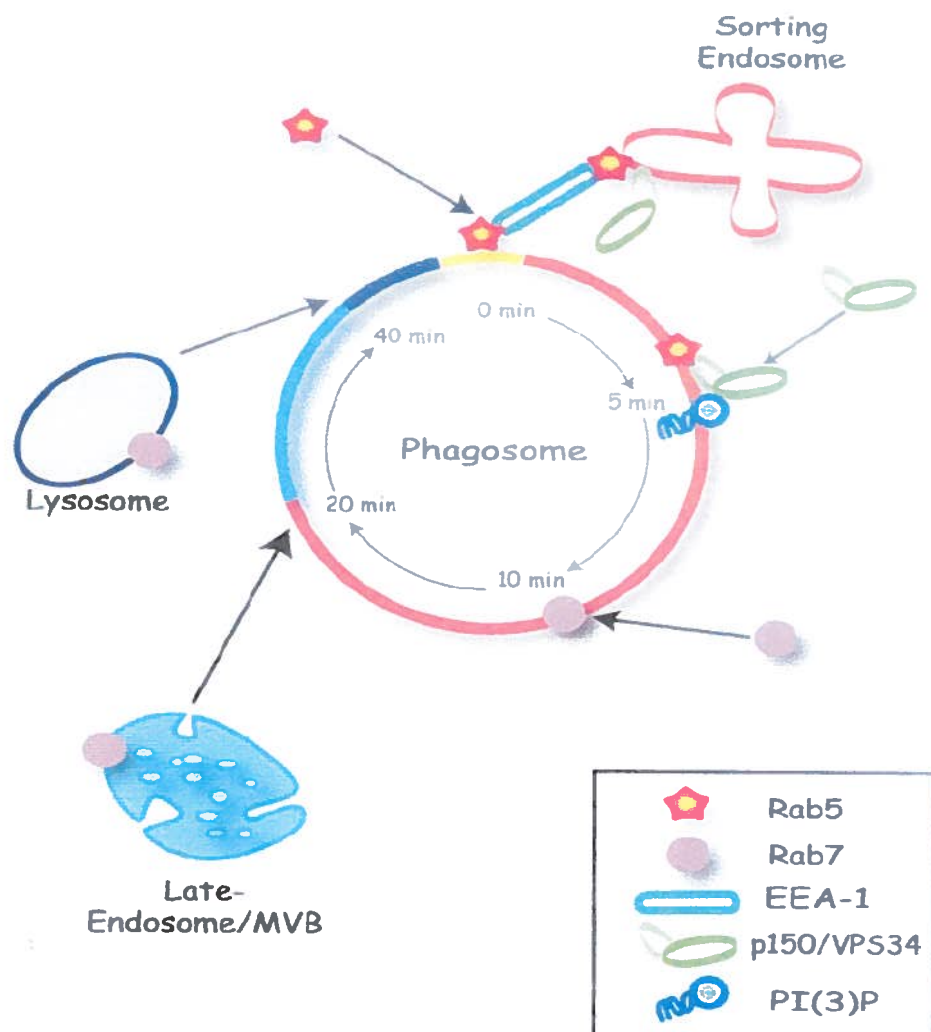


Figure C: Les étapes de la biogénèse du phagolysosome
(Vieira OV., 2002)

2.2.1 Les interactions du phagosome avec la voie endocytaire

La maturation du phagosome résulte de son interaction avec des vacuoles du réseau endocytaire. Ce dernier est constitué d'endosomes précoces, d'endosomes tardifs et de lysosomes. Les phagosomes interagissent avec ces organelles de façon séquentielle. Chacune de ces organelles possède des caractéristiques propres qu'elles transmettent au phagosome par des séries de fusions et de fissions suivant le modèle du « kiss and run » tel que suggéré par Desjardins et ses collègues (Desjardins, M.1995; Desjardins, M. *et al.*1994; Desjardins, M.*et al.*1997). Auparavant, il était considéré que les endosomes précoces, tardifs et les lysosomes fusionnaient complètement avec le phagosome pour donner naissance à une seule organelle, le phagolysosome (Rabinowitz, S.*et al.*1992). Cependant, le modèle de Desjardins prédit que les phagosomes fusionnent partiellement et ce, de façon transitoire avec les endosomes, ce qui permettrait un échange de membranes spécialisées et de composés luminaux. Ces observations ont été faites par vidéomicroscopie de phagosomes contenant des billes de latex qui interagissaient avec des endosomes chargés de particules d'or. Ces expériences ont servi à démontrer les différents mouvements et le dynamisme entre les endosomes tardifs et les phagosomes sans cependant illustrer un échange de leur contenu (Desjardins, M.*et al.*1994). Cet échange a pu être révélé lorsque des endosomes contenant des particules de tailles différentes ont été mis en présence de phagosomes : les plus petites particules ont sélectivement été transférées au lumen des phagosomes tandis que les grosses sont demeurées dans les endosomes (Desjardins, M.*et al.*1997; Duclos, S. *et al.*2000). Ce modèle expliquerait alors pourquoi les phagosomes conservent leur taille tout au long de la maturation (Desjardins, M.*et al.*1994). Malgré cela, le mécanisme engendrant ces fusions transitoires est encore peu connu. Des études portant sur les liposomes suggèrent que la formation de pores de fusions serait à l'origine de ces événements de fusions et de fissions (Nanavati, C. *et al.*1992). La présence de microdomaines de compositions lipidiques différentes tels que les radeaux lipidiques pourrait procurer des changements dans la composition membranaire propices à l'ouverture et à la fermeture des pores (Desjardins, M. et Griffiths, G.2003).

Les phagosomes ont une part active à jouer lors de leur maturation car ils doivent exprimer des signaux spécifiques qui vont guider et déclencher les fusions avec les endosomes. Le processus de maturation débute lorsque les endosomes précoces, caractérisés par la présence de la GTPase Rab 5 et du marqueur EEA1 (Early Endosome Antigen 1), interagissent avec le phagosome. Il a été démontré que les phagosomes précoces possèdent les marqueurs Rab 5 et EEA1 qui sont absents chez les lysosomes (Duclos, S.*et al.*2000; Stenmark, H. *et al.*1994). Les protéines Rab appartiennent à une grande famille de GTPases qui, en conjonction avec les protéines SNARE, facilitent le mouvement des vésicules ainsi que leur arrimage, leur fusion et leur fission (Gorvel, J.P. *et al.*1991; McBride, H.M. *et al.*1999). Le lumen de ces endosomes est pauvre en protéases et possède un pH d'environ 6.0 (Mukherjee, S. *et al.*1997). Les phagosomes perdent ensuite rapidement leurs caractéristiques d'endosomes précoces et amorcent leur fusion avec les endosomes tardifs tout en devenant réfractaires aux endosomes précoces. Les endosomes tardifs sont enrichis d'enzymes hydrolytiques, d'acide lysobisphosphatidique et du récepteur mannose-6-phosphate. Ils sont également caractérisés par la présence des GTPases Rab7 et Rab9 ainsi que des marqueurs LAMPs (lysosomal-associated membrane proteins) (Harrison, R.E. *et al.*2003; Scianimanico, S.*et al.*1999). Mais encore une fois, ceci n'est que transitoire. Des expériences *in vitro* ont démontré que les phagosomes isolés 1 heure suivant leur formation, fusionnent de préférence avec les lysosomes et non avec des organelles précoces (Jahraus, A. *et al.*1998). Les lysosomes possèdent également les marqueurs LAMPs ainsi qu'un grand nombre de protéases et d'hydrolases telles que la cathepsine D et ont un pH acide pouvant aller jusqu'à 4.5. Ce milieu acide est propice à l'activité optimale des enzymes protéolytiques (Claus, V. *et al.*1998).

3. Les radeaux lipidiques et les caveolae

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires ayant une composition lipidique particulière leur donnant des caractéristiques biochimiques uniques, notamment une résistance à la solubilisation par le Triton X-100 à 4°C (Sargiacomo, M. *et al.*1993). De plus, ils flottent à une faible densité lors d'une

centrifugation par gradient (Smart, E.J. *et al.*1995). Ces microdomaines sont composés de glycosphingolipides (GSL), de cholestérol, de sphingomyéline (SPH), de nombreuses protéines ancrées par le glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Jacobson, K. et Dietrich, C.1999; Rosenberger, C.M.*et al.*2000). Il existe une sous-population de radeaux lipidiques découverte dans la membrane de cellules épithéliales de la vésicule biliaire de souris. Des invaginations en forme de flasques ont été visualisées par microscopie électronique (Yamada, E.1955). Ces invaginations nommées caveolea pour « petites caves » par celui qui les a découvert, possèdent comme marqueur la protéine caveoline-1, une protéine qui lie le cholestérol (Rothberg, K.G. *et al.*1992). Le terme radeau lipidique est utilisé pour définir les caveolae et les microdomaines ayant des caractéristiques biochimiques similaires (Brown, D.A. et Rose, J.K.1992).

3.1 La signalisation via les radeaux lipidiques

Des analyses biochimiques de la composition protéiques des radeaux lipidiques purifiés de plusieurs lignées cellulaires démontrent une forte concentration de molécules de signalisations telles que la PI3-K, la PLC γ et la PKC α (Liu, J.*et al.*1997; Liu, P.*et al.*1996). Plusieurs études ont démontré que les radeaux lipidiques avaient un rôle dans plusieurs processus cellulaires tels que l'endocytose (Smart, E.J. *et al.*1999), l'internalisation de bactéries, de toxines et de virus (Fivaz, M. *et al.*1999), l'homéostasie du calcium (Isshiki, M. et Anderson, R.G.1999), le triage des protéines (Simons, K. et Ikonen, E.1997) et la phagocytose (Dermine, J.F.*et al.*2001). Les radeaux lipidiques sont donc importants lors de la transduction des signaux et ce, en agissant sur la localisation des composantes de voies de signalisation spécifiques. La translocation de molécules de signalisation à l'intérieur ou à l'extérieur de ces domaines, permettrait ainsi aux cellules de répondre à certains stimuli. Par exemple, une protéine activée par phosphorylation peut être séquestrée à l'intérieur d'un radeau lipidique et ceci peut prévenir sa désactivation par une phosphatase. De plus, les interactions croisées entre différentes voies de signalisation peuvent être facilitées si elles sont localisées dans le même radeau lipidique (Zajchowski, L.D. et Robbins, S.M.2002). Des sous-populations distinctes de radeaux lipidiques présentes à la surface d'une même cellule seraient spécialisées pour

effectuer des fonctions spécifiques. De plus, l'agglutination et le mouvement des radeaux (Harder, T. *et al.*1998; Pralle, A.*et al.*2000) pourraient être deux moyens efficaces pour transporter des complexes de signalisation pré-assemblés à des endroits spécifiques de la membrane en réponse à une stimulation. Ceci pourrait par le fait même mener à une amplification des signaux. Également, les radeaux lipidiques jouent un rôle dans la régulation négative des voies de signalisation en séquestrant des molécules de signalisation à leur état inactif.

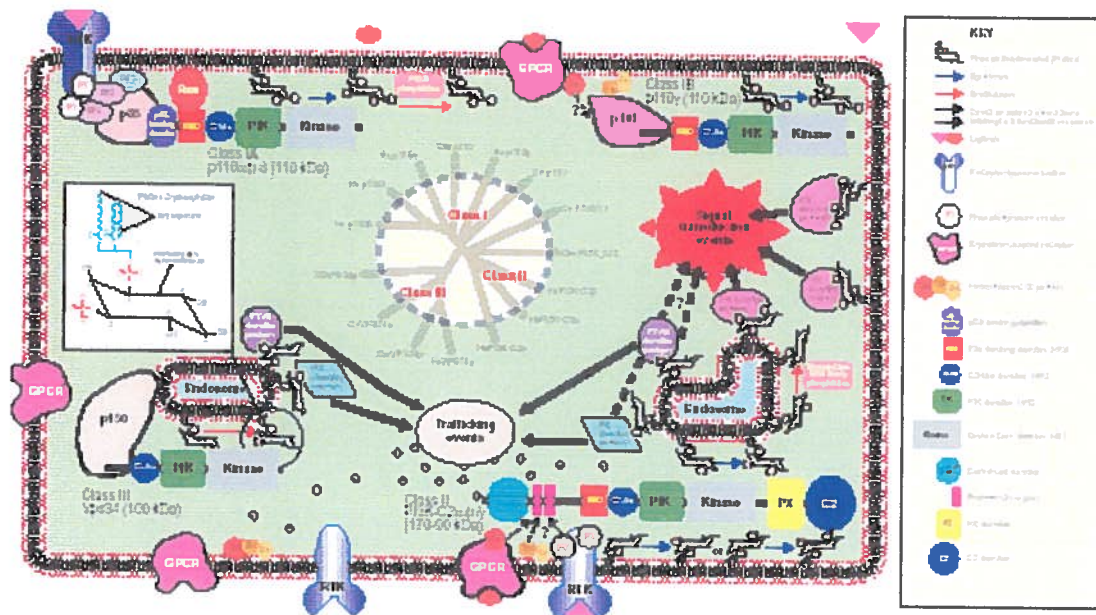
3.2 Le rôle des radeaux lipidiques dans la phagocytose de *Leishmania donovani*

Les radeaux lipidiques agissent en tant que portes d'entrées et des voies de signalisation pour plusieurs pathogènes et leur toxines tels que le lipopolysaccharide des bactéries à gram négatif (Ulevitch, R.J. et Tobias, P.S.1994), *Mycobacterium kansasii* (Peyron, P. *et al.*2000) et le VIH (Nguyen, D.H. et Hildreth, J.E.2000). Desjardins et ses collègues ont démontré pour la première fois la présence de radeaux lipidiques aux phagosomes. C'est par des analyses d'immunobuvardage sur gels 1D et 2D et par immunofluorescence qu'ils ont localisé le marqueur de radeaux lipidiques, la flotilline-1, aux phagosomes matures dépourvus du marqueur LAMP 1. Lorsque des promastigotes de *L. donovani* ont été internalisés par des macrophages, seulement 20% des phagosomes possédaient la flotilline-1 comparativement à 90% pour les phagosomes contenant des billes de latex (Dermine, J.F.*et al.*2001). *L. donovani* est reconnu pour sa capacité à inhiber la biogénèse du phagolysosome. Ces observations démontrent donc que les radeaux sont importants pour la fusion d'organelles tardives avec le phagosome. D'autres groupes de chercheurs ont démontré que la conservation de l'intégrité des radeaux lipidiques était essentielle pour l'entrée de promastigotes *L. donovani* non-opsonisés dans les macrophages. Cependant, ces observations ne pouvaient être faites dans le cas de promastigotes opsonisés au complément (Pucadyil, T.J. *et al.*2004).

4. Phosphatidylinositol 3-Kinase et les Phosphoinositides

Les phosphoinositides sont des phospholipides ayant un anneau inositol lié via le groupe 1'-OH. Lorsque l'anneau inositol ne porte aucun groupement phosphate, le lipide est nommé phosphatidylinositol (PtdIns) (Figure D, encadré blanc). Celui-ci peut être phosphorylé à trois positions différentes, soient aux groupements hydroxy D3, D4 et D5. Une fois phosphorylés, ils sont alors nommés phosphoinositides (PI). Différents phosphoinositides seront créés par différentes combinaisons de phosphorylation (Vanhaesebroeck, B. et Waterfield, M.D.1999).

Les PI sont tout d'abord des seconds messagers cellulaires. Leur distribution spatio-temporelle est régulée par différentes kinases et phosphatases. Ceux-ci sont synthétisés du côté cytosolique de la membrane plasmique où ils recruteront et/ou activeront des protéines effectrices. Ces messagers sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont le transport membranaire, l'adhésion, la réorganisation de l'actine, sans oublier la division et la survie cellulaire.



4.1 Les différentes classes de PI3K

Les PI 3-K catalysent le transfert du groupe γ -phosphate de l'ATP à la position D3 de l'anneau inositol des PtdIns. Il existe plusieurs formes de PI 3-K chez les mammifères et ont été divisées en trois grandes classes selon plusieurs facteurs tels que des analyses de séquences, les interactions avec des protéines adaptatrices et selon leurs substrats (Wymann, M.P. et Pirola, L.1998).

4.1.1 La classe IA

La classe I est subdivisée en deux sous-classes, la classe IA et la classe IB (Figure D). Les enzymes appartenants à ces classes sont des hétérodimères composés d'une sous-unité adaptatrice et d'une sous unité catalytique. Leurs substrats peuvent être des PtdIns,

des PI(4)P et des PI(4,5)P₂ *in vitro*. Cependant, PI(3,4,5)P₃ reste le principal lipide généré par la PI 3-K de classe I *in vivo* (Hinchliffe, K. et Irvine, R.1997; Stephens, L.R. *et al.*1991). La classe IA est composée des isoenzymes p110α, p110β et p110δ. Ces enzymes sont constitutivement associés a une sous-unité adaptatrice/régulatrice p85. Il existe trois gènes qui codent pour environ huit de ces sous-unités adaptatrices (dont p85α, p85β et p85γ) et des variants peuvent être générés par épissage alternatif.

. La sous-unité adaptatrice p85 est composée, en partant de la position N-terminale, d'un domaine SH3 (domaine d'homologie à Src 3). Le domaine SH3 reconnaît spécifiquement les motifs suivants : RXLPPRPXX et XXXPPXPXX (Yu, H. *et al.*1994).

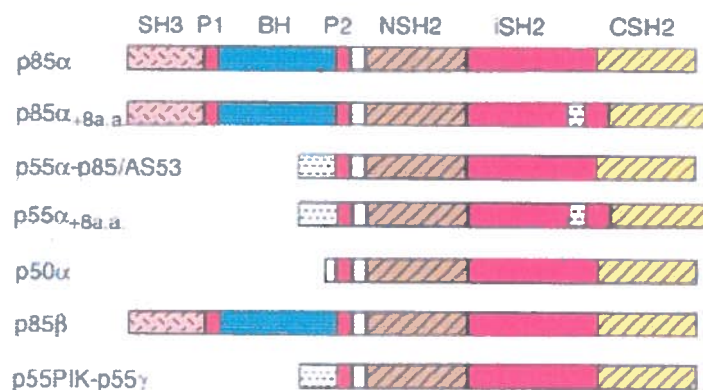


Figure E: Les sous-unités adaptatrices de la PI3-K de la classe IA
(Wymann MP *et al.*,1998)

Ensuite, p85 possède deux régions riches en prolines P1 et P2 qui flanquent un domaine BH (domaine d'homologie à BCR). Ces régions s'associent aux domaines SH3 présents sur des protéine tyrosines kinases telles que v-Src (Liu, X. *et al.*1993), Lyn et Fyn (Prasad, K.V. *et al.*1993), Abl et Lck (Kapeller, R. *et al.*1994). De plus, il y aurait une interaction entre les régions P1 et P2 et le domaine SH3 de p85. Il a été proposé que

cette interaction participerait à la régulation de l'activité de la PI3-K Ia (Kapeller, R.*et al.*1994).

La sous-unité p85 possède 3 domaines SH2 (domaines d'homologie à Src 2); un en C-terminal (CSH2), un en N-terminal (NSH2) et un domaine inter-SH2 (iSH2). Les domaines NSH2 et CSH2 reconnaissent les motifs pYXXM. Pour une interaction optimale avec NSH2, les acides aminés Met, Ile, Val ou Glu doivent être adjacents au motif phosphotyrosine. En ce qui concerne le CSH2, se sont les acides aminés Met, Leu ou Ile qui doivent être adjacents au motif pour une interaction optimale (Wymann, M.P. et Pirola, L.1998).

C'est en utilisant des fragments recombinants de p85 et p110, que le domaine inter-SH2 de p85 et les 130 premiers résidus de p110 ont été identifiés comme étant les sites de liaison entre les deux sous-unités (Klippel, A. *et al.*1994; Klippel, A. *et al.*1993). De plus, des anticorps dirigés contre ces épitopes inhibent leur interaction (Dhand, R. *et al.*1994; Dhand, R. *et al.*1994). Lorsqu'il y a co-expression de p110 avec le domaine iSH2, la formation du complexe est conservée. Cependant, le complexe iSH2/p110 ne peut être activé par des peptides phosphotyrosines. L'activation par les phosphotyrosines de l'activité kinase, ne peut avoir lieu que lorsque le domaine iSH2 est flanqué d'au moins un ou deux domaines SH2 (Holt, K.H. *et al.*1994).

Le domaine d'homologie à Bcr (breakpoint-cluster-region), BH, de p85 interagit spécifiquement avec les GTPases Cdc 42 et Rac1 de la famille Rho. Le domaine BH est très homologue au domaine GAP (GTPase activating protein), néanmoins, aucune activité d'activation des GTPase n'a été détectée chez p85 (Tolias, K.F. *et al.*1995).

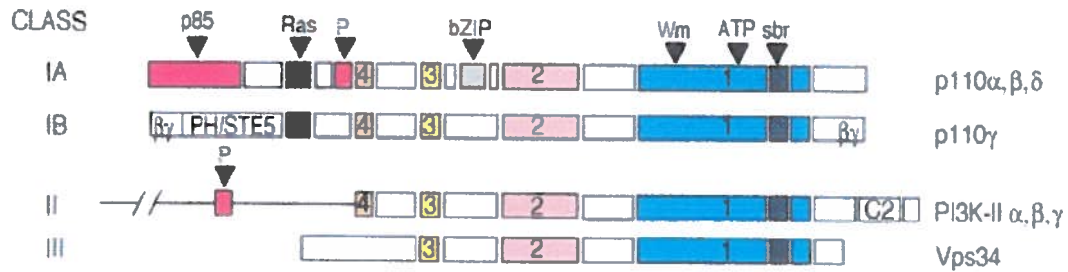


Figure F : Les sous-unités catalytiques de PI3-Kinase
(Wymann MP et *al.*1998)

Les PI 3-K de classe I possèdent quatre domaines d'homologies HR1, HR2, HR3 et HR4 (Figure F). Le domaine HR1 est commun aux trois classes de PI3-K ainsi qu'aux PI4-K et aux protéines kinases apparentées à la PI 3-K. C'est dans ce domaine que l'on retrouve le site de liaison à l'ATP. Le domaine HR2 est aussi commun aux différentes classes de PI 3-K et aux PI4-K mais aucune fonction spécifique ne lui a été attribuée. HR3 est unique aux PI 3-K tandis que HR4 est restreint aux PI 3-K de classe I. Les sous-unités de PI 3-K de classe I possèdent également, en N-terminal, un site de liaison à Ras (Wymann, M.P. et Pirola, L.1998).

4.1.2 La classe IB

Le seul membre de la classe IB connu jusqu'à lors est p110γ, qui s'associe exclusivement avec la protéine adaptatrice p101 (Figure D) (Krugmann, S. *et al.*1997). L'activité kinase est activée par les sous-unités βγ des protéines G hétérotrimériques couplées à des récepteurs. C'est par la sous-unité p101 que le complexe est recruté à la membrane *in vivo* et l'activation de la kinase mène à la phosphorylation des phospholipides PI(4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃ (Brock, C. *et al.*2003).

4.1.3 La classe II

Il existe jusqu'à présent trois isoformes de cette classe, PI 3-K-C2 α , β , δ qui sont encodés par trois gènes différents (Figure D). Ces enzymes ont un poids moléculaire d'au moins 200 kDa. Ils possèdent les domaines d'homologie HR1 à HR4 mais n'ont pas de site de liaison à la p85 en N-terminal et aucune protéine adaptatrice avec laquelle ils s'associeraient n'a été découverte. Ils sont caractérisés par un domaine C2 en C-terminal. Leur domaine C2 est semblable à celui de la protéine synaptotagmin, cependant ils sont insensibles au Ca^{2+} puisqu'il leur manque un résidu Asp nécessaire à la liaison du Ca^{2+} (Sutton, R.B. *et al.*1995). Celui-ci est essentiel à l'activité catalytique de la kinase (Misawa, H. *et al.*1998). Les PI 3-K de classe II ont plus d'affinité pour les PtdIns, PI(4)P et PI(4,5)P₂ *in vitro* et ce, en ordre croissant d'importance (Domin, J. *et al.*1997). Néanmoins, les substrats spécifiques *in vivo* restent à être déterminés. De plus, le domaine C2 est essentiel à l'activité catalytique de la kinase (Misawa, H. *et al.*1998). Bien que leur fonction ainsi que leur mode d'activation reste à être élucidés, l'activation des PI 3-K est exécutée par des tyrosines kinases couplées à des récepteurs (Arcaro, A. *et al.*2000). Il a été démontré par Gaidarov et son groupe que la PI 3-K-C2 α se localise aux vésicules recouvertes de clathrin. Elle participerait à l'endocytose de vésicules via la clathrine et au triage au niveau du réseau trans-Golgi. La clathrine agit en tant que protéine adaptatrice pour PI 3-K-C2 α (Gaidarov, I. *et al.*2001).

4.1.4 La classe III

La PI 3-K de classe III a d'abord été identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sous le nom de « vesicular protein sorting protein » Vps34p (Takegawa, K. *et al.*1995). Chez les levures et les mammifères, la Vps34p s'associe avec une serine/thréonine kinase, la Vps15p chez la levure (Figure D) (Stack, J.H. et Emr, S.D.1993) et qui correspond à la p150 chez les mammifères (Panaretou, C. *et al.*1997). Lorsque le gène VPS34 est délété ou que l'activité de la Vps34p est inhibée, les protéines normalement destinées à la vacuole sont déroutées vers la sécrétion. Une Vps15p fonctionnelle est requise pour l'activation et pour le recrutement au Golgi de la Vps34p

(Stack, J.H. *et al.*1995). La Vps34p est impliquée dans le trafic lysosomal des protéines et son seul produit lipidique est le PI(3)P. Chez les mammifères, le recrutement de la cathepsine D nouvellement synthétisée aux lysosomes (l'équivalent des vacuoles chez la levure) est intercepté lors de l'inhibition de la PI 3-K de classe III avec la wortmannin. Par le fait même, la transformation des pro-cathepsines en cathepsines est aussi inhibée. Les cathepsines et les pro-cathepsines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire suite à l'action de la wortmannin (Brown, W.J. *et al.*1995).

4.2 L'activation des PI3-K de la classe IA

Au moins quatre procédés peuvent co-opérer afin d'activer la PI3-K. Tout d'abord, celle-ci se localise à la membrane plasmique par la liaison de ses domaines SH2 aux motifs pYXXM sur des récepteurs ayant une activité tyrosine kinase ou sur des protéines effectrices. La PI 3-K peut être recrutée par l'interaction entre son domaine SH3 et des régions riches en prolines de Shc, Cbl, ou de la dynamine. De plus, les domaines riches en prolines P1 et P2 de p85 interagiront avec les domaines SH3 de Lyn, Fyn, Grb2, v-Src, Abl et Lck (Wymann, M.P. et Pirola, L.1998). Le recrutement à la membrane plasmique est suffisant pour mener à l'activation de la PI 3-K. Cependant, l'interaction des deux domaines SH2 de p85 avec des phosphotyrosines provoque une activation de plus forte intensité que lorsqu'il y a interaction avec une seule phosphotyrosine (Rordorf-Nikolic, T. *et al.*1995). Cette translocation va générer un changement conformationnel chez la PI3-K lui permettant de se rapprocher physiquement des phosphoinositides.

Des études ont permis de démontrer que Ras-GTP était aussi impliquée dans l'activation de la PI 3-K. La première preuve fut faite par immuno-précipitation de la PI 3-K avec des anticorps dirigés contre Ras (Sjolander, A. *et al.*1991). De plus, la surexpression d'un mutant constitutivement actif de Ras (V12Ras) augmente la production de PI(3,4)P₂ et de PI(3,4,5)P₃, tandis que la surexpression d'un mutant

dominant négatif de Ras (N17Ras) interfère avec l'activation de la PI 3-K par les récepteurs de facteurs de croissance (Rodriguez-Viciano, P. *et al.* 1994).

4.3 La signalisation via les PI3K

Les PI 3-K modulent une variété de processus biologiques tels l'apoptose, la prolifération cellulaire, et le trafic de membranes tels l'endocytose et l'exocytose. Elles sont donc impliquées dans la pathologie de plusieurs maladies métaboliques, inflammatoires et cardiovasculaires (Vanhaesebroeck, B. et Waterfield, M.D.1999; Wymann, M.P. *et al.*2003). Plusieurs recherches ont été effectuées afin d'identifier les protéines interagissant avec les différents phosphoinositides générés par PI 3-K. La découverte des domaines PH, FYVE et PX (Figure D) que l'on retrouve sur les protéines recrutées, de façon spécifique par les phosphoinositides, a donc facilité cette tâche.

4.3.1 Les domaines d'homologie à la pleckstrine (PH)

Ces domaines sont petits et modulaires, d'environ 120 aa, découverts pour la première fois chez la pleckstrine, le substrat majeur de la protéine kinase C chez les plaquettes (Harlan, J.E. *et al.*1994). Ils sont présents une à plusieurs fois sur des protéines de signalisation et ils ont pour fonction de cibler ces protéines du côté cytosolique des membranes en s'associant avec les PI. Ils sont divisés en deux classes, soient les classes I et II, la classe II ayant une trop faible affinité pour les PI, et ne mène pas à la localisation des protéines aux membranes comparativement à la classe I (Stenmark, H.É.2004). Les domaines PH de classe I lient les PI avec beaucoup d'affinité et possèdent un haut degré de stéréospécificité. Ils sont subdivisés en 5 groupes selon leur spécificité pour les PI suivants : Ins(1,3,4,5)P₄ (Fukuda M *et al.*1996), PtdIns(3,4,5)P₃ (Kojima, T. *et al.*1997), PtdIns(4,5)P₂ (Garcia, P. *et al.*1995), PtdIns(3,4)P₂ (Dowler, S. *et al.*2000).

4.3.2 Les domaines FYVE

Le domaine FYVE (conserved in Fab 1p, YOTB, Vac 1p and EEA1) a été identifié pour la première fois comme un domaine « zinc finger » requis pour la localisation de EEA1 aux membranes endosomales (Stenmark, H. *et al.*1996). Ce domaine se lie avec grande affinité aux PtdIns(3)P (Stenmark, H. *et al.*2002), cependant, cette affinité varie d'une protéine à l'autre (Gaulhier, J.M. *et al.*1998). La plupart des protéines ayant un domaine FYVE se localisent aux endosomes précoces, ce qui n'est pas étonnant puisqu'ils sont enrichis en PI(3)P. Un autre exemple de protéine ayant un domaine FYVE est Rabenosyn 5 qui se lie de la même façon que EEA1 à Rab 5-GTP sur les endosomes précoces (Nielsen, E. *et al.*2000). Le domaine FYVE est donc important pour le recrutement de protéines ayant un rôle dans la maturation du phagosome.

4.3.3 Les domaines PX

Le domaine PX (Phox homology) a été identifié dans des sous-unités du complexe NADPH oxidase des granulocytes neutrophiles générant des anions superoxydes qui participent à la destruction des microorganismes phagocytés (Ponting, C.P.1996). La plupart des domaines PX lient spécifiquement les PI(3)P (Sato, T.K. *et al.*2001), cependant, ce n'est pas toujours le cas. La protéine p47^{phox} se lie de préférence aux PI(3,4,5)P₃ que l'on retrouve à la coupe phagocytaire, tandis que p40^{phox} lie les PI(3)P et est recrutée aux endosomes précoces dans des phagocytes non-professionnels (Ellson, C.D. *et al.*2001).

4.4 Rôle des PI3 Kinases de classe I et III dans la phagocytose

4.4.1 Rôle de PI3K dans l'internalisation

Bien qu'il soit maintenant clair que la PI3-kinase joue un rôle clé dans la phagocytose via les récepteurs Fc et du complément, il reste à savoir à quelle étape du

processus d'internalisation elle intervient. De plus, la plupart des études se concentrent majoritairement sur la phagocytose par les récepteurs Fc. Les recherches portant sur les PI3-kinases et la phagocytose via les récepteurs du complément demeurent moins fréquentes. A plusieurs occasions, les inhibiteurs pharmacologiques LY294002 et la wortmannin se sont montrés efficaces pour diminuer fortement l'internalisation d'érythrocytes ou de billes de latex opsonisés avec des IgG ou avec des molécules du complément par les macrophages (Araki, N.*et al.*1996; Cox, D.*et al.*1999; Lutz, M.A. et Correll, P.H.2003; Ninomiya, N.*et al.*1994). Cependant, ces inhibiteurs n'empêchent pas l'accumulation d'actine autour du phagosome. Des images par microscopie électronique démontrent qu'il y a toutefois une internalisation partielle par la présence de pseudopodes enrobant les particules. Donc, en absence de l'activité PI3-K, l'accumulation d'actine à la coupe phagocytaire ainsi que l'extension des pseudopodes demeurent intactes, mais leur fermeture complète autour de la particule reste inachevée (Araki, N.*et al.*1996). Cette observation a donc mené à l'hypothèse que PI 3-K est importante lors de la fusion des pseudopodes. Une autre étude contredit cette hypothèse en démontrant que la réduction de la phagocytose par ces mêmes inhibiteurs varie selon la taille de la particule ingérée. Plus la dimension de la particule est importante, plus de membrane est donc requise pour l'extension des pseudopodes. PI 3-K serait donc impliquée dans l'extension des pseudopodes plutôt que lors de leur fusion autour de la particule internalisée (Cox, D.*et al.*1999). Enfin, une troisième étude utilisant une approche totalement différente des autres, soit par des mesures électrophysiologiques, a démontré que l'inhibition de la PI 3-K n'affecte pas l'exocytose focale (Di, A.*et al.*2003).

La surexpression de la protéine SHIP (Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase) qui a pour effet de supprimer la signalisation par les PI3-kinases, diminue la phagocytose via les récepteurs Fc et CR3 (Cox, D. *et al.*2001).

Une autre méthode utilisée pour démontrer l'implication des PI 3-K dans la phagocytose est la visualisation de l'accumulation des PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ à la coupe phagocytaire par microscopie confocale (Marshall, J.G.*et al.*2001). Les domaines PH

provenant de différentes protéines telles que Akt/PKB (Gray, A. *et al.*1999; Marshall, J.G.*et al.*2001; Watton, S.J. et Downward, J.1999), Bkt (Varnai, P. *et al.*1999) ainsi que ARNO (Oatey, P.B. *et al.*1999) ont été fusionnés à la GFP. Ces constructions sont devenues des outils de choix pour la visualisation des phosphoinositides dans la cellule.

Un groupe de chercheurs a cependant décidé d'aller un peu plus loin dans la matière afin d'élucider quels isoenzymes sont spécifiquement impliqués dans la phagocytose. Sachant que les inhibiteurs pharmacologiques ne sont pas spécifiques à une seule classe de PI 3-K, Vieira et ses collègues ont généré des fibroblastes embryonnaires murins $p85\alpha^{-/-}$ et $p85\beta^{-/-}$ exprimant le récepteur Fc γ . Ils ont pu ainsi démontrer que les PI 3-K de classe IA sont nécessaires à l'internalisation de SRBC opsonisés aux IgG, mais non au niveau de la maturation du phagosome (Vieira, O.V.*et al.*2001).

4.4.2 Rôle de PI3K dans la maturation du phagosome

Plusieurs travaux ont permis de démontrer l'implication de PI 3-K lors de la maturation du phagosome. Les inhibiteurs pharmacologiques se sont encore une fois montrés utiles avec des macrophages ayant débuté la phagocytose. Bien que Rab5 et Rab7 soient toujours présents et bien actifs au phagosome suite à ce traitement, le marqueur endosomal EEA1 ainsi que le marqueur lysosomal LAMP-1 n'étaient pas recrutés et la fusion du phagosome aux endosomes était abolie (Fratti, R.A. *et al.*2001; Patki, V. *et al.*1997; Vieira, O.V. *et al.*2003). PI(3), le phosphoinositide principal généré par PI 3-K de classe III, peut être détecté peu de temps suivant la fermeture du phagosome à l'aide des protéines de fusion 2FYVE-GFP (Vieira, O.V.*et al.*2001). Afin de confirmer le rôle de PI 3-K de classe III dans la maturation du phagosome, des anticorps neutralisants contre Vsp34 furent utilisés (Patki, V.*et al.*1997; Vieira, O.V.*et al.*2001).

4.5 Les PI3-kinases et l'invasion par divers microorganismes

Certains microorganismes requièrent la présence de phosphoinositides produits par la PI3-kinase afin d'infecter leur hôte de façon productive. Suite à l'infection de cellules non-phagocytiques par la bactérie *Listeria monocytogenes*, une augmentation rapide de PI(3,4)P₂ et de PI(3,4,5)P₃ est détectée en présence de la protéine bactérienne InlB. De plus, l'entrée de ce pathogène est diminuée dans les cellules dont les PI3-kinases sont inactivées (Ireton, K. *et al.*1996). Des cellules non-phagocytiques traitées à la wortmannin ou un autre inhibiteur des PI3-kinases, sont plus résistantes à une infection par le parasite protozoaire *Trypanosoma cruzi* (Woolsey, A.M. *et al.*2003). Cependant, il arrive que certains pathogènes contournent ou même inhibent l'activité de la phosphatidylinositol (PI) 3-kinase. Tel est le cas pour la bactérie extracellulaire *E. coli* entéropathogénique qui évite la phagocytose par les macrophages en inhibant l'activation et non le recrutement de la PI3-K (Celli, J. *et al.*2001). Enfin, la réussite de *Mycobacterium tuberculosis* dans son infection des macrophages repose sur sa capacité à interférer avec le trafic membranaire. Cette bactérie bloque la biogénèse du phagolysosome. Ce sont des produits mycobactériens qui en seraient responsables tels que les PIM (phosphatidylinositol mannoside) et les ManLAM (Mannose capped lipoarabinomannan) qui sont des dérivés des phosphatidylinositols. LAM inhibe le recrutement de EEA1 au phagosome (Fratti, R.A.*et al.*2001) et donc bloque la voie des PI3-K, tandis que PIM favorise et accélère la fusion du phagosome aux endosomes précoces en contournant l'activation des PI3-K puisque cette action ne peut être bloquée avec un traitement à la wortmannin (Vergne, I. *et al.*2003).

5. Les parasites *Leishmania*

Les parasites protozoaires du genre *Leishmania* appartiennent à la famille des *Trypanosomatidae*, caractérisés par la présence d'un flagelle et d'un kinétoplaste, riche en ADN et semblable aux mitochondries. Ces parasites infectent des millions de personnes à travers le monde et sont transmis par la mouche des sables femelle du genre *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (Killick-Kendrick, R.1985; Killick-Kendrick, R.1990;

Killick-Kendrick, R.1990). Il existe au-delà de 20 espèces et sous-espèces de *Leishmania* et au moins autant d'espèces de mouches des sables pouvant les transmettre. Cependant, certaines espèces de mouches des sables sont uniquement capables de transmettre certaines espèces de *Leishmania*, ceci mettant en évidence l'existence d'un lien dans l'évolution du parasite et son vecteur (Killick-Kendrick, R.1985). Cette spécificité est déterminée par les interactions entre le parasite et la mouche des sables. Ceci va dépendre de l'habilité de *Leishmania* à résister aux enzymes protéolytiques largués dans l'estomac de la mouche peu de temps après son repas sanguin ainsi que sa capacité à maintenir son infection sans être excrété avec le repas digéré (Sacks, D.L.2001).

5.1 Les leishmanioses

Les parasites *Leishmania* sont la cause d'une multitude de syndromes cliniques regroupés sous le terme de leishmanioses. Ces leishmanioses sont subdivisées en trois formes chez les humains : la leishmaniose cutanée, la leishmaniose mucocutanée et la leishmaniose viscérale, aussi connue sous le nom de Kala-azar. La forme ainsi que la sévérité de la maladie sont déterminées majoritairement par l'espèce de *Leishmania* inoculée, par le fait même l'espèce de la mouche des sables qui l'a transmis, ainsi que par le statut immunitaire de l'hôte (Kane MM et Mosser DM. 2000).

5.1.1 La leishmaniose cutanée

L. tropica et *L. major* sont responsables de la leishmaniose cutanée. Ils sont transmis par la mouche des sables *Phlebotomus* et on les retrouve majoritairement dans des régions géographiques où il y a de grandes densités de populations telles qu'au Kenya, en Éthiopie, au Nord de l'Afrique, au Moyen Orient et en Inde. Cette maladie est caractérisée par l'apparition d'ulcères cutanés localisés au site initial de la piqûre par la mouche. L'apparition d'une papule rouge s'ensuit résultant de l'infiltration de macrophages et de lymphocytes au site d'infection. Les lésions peuvent se résorber par

elles-mêmes dans une fenêtre de 2 mois à un an dépendant de la sévérité de l'infection (Alexander, J.*et al.* 1999; Descoteaux, A. et Turco, S.J.2002).

5.1.2 La leishmaniose mucocutanée

La leishmaniose mucocutanée est causée par *L. braziliensis*, transmis par la mouche *Lutzomyia* que l'on retrouve en Amérique centrale et du Sud. Tel que pour la leishmaniose cutanée, les lésions sont localisées au site de la piqûre, cependant, l'infection ne reste pas confinée au site mais se propage aux muqueuses de la bouche et du nez causant la dégénération des tissus cartilagineux. Les ulcérations sont plus défigurantes, attaquant les lèvres, le nez, la bouche, le palais et les cordes vocales. Normalement, l'infection se résorbe aussi par elle-même mais peut durer jusqu'à 40 ans (Alexander, J.*et al.* 1999; Descoteaux, A. et Turco, S.J.2002).

5.1.3 La leishmaniose viscérale

Cette forme est principalement causée par *L. donovani*. On le retrouve dans le bassin méditerranéen, au Nord et à l'Est de l'Afrique, en Inde et en Chine où il est transmis par la mouche *Phlebotomus* et en Amérique du Sud où il est transmis par la mouche *Lutzomyia*. Les parasites infectent les macrophages de la rate, du foie, des intestins et des organes lymphatiques. Si cette maladie n'est pas traitée, la mort peut s'en suivre 2 à 3 ans suivant le début de l'infection (Alexander, J.*et al.* 1999; Descoteaux, A. et Turco, S.J.2002).

5.2 Le cycle de vie de *Leishmania*

Tout au long de son cycle de vie, le parasite *Leishmania* existe sous deux formes distinctes, les formes amastigote et promastigote. Chez les mammifères, le parasite se retrouve sous la forme amastigote, une forme non motile ayant la capacité de proliférer à

l'intérieur du phagolysosome des macrophages hôtes (Alexander, J. et Russell, D.G.1992; Chang, K.P. et Dwyer, D.M.1976). Lorsqu'une mouche des sables se nourrit chez un mammifère infecté, les macrophages porteurs d'amastigotes sont ingérés avec le repas de sang. Durant la digestion de son repas, les amastigotes se différencient en promastigotes procycliques, une forme motile qui se divise et est incapable d'infecter une cellule hôte. Ces promastigotes vont ensuite s'attacher à la paroi épithéliale de l'estomac de la mouche afin d'éviter leur excrétion. La virulence du parasite est acquise lors de la métacyclogénèse, un processus par lequel les promastigotes procycliques non infectieux se transforment en promastigotes métacycliques infectieux qui ne se divisent plus. Ces derniers vont se détacher de l'estomac pour migrer vers la partie antérieure du tube digestif de la mouche. Lors d'un prochain repas, ils seront inoculés chez un mammifère hôte (Descoteaux, A. et Turco, S.J.1999).

5.4 Les glycoconjugués de *Leishmania donovani*

5.4.1 Le lipophosphoglycan

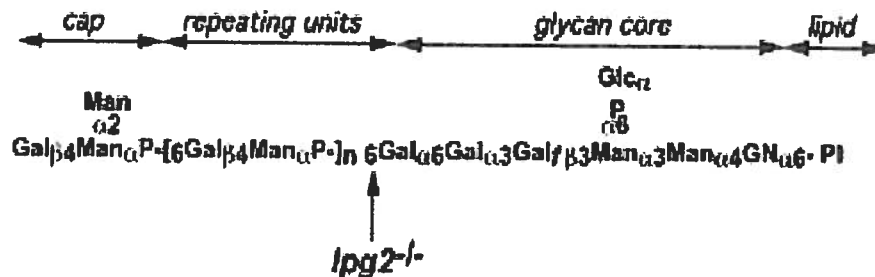


Figure G: Structures de la forme sauvage du lipophosphoglycan de *Leishmania donovani* et de la forme tronquée exprimée par le mutant *lpg2-KO* (Descoteaux A. et Turco S.J., 2002).

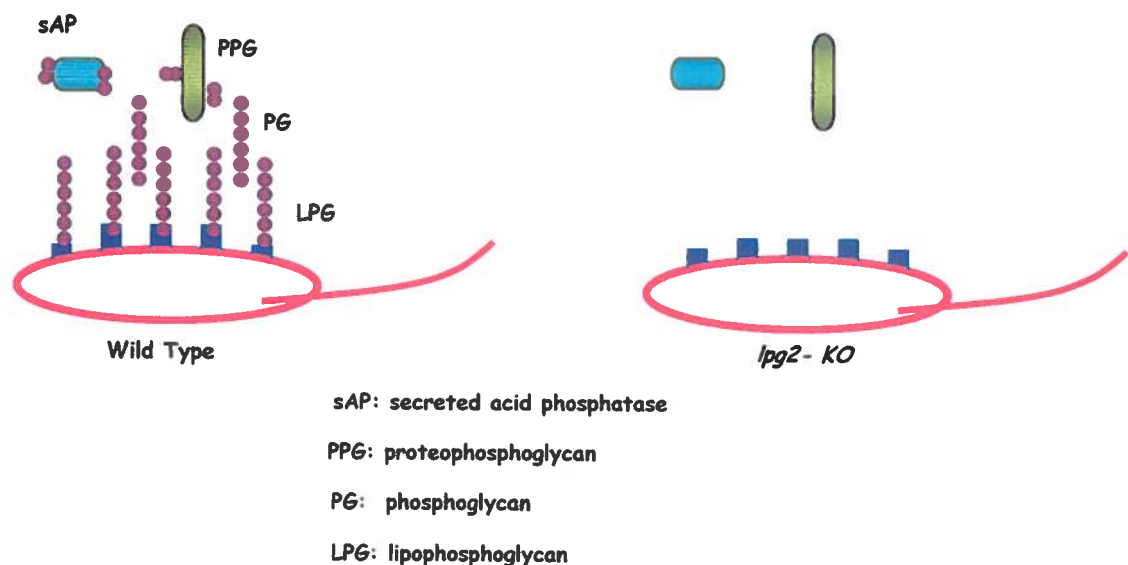


Figure H : Schéma représentant le lipophosphoglycan et les autres molécules de surface apparentées au LPG exprimés par les promastigotes de type sauvage et *lpg2-KO*
 (Adapté de (Holm, A.*et al.*2001))

Le lipophosphoglycan (LPG) est le glycoconjugué le plus abondant à la surface du promastigote. Cette molécule est composée de quatre domaines : (i) une ancre 1-*O*-alkyl-2-*lyso*-phosphatidyl(*myo*)inositol, un noyau de glycan, des unités répétitives du disaccharide phosphate Gal β (1,4)Man α -PO₄ et une coiffe d'oligosaccharides (McConville, M.J. et Ferguson, M.A.1993; Turco, S.J. et Descoteaux, A.1992). Tout au long du cycle de vie du parasite, le LPG va subir plusieurs modifications importantes. Durant la métacyclogénèse, le LPG entreprend une élongation en doublant son nombre d'unités répétitives de 15 pour les promastigotes procycliques à 30 pour les promastigotes métacycliques (Sacks, D.L. *et al.*1995). Ces modifications ont un rôle important à jouer dans l'attachement et le dégagement des parasites de l'estomac de la mouche. Bien que le LPG soit très abondant à la surface du promastigote, sa synthèse est fortement diminuée chez l'amastigote d'environ 1000 fois. De plus, les molécules de

LPG synthétisées ont une structure qui diffère de celle des promastigotes (Turco, S.J. et Sacks, D.L.1991).

5.4.2 Autres molécules apparentées au LPG

La protéase de surface gp63 est attachée à la membrane du parasite par une ancre GPI (Schneider, P. *et al.*1990). L'acide phosphatase qui est sécrétée (sAP) ainsi que les phosphoglycans et les protéophosphoglycans également sécrétés possèdent des unités répétitives du disaccharide phosphate ainsi qu'une coiffe semblable à celle du LPG (Ilg, T. *et al.*1998; Ilg, T. *et al.*1996; Ilg, T. *et al.*1995; Ilg, T. *et al.*1994). Enfin, une famille de phospholipides glycosylinositols (GIPLS) sont aussi abondants à la surface des promastigotes et des amastigotes et peuvent servir de précurseur pour le LPG ou pour des ancres GPI ou tout simplement en tant qu'entités distinctes (McConville, M.J. et Ferguson, M.A.1993).

5.5 Mécanismes d'évasion de *Leishmania* aux systèmes de défense de l'hôte

Afin de survivre à l'intérieur de l'hôte, les parasites *Leishmania* ont évolué diverses stratégies leur permettant de résister à la lyse par les molécules du complément, et une fois à l'intérieur des macrophages de résister à l'environnement hydrolytique du phagolysosome pour s'y multiplier.

5.5.1 Le système du complément

Dans le système sanguin de l'hôte, la première ligne de défense que les promastigotes devront affronter comprend les composantes du sérum, incluant les molécules du complément. Les promastigotes métacycliques de *L. major* sont recouverts de C3b. Les C3b se lient au facteur B. Ceci va attirer le facteur D qui va cliver le facteur B lié à C3b pour créer le C3bBb. Ce dernier possède une activité C3 convertase.

L'activité convertase du C3bBb génère le complexe C3bBb3b qui montre une activité C5 convertase. Lorsque la C5 convertase clive le C5 en C5a et C5b, ce dernier initie la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9 (Puentes, S.M. *et al.*1988). Cependant, des analyses ont démontré que ces promastigotes résistent à la lyse et ce, grâce au LPG. Cette molécule prévient la liaison du complexe C5b-9 dont la majorité est spontanément libérée de la surface du promastigote (Puentes, S.M. *et al.*1990). Les promastigotes de *L. donovani* évitent la formation du complexe C5b-9 à la membrane, en se liant à iC3b (Puentes, S.M. *et al.*1989). La génération de iC3b est initiée par la liaison de C3b soit au CR1, soit au cofacteur protéique membranaire MCP (membrane cofactor protein), soit au facteur H. Dans les trois cas, le facteur I clive le complexe pour en libérer iC3b et le fragment soluble C3f. La liaison des promastigotes à iC3b ne mène donc pas à la production de la C5 convertase (Roitt, I. *et al.*1989).

De plus, les promastigotes peuvent interagir avec d'autres protéines du sérum telle que la MBP (mannose binding protein). Elle active la voie lectine. Elle ressemble structuralement à C1q de la voie classique et mène à la formation de C3b par la C3 convertase (Green, P.J. *et al.*1994; Roitt, I. *et al.*1989).

Les promastigotes de *Leishmania* opsonisés par les molécules du complément sont internalisés soit par les récepteurs CR1 qui lient C3b, soit par les récepteurs CR3 qui lient iC3b ou soit par le récepteur mannose (Mosser, D.M. et Rosenthal, L.A.1993).

5.5.2 Inhibition de la biogénèse du phagolysosome

Une fois à l'intérieur du macrophage, les promastigotes de *Leishmania donovani* inhibent la fusion entre le phagosome et les endosomes/lysosomes grâce au LPG. Des promastigotes mutants *lpg2-KO*, incapables de synthétiser les unités répétitives du LPG, sont détectés par microscopie électronique dans des phagosomes étant capables de se fusionner avec des organelles endocytaires. Cependant, les promastigotes de type sauvage sont détectés uniquement dans des phagosomes précoces (Descoteaux A et

Desjardins M.1997) (Duque-de-Mello M *et al.* 1999). À l'aide de techniques d'immunofluorescence et de cytométrie en flux, il a été démontré que les phagosomes contenant des promastigotes de type sauvage ne possèdent pas les marqueurs de phagosomes tardifs Rab7 et LAMP1 (Scianimanico, S.*et al.*1999). Par contre, les marqueurs d'endosomes précoces tels que EEA1 et le récepteur de transferrin sont acquis par les phagosomes contenant les promastigotes de types sauvage (Scianimanico, S.*et al.*1999). De plus, il a été démontré que le LPG est transféré de la membrane du promastigote à la membrane plasmique du macrophage au site d'internalisation. Une fois inséré dans la membrane du phagosome, le LPG pourrait stabiliser la membrane et en altérer les propriétés fusogéniques (Tolson, D.L. *et al.*1990). Des formes tronquées de LPG ayant moins d'unités répétitives, sont cependant incapables de modifier les propriétés fusogéniques du phagosome (Miao, L. *et al.*1995). Des études de quantification de l'actine-F périphagosomale menées sur des phagosomes contenant des promastigotes de *L. donovani* ont démontré qu'il y avait une importante accumulation de l'actine-F autour des phagosomes contenant des promastigotes de types sauvage. Par contre, les phagosomes contenant les promastigotes *lpg2-KO* voyaient l'actine-F disparaître rapidement au début du processus de maturation du phagosome (Holm, A.*et al.*2001). Cette rétention des filaments d'actine-F pourrait constituer une barrière physique pour la fusion des phagosomes avec les endosomes (Allen, L.A. et Aderem, A.1995). Des études ont démontré que l'inhibition par le LPG de l'activation de PKC α aux phagosomes contenant des promastigotes de *L. donovani* serait à l'origine de cette rétention de l'actine-F (Allen, L.A. et Aderem, A.1995; Holm, A.*et al.*2001; Turco, S.J. et Descoteaux, A.1992). Bien que le rôle de PKC α dans la phagocytose ne soit pas encore bien compris, il a été établi que cette sérine/thréonine kinase phosphoryle les MARCKS (myristoylated alanine rich c kinase substrate), des protéines membranaires associées à la mobilité de l'actine (Rosen, A. *et al.*1990).

En inhibant le processus de maturation, le promastigote de *L. donovani*, peut débiter son processus de différenciation en amastigote. Les températures élevées et le pH plus acide du phagosome sont les signaux nécessaires pour initier la différenciation

(Zilberstein, D. et Shapira, M.1994). Les amastigotes pourront ensuite se diviser et sortir des macrophages pour aller infecter d'autres cellules avoisinantes.

Article

Phosphatidylinositol 3-kinases in complement receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes

Silvana Jananji and Albert Descoteaux*

INRS- Institut Armand Frappier and Centre for host-parasite interactions, Laval, QC,
Canada H7V 1B7

Running title: PI3-kinases and *L. donovani* promastigotes phagocytosis

*Corresponding author:
Dr Albert Descoteaux
INRS-Institut Armand-Frappier
531, boul. des Prairies
Laval, QC
Canada H7V 1B7
Phone: (450) 687-5010 ext. 4465
FAX: (450) 686-5301
albert.descoteaux@inrs-iaf.quebec.ca

Abstract

In phagocytic cells, phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) play a key role in phagocytosis and phagosome maturation. Phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes is characterized by an inhibition of phagolysosomal biogenesis, an event mediated by the virulence glycolipid lipophosphoglycan (LPG). In this study, we investigated the role of class I PI3K in the phagocytosis of complement-opsonized *L. donovani* promastigotes and the impact of LPG on class III PI3K activity. We show that class I PI3K and its product phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate were localized to nascent phagosomes containing either wild type promastigotes or the LPG-defective mutant *lpg2*-knockout. Internalization of wild type and *lpg2*-knockout promastigotes was inhibited by the PI3K inhibitor wortmannin and a dominant-negative mutant of the p85 α adaptor subunit. Furthermore, disruption of lipid rafts in macrophages inhibited generation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and promastigotes uptake. Finally, the class III PI3K product phosphatidylinositol 3-phosphate was detected on newly formed phagosomes containing either wild type or *lpg2*-knockout promastigotes. Collectively, our data provide evidence that synthesis of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate by class I PI3K is important for complement receptor-mediated internalization of *L. donovani* promastigotes. Furthermore, our results suggest that LPG-mediated phagosome maturation arrest is not the consequence of an impaired synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate by class III PI3K at the newly formed phagosome membrane.

Introduction

Promastigotes of the protozoan parasite of *Leishmania* are inoculated into mammalian hosts by infected sand flies and enter macrophages by phagocytosis through the CR, the mannose-fucose receptor, and p150,95 (Mosser, D.M. et Rosenthal, L.A.1993). Subsequent to their phagocytosis, *L. donovani* promastigotes subvert the phagosome maturation process at an early stage, preventing interactions with late endosomes and lysosomes (Desjardins, M. et Descoteaux, A.1997; Scianimanico, S.*et al.*1999). Hence, phagosomes containing *L. donovani* promastigotes rapidly acquire and lose the early endosomal marker EEA1, but fail to acquire the endosomal marker Rab7 (Scianimanico, S.*et al.*1999). This arrest in the maturation process is accompanied by a progressive accumulation of periphagosomal F-actin (Holm, A.*et al.*2001), which might interfere with vesicle trafficking to phagosomes containing *L. donovani* promastigotes. Genetic and biochemical evidence revealed that inhibition of phagolysosome biogenesis is mediated by the surface virulence glycolipid lipophosphoglycan (LPG) (Desjardins, M. et Descoteaux, A.1997; Holm, A.*et al.*2001; Scianimanico, S.*et al.*1999). In *L. donovani*, this molecule consists of a polymer of the repeating Gal β 1,4Man α PO₄ unit anchored into the parasite membrane via an unusual glycosyl phosphatidylinositol (Descoteaux, A. et Turco, S.J.1999; Descoteaux, A. et Turco, S.J.2002). The use of LPG-defective mutants confirmed that for *L. major* and *L. donovani*, LPG is a virulence factor required for the establishment of infection inside macrophages (McNeely, T.B. et Turco, S.J.1990; Spath, G.F. *et al.*2000; Turco, S.J. *et al.*2001).

During the infection process, LPG is rapidly transferred from the promastigote surface to the macrophage membrane at the immediate area of internalization of the parasite (Tolson, D.L.*et al.*1989). Insertion of LPG in lipid bilayer membranes stabilizes

the bilayer against the formation of an inverted hexagonal structure, resulting in reduced fusogenic properties (Miao, L.*et al.*1995). Presence of LPG in lipid bilayers also efficiently inhibits activity of protein kinase C (PKC) on the opposite side of the membrane (Giorgione, J.R. *et al.*1996) and impairs the recruitment to the membrane of molecules such as Rab7 and PKC- α (Holm, A.*et al.*2001; Scianimanico, S.*et al.*1999). Furthermore, LPG inhibits the acquisition of flotillin-1-enriched lipid rafts on the phagosome membrane, possibly by destabilizing these lipid microdomains (Dermine, J.F.*et al.*2001). Whether LPG affects the recruitment or activity of other signaling molecules involved in phagocytosis and phagosome maturation remains to be addressed.

Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) regulate distinct consecutive steps of phagocytosis. Class I PI3K are heterodimeric enzymes comprising an adaptor subunit (p85) and a catalytic subunit (p110) and are required for phagosome formation. Class III PI3K, also known as VPS34, regulates the phagosome maturation process (Fratti, R.A.*et al.*2001; Gillooly, D.J. *et al.*2001; Vieira, O.V.*et al.*2001). Consistently, their respective products, PI(3,4,5)P₃ and PI(3)P, accumulate transiently at different stages of this process (Ellson, C.D.*et al.*2001; Marshall, J.G.*et al.*2001; Vieira, O.V.*et al.*2001). During phagocytosis, transient accumulation of PI(3,4,5)P₃ to the nascent phagosome, provides docking/activation sites to recruit downstream effectors which bind this lipid via their pleckstrin homology (PH) domains (Balla, T. *et al.*2000; Marshall, J.G.*et al.*2001; Simonsen, A. et Stenmark, H.2001). One important role for class I PI3K may be to coordinate exocytic membrane insertion and pseudopod extension during the internalization process (Cox, D.*et al.*1999). In contrast, PI(3)P controls the early steps of phagosome maturation by regulating the distribution of proteins involved in early and late endosome sorting/trafficking such as the early endosomal autoantigen 1 (EEA1), and

the adaptor protein hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hrs) (Vieira, O.V.*et al.*2001; Vieira, O.V. *et al.*2004). EEA1 is an effector of the GTPase Rab5 (Simonsen, A. *et al.*1998), which is present on early endosomes and newly formed phagosome and plays a key role in phagosome maturation (Duclos, S.*et al.*2000).

In the present study, we investigated the role of class I PI3K in the uptake of *L. donovani* promastigotes. We also addressed the possible impact of LPG on the generation of PI(3,4,5)P₃ and PI(3)P during the phagocytic process.

Materials and Methods

Cell culture. The murine macrophage cell line RAW 264.7 was cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in complete medium [Dulbecco's modified Eagle's medium with glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT), 10mM HEPES pH 7.3 and antibiotics]. Wortmannin (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Canada, prepared in DMSO) and methyl- β -cyclodextrin (Sigma-Aldrich Canada Ltd, prepared in water) were used at a concentration of 100 nM and 10 mM, respectively. Lipid raft integrity was monitored with Alexafluor-594-coupled cholera toxin β (Molecular Probes, Eugene, OR).

Parasites. *Leishmania donovani* promastigotes (Sudanese strain 1S) were grown at 27°C in RPMI 1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 100 μ M adenine, 20 mM MES (pH 5.5), 5 μ M hemin, 3 μ M biopterin, 1 μ M biotin and antibiotics. In addition to the wild type (WT) line, we used the previously described isogenic LPG-defective mutant *lpg2*-knockout (KO) (Prive, C. et Descoteaux, A.2000). Green fluorescent protein (GFP)-expressing promastigotes (WT-GFP and *lpg2*-KO-GFP) (Holm, A.*et al.*2001) were grown in the presence of 50 μ g/ml G418.

Expression constructs. The HA- Δ p85 α expression construct was generated by inserting a HA- Δ p85 α cDNA derived from pGex Δ p85 α (Sakaue, H. *et al.*1995) (provided by Drs. W. Ogawa and M. Kasuga, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan) into the pcDNA3 expression vector (Life Technologies Inc). The PHAKT-GFP, PHAKT(R25C)-GFP, and FYVE-GFP expression constructs (Servant, G. *et al.*2000) were kindly provided by Dr. T. Balla (NIH, Bethesda, Maryland).

Transient transfections and immunofluorescence. RAW 264.7 macrophages were transfected with the PHAKT-GFP and PHAKT(R25C)-GFP expression constructs by electroporation. Briefly, 10^7 cells in complete medium were electroporated with 10 μ g of plasmid DNA with a Gene Pulser II apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA) at 0.3 kV and 950 μ FD, and were then plated on glass coverslips placed in wells of six-well plates. Twenty to 24 h following electroporation, macrophages were infected with C-opsonized *L. donovani* promastigotes for 15 min, and excess and non-ingested promastigotes were removed by 4 to 6 washes in cold PBS 1X prior to fixation in 2% formaldehyde and staining with Draq 5. For the HA- Δ p85 α expression construct, RAW 264.7 macrophages were transfected with Fugene 6 transfection reagent (Roche, Laval, Qc, Canada). The day before the experiment, 2×10^5 macrophages/well were plated onto coverslips placed in 24-well plates and were transfected with 1 μ g of plasmid DNA following the manufacturer's instructions and incubated for 8 to 12 h at 37°C. Macrophages were washed with complete medium and GFP-expressing promastigotes were added at a parasite-to-cell ratio of 20:1 for 30 min, and excess and non-ingested promastigotes were removed prior to fixation and permeabilisation. Expression of HA- Δ p85 α in transfected macrophages was detected with the mouse anti-HA monoclonal antibody HA.11 (BAbCo) and an Alexa-568 anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes). Endogenous p85 α was localized in macrophages infected with GFP-promastigotes using a mouse anti-p85 α monoclonal antibody (Upstate) and an Alexa-568 anti-mouse IgG (H+L) antibody. The FYVE-GFP expression construct was also transfected into macrophages with Fugene 6 transfection reagent as for the HA- Δ p85 α construct. Once more, 20 to 24 h following transfection, cells phagocytosed complement-opsonized parasites at a parasite to cell ratio of 20:1 for 7 minutes. Unbound parasites were subsequently washed with complete medium and cells were allowed to continue their phagocytosis for 30 min. Visualization of promastigotes was achieved by staining the cells with Draq 5 as it was done for macrophages expressing PHAKT-GFP.

Infections. Prior to infections, stationary phase promastigotes were incubated with 10% DBA/2 C5-deficient mouse serum (Charles River, St-Constant, Canada) for 1 h in a 37°C incubator. Parasites were then washed in Dulbecco's modified Eagle's medium before being resuspended in complete medium. For infections, complement-opsonized promastigotes were incubated with macrophages adhered to glass coverslips at a parasite-to-cell ratio of 20:1 for the indicated time. Infection levels were assessed by fluorescence microscopy. Briefly, macrophages were first incubated at room temperature for 20 min in phosphate-buffered saline with 0.1% Triton X-100, 1% bovine serum albumin, and 20% goat serum. Then, the macrophage cytoskeleton was stained with the F-actin binding Phalloidin Alexa-488 (Molecular Probes) and the macrophage and parasite nuclei were stained with 5 µM Draq 5 (Biostatus Limited, Leicestershire, UK). Coverslips were mounted on glass slides and the number of intracellular parasites was determined by fluorescence microscopy.

Confocal and fluorescence microscopy. Coverslips were mounted on glass slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) and sealed with transparent nail polish. For the phagocytosis experiments with cells expressing HA- $\Delta p85\alpha$, the slides were examined in an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000) under a 60 X oil immersion objective with the Metamorph acquisition software (Universal Imaging Corporation). For all the other experiments, cells were examined in an inverted microscope under a 60 X oil immersion objective and a Nikon Eclipse E800 microscope mounted on the Radiance 2000 confocal laser scanning system (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, CA). Images were analyzed with the LasersharpenNT acquisition software (BioRad, Richmond, CA).

Results

Active class I PI3K is recruited to early L. donovani promastigotes-containing phagosomes. We determined whether class I PI3K is present on nascent *L. donovani* promastigotes-containing phagosomes. Since the association of class I PI3K to the nascent phagosome is rapid and transient, phagocytosis of C-opsonized *L. donovani* promastigotes was allowed to proceed only for 15 min before staining with an antibody directed against the class I p85 α regulatory subunit. As shown in Figure 1, p85 α was present on early phagosomes containing both WT and *lpg2*-KO *L. donovani* promastigotes. Active class I PI3K generates PI(3,4,5)P₃ which specifically serves to recruit PH domain-containing proteins. Since the PH domain of AKT protein kinase binds with high affinity to PI(3,4,5)P₃ (Franke, T.F. *et al.*1997; Klippel, A. *et al.*1996), we used a PHAKT-GFP fusion protein as a probe to detect these phospholipids on *L. donovani* promastigote-containing phagosomes. As shown in Figure 2, PHAKT-GFP was recruited to early (15 min) phagosomes containing both WT and *lpg2*-KO *L. donovani* promastigotes. We did not detect PHAKT-GFP at later time points (data not shown). The point mutant of PHAKT(R25C)-GFP is unable to translocate to membranes in response to PI3K activation (Isakoff, S.J. *et al.*1998). We used it as a control to show the specificity of PHAKT-GFP recruitment to *L. donovani* promastigote-containing phagosomes (Fig. 2). These data indicate that class I PI3K present on early *L. donovani* promastigote-containing phagosomes is active. Moreover, activity of class I PI3K was not affected by LPG or other members of the phosphoglycan family.

Class I PI3K plays a role in the phagocytosis of L. donovani promastigotes. To determine whether class I PI3K plays a role in the phagocytosis of C-opsonized *L. donovani* promastigotes, we took two distinct approaches. First, we incubated macrophages in the absence or the presence of 100 nM wortmannin (a PI3K inhibitor) for

1 h prior to the addition of C-opsonized WT and *lpg2*-KO promastigotes. As shown in Figure 3B, wortmannin decreased the uptake of complement-opsonized WT and *lpg2*-KO *L. donovani* promastigotes by 60% and 22%, respectively. This reduction in uptake was not the consequence of a reduced attachment of promastigotes to the macrophages (not shown). Because wortmannin displays little selectivity within the various PI3K classes, we took a genetic approach to inhibit class I PI3K. This was achieved by expressing a HA-tagged deletion mutant of the p85 α subunit in RAW 264.7 macrophages. This Δ p85 α mutant, in which the p110 binding site was deleted, is a dominant-negative mutant of the p85 α adaptor subunit (Hara, K. *et al.*1994). As shown in Figure 4B, expression of HA- Δ p85 α inhibited the uptake of both WT and *lpg2*-KO *L. donovani* promastigotes by 65% and 62%, respectively. These results suggest that class I PI3K plays an important role in the phagocytosis of C-opsonized *L. donovani* promastigotes.

Intact lipid rafts are required for phagocytosis and for the generation of PI(3,4,5)P₃ at L. donovani promastigote-containing phagosomes. Several signaling molecules have been identified in lipid rafts including PI3K (Liu, J.*et al.*1997; Liu, P.*et al.*1996) and phosphoinositides (Hope, H.R. *et al.* Pike, L.J.1996). To assess whether intact lipid rafts are required for the activity of class I PI3K in the context of *L. donovani* promastigotes infection, we investigated the impact of cholesterol depletion on promastigote uptake and on the recruitment of PHAKT-GFP to phagosomes. Cholesterol depletion, which disturbs lipid rafts integrity, was achieved using 10 mM methyl- β -cyclodextrin (Kilsdonk, E.P. *et al.*1995). We assessed the efficacy of this treatment on lipid raft integrity by confocal microscopy following labelling of macrophages with Alexa594-cholera toxin β which binds to ganglioside GM1 (Kilsdonk, E.P.*et al.*1995). As shown in Figure 5A, distribution of ganglioside GM1 was punctated in control macrophages. In contrast, ganglioside GM1 was evenly distributed in the cellular membrane after

cholesterol extraction, indicating disruption of lipid rafts (Fig. 5B) (Orlandi, P.A. et Fishman, P.H.1998). Infection of methyl- β -cyclodextrin-treated macrophages revealed that cholesterol extraction inhibited the uptake of both WT and *lpg2*-KO C-opsonized promastigotes by 72% and 64%, respectively (Fig. 5C). Disruption of lipid rafts integrity also inhibited the generation of PI(3,4,5)P₃ at the site of internalization of both WT and *lpg2*-KO promastigotes, as illustrated by the absence of PHAKT-GFP recruitment at the nascent phagosome (Fig. 6). These data show that integrity of lipid rafts is essential for the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes and for the activity of class I PI3K during this process.

Class III PI3K generates PI(3)P at the membrane of phagosomes containing L. donovani promastigotes. Once the phagosome is formed, class III PI3K generates PI(3)P, which plays a key role in the early events of phagolysosomal biogenesis (Fratti, R.A.*et al.*2001; Gillooly, D.J.*et al.*2001; Vieira, O.V.*et al.*2001). Since *L. donovani* promastigotes inhibit phagosome maturation (Desjardins, M. et Descoteaux, A.1997; Scianimanico, S.*et al.*1999), we sought to determine whether this inhibition was related to an alteration of class III PI3K activity. To detect PI(3)P in phagosomal membranes we expressed the FYVE domain of EEA1 fused to GFP in RAW 264.7 macrophages. As shown in Figure 7, FYVE-GFP was recruited to phagosomes containing both WT and *lpg2*-KO C-opsonized promastigotes. These results indicate that class III PI3K is active in newly formed phagosomes containing *L. donovani* promastigotes. Furthermore, these results suggest that LPG-mediated inhibition of phagolysosomal biogenesis is not related to an abnormal generation of PI(3)P during the early stage of maturation.

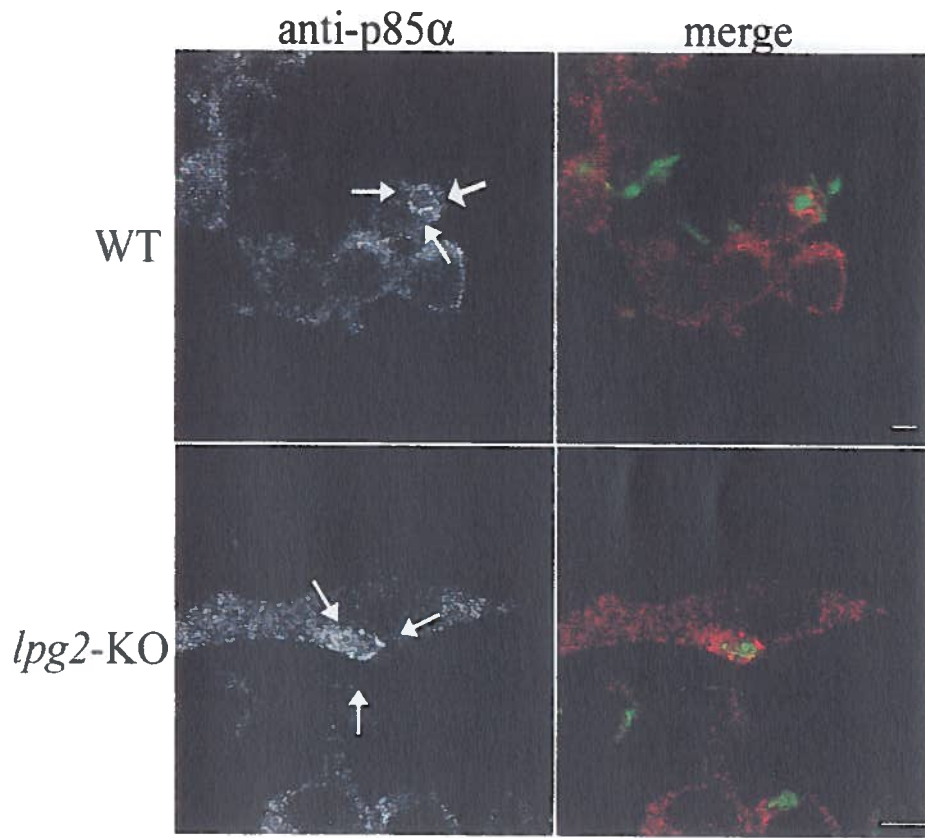


Figure 1. PI3K localizes at the nascent phagosome during phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Macrophages were infected for 15 min with either WT or *lpg2*-KO promastigotes and the presence of class I PI3-K was detected using an antibody against p85α. The images were taken by confocal microscopy with a 60X oil immersion objective. Bars, 5μm.

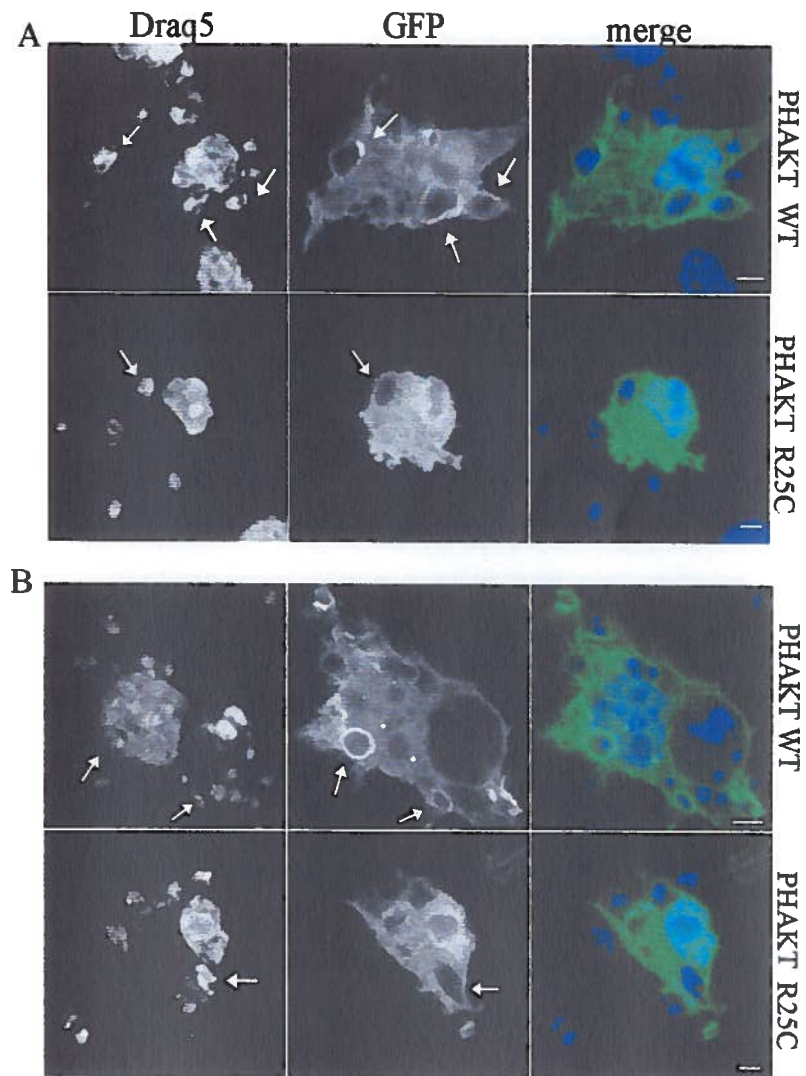


Figure 2. PI(3,4,5)P₃ is generated at the nascent phagosome during phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Macrophages were transfected with either PHAKT-GFP or PHAKT-GFP. Cells were then infected with either (A) WT promastigotes or (B) *lpg2*-KO promastigotes for 15 min. Arrows show phagosomes containing parasites. The images were taken by confocal microscopy with a 60X oil immersion objective. Bars, 5μm.

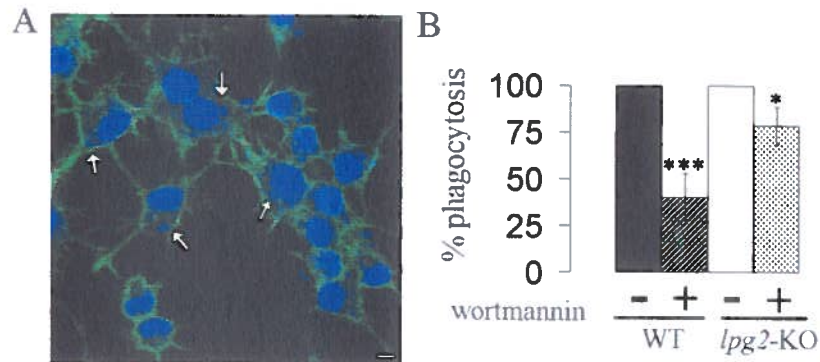


Figure 3. Wortmannin inhibits the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Macrophages were treated with 100 nM wortmannin or DMSO as a control for 1 h and were washed several times before infection with either WT or *lpg2*-KO promastigotes. (A) Nuclei were stained with Draq 5 (blue) and actin was stained with phalloidine alexa-488. Images were taken by confocal microscopy with a 60X oil immersed objective. Different fields of cells were randomly chosen. (B) The number of internalized parasites per 100 macrophages was visually counted with the Lazersharp acquisition software. Phagocytosis efficiency is expressed as the percent of the DMSO treated cells. All experiments were done in triplicata and similar results were obtained in three independent experiments. Bar, 5µm. *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ as compared with cells treated with DMSO.

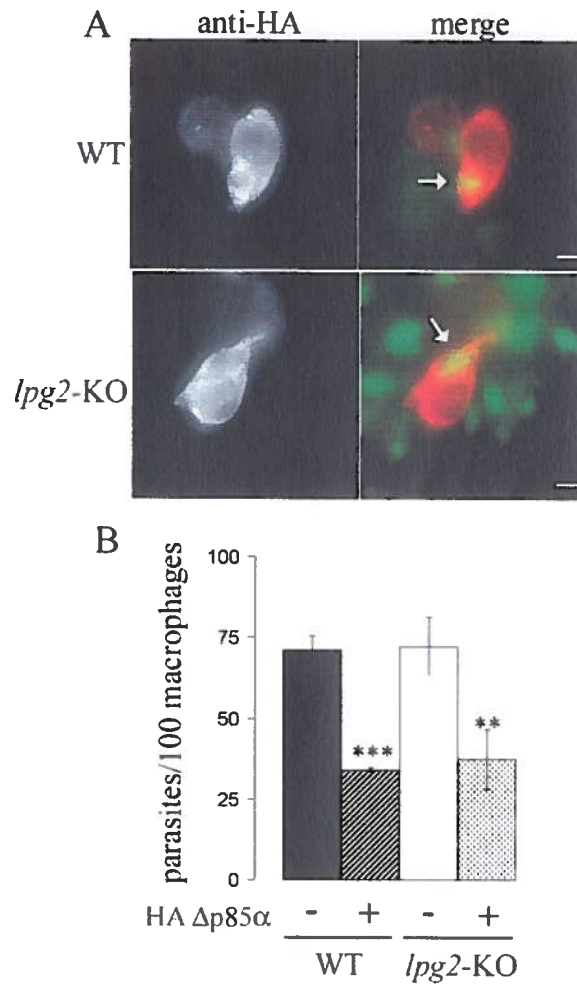


Figure 4. A dominant-negative p85 α inhibits the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Cells were transfected with the HA- $\Delta p85\alpha$ expression, and infected with either WT or *lpg2*-KO promastigotes for 30 min. (A) Internalized parasites show an accumulation of HA- $\Delta p85\alpha$ at the phagosome. (B) Phagocytosis was determined as the number of internalized parasites per 100 cells expressing HA- $\Delta p85\alpha$. Similar results were obtained in three independent experiments. Bars, 5 μ m. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ as compared with cells transfected without the vector.

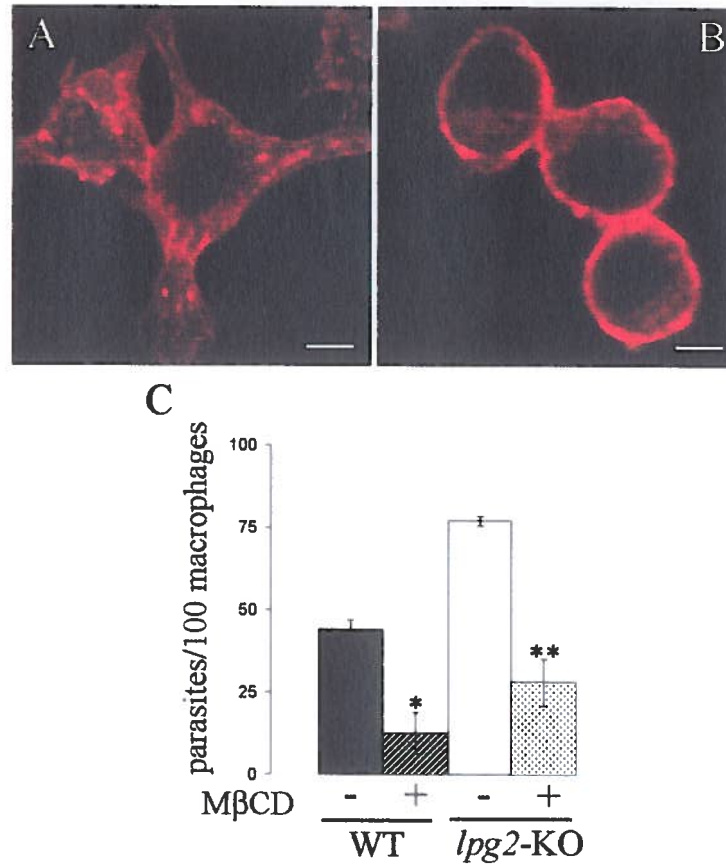


Figure 5. Cholesterol depletion inhibits the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Macrophages were treated with 10mM MβCD for 1 h and were washed several times prior to infection with either WT or *lpg2*-KO promastigotes for 30 min. To evaluate the integrity of lipid rafts, cells were treated with 2 μg/ml cholera toxinβ-Alexa 594 (red) which binds to the lipid raft marker ganglioside GM1. (A) Control cells. (B) Cells treated with MβCD. (C) Phagocytosis was determined as in Figure 4. Experiments were done in triplicata and similar results were obtained in three independent experiments. Bars, 5μm. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ as compared with cells treated with DMSO.

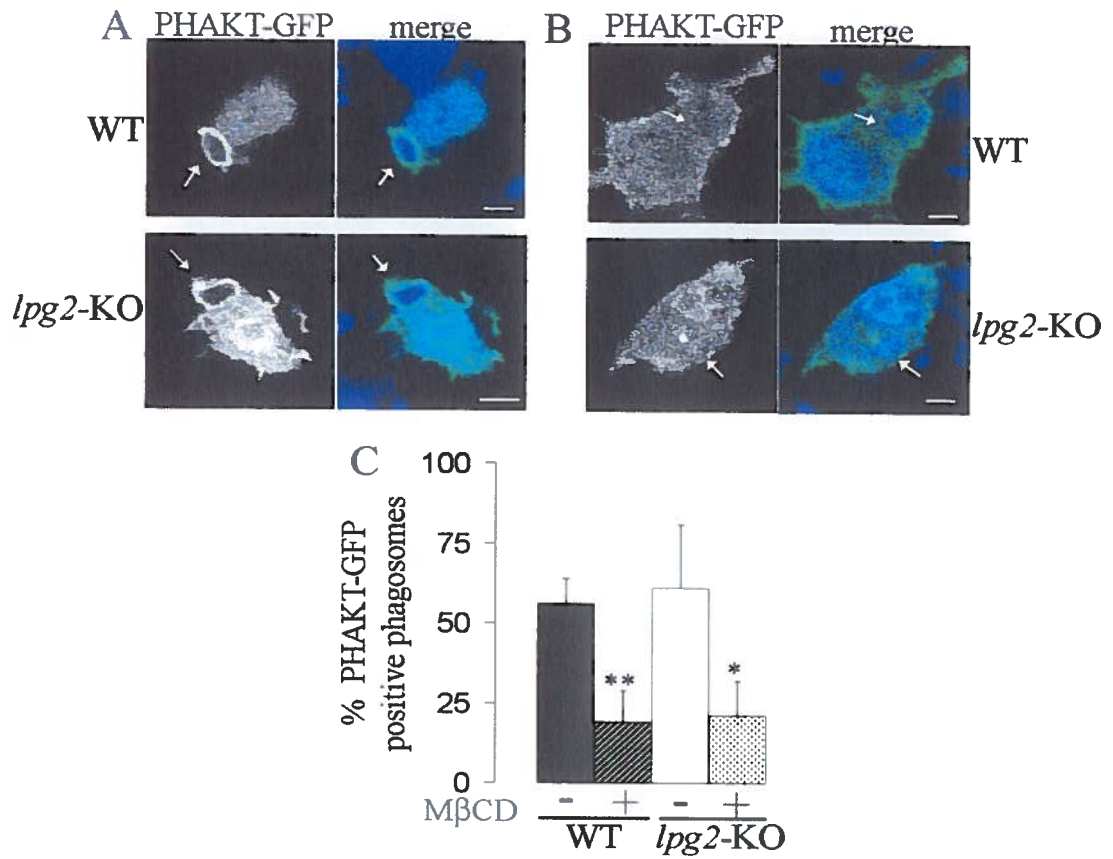


Figure 6. Cholesterol depletion inhibits the generation of PI(3,4,5)P₃ at the nascent phagosome. Macrophages were transfected with PHAKT-GFP and infected with either WT or *lpg2*-KO promastigotes for 15 min. Arrows show phagosomes containing parasites. (A) control cells and (B) cells treated with MβCD. (C) the number of PHAKT-GFP-positive phagosomes over the total number of internalized parasites. Similar results were obtained in more than three independent experiments. The images were taken by confocal microscopy with a 60X oil immersion objective. Bars, 5μm. ** p< 0.01 as compared with cells treated with DMSO.

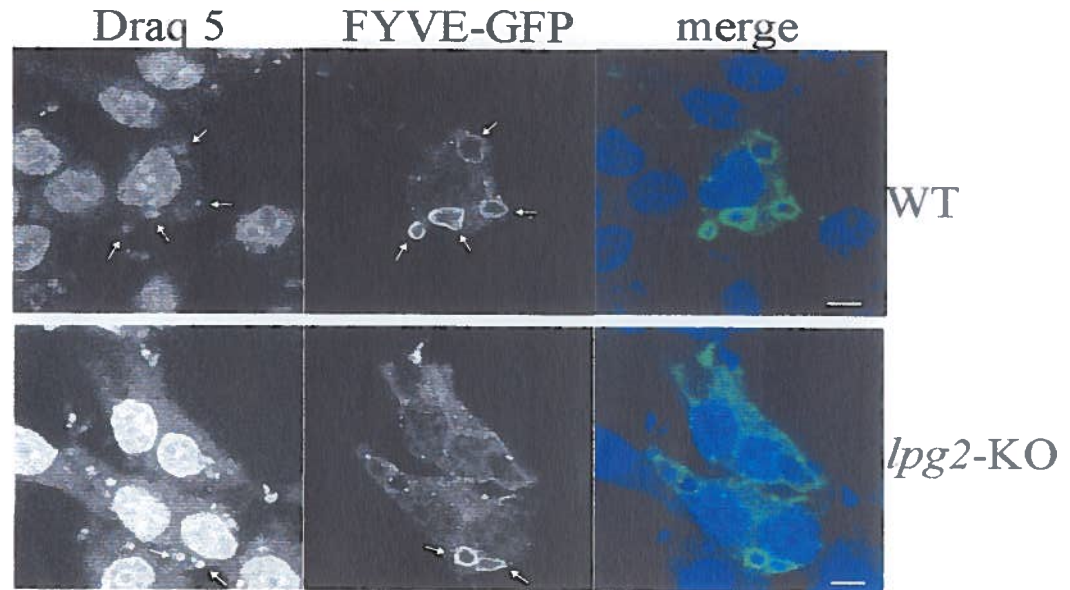


Figure 7. PI(3)P is generated at the early phagosome during phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Macrophages were transfected with FYVE-GFP and were infected with either WT or *lpg2*-KO promastigotes for 7 min followed by an additional 30 min after removal of excess parasites. The frequency of FYVE-GFP-positive phagosomes was similar for both WT- and *lpg2*-KO-containing phagosomes. The images were taken by confocal microscopy with a 60X oil immersion objective. Bars, 5 μ m. Similar results were obtained in two independent experiments.

Discussion

Following their internalization by macrophages, promastigotes of the protozoan parasite *Leishmania donovani* inhibit phagolysosome biogenesis by preventing interactions between the phagosome and late endosomes and lysosomes (Desjardins, M. et Descoteaux, A.1997; Scianimanico, S.*et al.*1999). This maturation arrest is dependent on the virulence glycolipid LPG, and is accompanied by an accumulation of periphagosomal F-actin (Holm, A.*et al.*2001). The precise mechanism by which LPG exerts this effect on phagosome biogenesis remains unknown. PI3Ks and their phosphoinositides products play a central role in phagocytosis and phagosome maturation (Fratti, R.A.*et al.*2001; Gillooly, D.J.*et al.*2001; Vieira, O.V.*et al.*2001). In this study, we investigated the role and activities of class I and class III PI3K during the phagocytosis of C-opsonized *L. donovani* promastigotes. We show that PI(3,4,5)P₃ generated by class I PI3K are important for CR-mediated internalization of *L. donovani* promastigotes. Moreover, our results suggest that LPG-mediated phagosome maturation arrest is not the consequence of an impaired synthesis of PI(3)P at the newly formed promastigote-containing phagosome.

Numerous studies have documented the role of class I PI3K during the engulfment of particles mediated by either FcγR or CR in phagocytic cells (Cox, D.*et al.*2000; Cox, D.*et al.*1999; Stephens, L. *et al.*2002; Vieira, O.V.*et al.*2001), as well as in the internalization of microbial pathogens by non-phagocytic cells (Booth, J.W. *et al.*2003; Ireton, K.*et al.*1996; Wilkowsky, S.E. *et al.*2001; Woolsey, A.M.*et al.*2003). Our data are consistent with class I PI3K playing an important role in the internalization of C-opsonized *L. donovani* promastigotes. Firstly, uptake is accompanied by the presence of class I PI3K at the nascent phagosome and the generation of PI(3,4,5)P₃, and

secondly, inhibition of class I PI3K with either wortmannin or expression of a dominant-negative mutant of p85 blocked the internalization of *L. donovani* promastigotes. The *L. donovani* surface glycolipid LPG plays an important role in the interaction between the parasite and the macrophage (Descoteaux, A. et Turco, S.J.1999; Descoteaux, A. et Turco, S.J.2002), including the evasion of ERK1/2 activation and the inhibition of phagolysosome biogenesis (Desjardins, M. et Descoteaux, A.1997; Prive, C. et Descoteaux, A.2000). Our data using the *lpg2*-KO mutant indicated that LPG had no impact on the recruitment or activity of class I PI3K during the internalization process.

Little is known concerning the role of lipid rafts or other cholesterol-enriched domains in CR-mediated phagocytosis. While investigating the role of cholesterol in the uptake of *Mycobacterium bovis* BCG, Gatfield and Pieters showed that the requirement for cholesterol in the internalization of microorganisms is selective (Gatfield, J. et Pieters, J.2000). Cholesterol depletion inhibited the phagocytosis of *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*, but had no effect on the uptake of *E. coli*, *Yersinia*, *Salmonella*, and *Lactobacillus*. Although uptake of *M. bovis* BCG is mediated to some extent by CR3, they showed that cholesterol is not required for CR3 function in general. Rather, *M. bovis* BCG binds cholesterol with high affinity, indicating the presence of a cholesterol-binding site at the mycobacterial cell surface (Gatfield, J. et Pieters, J.2000). These binding sites may possibly interact directly with cholesterol-rich domains present in the macrophage membrane. Alternatively, these domains may have an important role in the signaling events leading to phagocytosis. This possibility is consistent with our data showing that cholesterol is required for the generation of PI(3,4,5)P₃ at the phagosomal membrane and for the uptake of C-opsonized *L. donovani* promastigotes. These findings are in agreement with the current view that cholesterol-rich domains may recruit signaling effectors such as class I PI3K required for the internalization process (Anderson, R.G.1998; Liu, J.*et al.*1997; Liu, P.*et al.*1996; Zajchowski, L.D. et Robbins,

S.M.2002). A recent study showed that cholesterol is not required for binding of serum-opsonized *L. donovani* promastigotes to macrophages (Pucadyil, T.J.*et al.*2004). The authors of this study did not however determine whether internalization *per se* of the parasites was affected by cholesterol depletion.

A key step in the phagosome maturation process is the generation of PI(3)P by class III PI3K at the newly formed phagosome (Ellson, C.D.*et al.*2001; Vieira, O.V.*et al.*2001). This phosphoinositide is a ligand for proteins bearing either a FYVE or a PX domain, such as EEA1 and Hrs, both of which participate in the phagosome maturation process (Vieira, O.V.*et al.*2001; Vieira, O.V.*et al.*2004). EEA1 is a downstream effector of Rab5 (Simonsen, A.*et al.*1998), which regulates the interactions between the newly formed phagosome and early endosomes (Duclos, S.*et al.*2000). Using a FYVE-GFP construct, we showed that levels of PI(3)P are comparable in phagosomes containing WT and *lpg2*-KO promastigotes. This observation suggests that the early stage of the phagosome maturation process is not affected by LPG. This is also in agreement with our previous findings that phagosomes containing either WT or *lpg2*-KO promastigotes acquire and lose early the endocytic markers EEA1 and transferrin receptor, an indication that *L. donovani* promastigote-containing phagosomes are able to mature beyond the early endosome stage (Scianimanico, S.*et al.*1999). This is clearly in contrast with the block in phagosomal maturation by *Mycobacterium tuberculosis*, which is mediated by the inhibition of class III PI3K activity and the subsequent recruitment of EEA1 by the mycobacterial toxin lipoarabinomannan (Fratti, R.A.*et al.*2001; Fratti, R.A. *et al.*2003; Vergne, I. *et al.*2004).

In summary, we provide new information on the role of phosphoinositides during the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Class I PI3K activity is an important event in the internalization of C-opsonized *L. donovani* promastigotes by macrophages.

Moreover, cholesterol is required for the generation of PI(3,4,5)₃ and the uptake of *L. donovani* promastigotes. Finally, inhibition of phagolysosome biogenesis by LPG is not a consequence an impaired generation of PI(3)P at the phagosome membrane.

Acknowledgements

We thank Drs. W. Ogawa and M. Kasuga (Kobe University School of Medecine, Kobe, Japan) for providing the pGexΔp85α construct and Dr. T. Balla (NIH, Bethesda, Maryland) for providing the PHAKT-GFP, PHAKT(R25C)-GFP, and FYVE-GFP expression constructs. We are grateful to Marcel Desrosiers for assistance with confocal microscopy. This work was funded by grant MOP-57691 from the Canadian Institutes of Health Research and by a FQRNT Regroupement stratégique grant (Centre for host-parasite interactions). AD is a chercheur-boursier of the Fonds de la recherche en santé du Québec and the holder of a Canada Research Chair.

References

1. **Anderson, R. G.** 1998. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**:199-225.
2. **Balla, T., T. Bondeva, and P. Varnai.** 2000. How accurately can we image inositol lipids in living cells? *Trends Pharmacol Sci* **21**:238-41.
3. **Booth, J. W., D. Telio, E. H. Liao, S. E. McCaw, T. Matsuo, S. Grinstein, and S. D. Gray-Owen.** 2003. Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem* **278**:14037-45.
4. **Cox, D., D. J. Lee, B. M. Dale, J. Calafat, and S. Greenberg.** 2000. A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:680-5.
5. **Cox, D., C. C. Tseng, G. Bjekic, and S. Greenberg.** 1999. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem* **274**:1240-7.
6. **Dermine, J. F., S. Duclos, J. Garin, F. St-Louis, S. Rea, R. G. Parton, and M. Desjardins.** 2001. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* **276**:18507-12.
7. **Descoteaux, A., and S. J. Turco.** 2002. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect* **4**:975-81.
8. **Descoteaux, A., and S. J. Turco.** 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1455**:341-52.
9. **Desjardins, M., and A. Descoteaux.** 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185**:2061-8.
10. **Duclos, S., R. Diez, J. Garin, B. Papadopolou, A. Descoteaux, H. Stenmark, and M. Desjardins.** 2000. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Sci* **113 Pt 19**:3531-41.
11. **Ellson, C. D., S. Gobert-Gosse, K. E. Anderson, K. Davidson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. W. Thuring, M. A. Cooper, Z. Y. Lim, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, J. Coadwell, E. R. Chilvers, P. T. Hawkins, and L. R. Stephens.** 2001. PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol* **3**:679-82.
12. **Franke, T. F., D. R. Kaplan, L. C. Cantley, and A. Toker.** 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**:665-8.
13. **Fratti, R. A., J. M. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera, and V. Deretic.** 2001. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* **154**:631-44.

14. **Fratti, R. A., J. Chua, I. Vergne, and V. Deretic.** 2003. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5437-42.
15. **Gatfield, J., and J. Pieters.** 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* **288**:1647-50.
16. **Gillooly, D. J., A. Simonsen, and H. Stenmark.** 2001. Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem J* **355**:249-58.
17. **Giorgione, J. R., S. J. Turco, and R. M. Epand.** 1996. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11634-9.
18. **Hara, K., K. Yonezawa, H. Sakaue, A. Ando, K. Kotani, T. Kitamura, Y. Kitamura, H. Ueda, L. Stephens, T. R. Jackson, and et al.** 1994. 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7415-9.
19. **Holm, A., K. Tejle, K. E. Magnusson, A. Descoteaux, and B. Rasmusson.** 2001. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* **3**:439-47.
20. **Hope, H. R., and L. J. Pike.** 1996. Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* **7**:843-51.
21. **Ireton, K., B. Payrastre, H. Chap, W. Ogawa, H. Sakaue, M. Kasuga, and P. Cossart.** 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**:780-2.
22. **Isakoff, S. J., T. Cardozo, J. Andreev, Z. Li, K. M. Ferguson, R. Abagyan, M. A. Lemmon, A. Aronheim, and E. Y. Skolnik.** 1998. Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. *Embo J* **17**:5374-87.
23. **Kilsdonk, E. P., P. G. Yancey, G. W. Stoudt, F. W. Bangerter, W. J. Johnson, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat.** 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* **270**:17250-6.
24. **Klippel, A., C. Reinhard, W. M. Kavanaugh, G. Apell, M. A. Escobedo, and L. T. Williams.** 1996. Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol Cell Biol* **16**:4117-27.
25. **Liu, J., P. Oh, T. Horner, R. A. Rogers, and J. E. Schnitzer.** 1997. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J Biol Chem* **272**:7211-22.
26. **Liu, P., Y. Ying, Y. G. Ko, and R. G. Anderson.** 1996. Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem* **271**:10299-303.
27. **Marshall, J. G., J. W. Booth, V. Stambolic, T. Mak, T. Balla, A. D. Schreiber, T. Meyer, and S. Grinstein.** 2001. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol* **153**:1369-80.

28. **McNeely, T. B., and S. J. Turco.** 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol* **144**:2745-50.
29. **Miao, L., A. Stafford, S. Nir, S. J. Turco, T. D. Flanagan, and R. M. Epand.** 1995. Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry* **34**:4676-83.
30. **Mosser, D. M., and L. A. Rosenthal.** 1993. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol* **4**:315-22.
31. **Orlandi, P. A., and P. H. Fishman.** 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* **141**:905-15.
32. **Prive, C., and A. Descoteaux.** 2000. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol* **30**:2235-44.
33. **Pucadyil, T. J., P. Tewary, R. Madhubala, and A. Chattopadhyay.** 2004. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* **133**:145-52.
34. **Sakaue, H., K. Hara, T. Noguchi, T. Matozaki, K. Kotani, W. Ogawa, K. Yonezawa, M. D. Waterfield, and M. Kasuga.** 1995. Ras-independent and wortmannin-sensitive activation of glycogen synthase by insulin in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **270**:11304-9.
35. **Scianimanico, S., M. Desrosiers, J. F. Dermine, S. Meresse, A. Descoteaux, and M. Desjardins.** 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* **1**:19-32.
36. **Servant, G., O. D. Weiner, P. Herzmark, T. Balla, J. W. Sedat, and H. R. Bourne.** 2000. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**:1037-40.
37. **Simonsen, A., R. Lippe, S. Christoforidis, J. M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B. H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, and H. Stenmark.** 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**:494-8.
38. **Simonsen, A., and H. Stenmark.** 2001. PX domains: attracted by phosphoinositides. *Nat Cell Biol* **3**:E179-82.
39. **Spath, G. F., L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco, and S. M. Beverley.** 2000. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9258-63.
40. **Stephens, L., C. Ellson, and P. Hawkins.** 2002. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **14**:203-13.
41. **Tolson, D. L., S. J. Turco, R. P. Beecroft, and T. W. Pearson.** 1989. The immunochemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* **35**:109-18.

42. **Turco, S. J., G. F. Spath, and S. M. Beverley.** 2001. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol* **17**:223-6.
43. **Vergne, I., R. A. Fratti, P. J. Hill, J. Chua, J. Belisle, and V. Deretic.** 2004. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol Biol Cell* **15**:751-60.
44. **Vieira, O. V., R. J. Botelho, L. Rameh, S. M. Brachmann, T. Matsuo, H. W. Davidson, A. Schreiber, J. M. Backer, L. C. Cantley, and S. Grinstein.** 2001. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol* **155**:19-25.
45. **Vieira, O. V., R. E. Harrison, C. C. Scott, H. Stenmark, D. Alexander, J. Liu, J. Gruenberg, A. D. Schreiber, and S. Grinstein.** 2004. Acquisition of Hrs, an essential component of phagosomal maturation, is impaired by mycobacteria. *Mol Cell Biol* **24**:4593-604.
46. **Wilkowsky, S. E., M. A. Barbieri, P. Stahl, and E. L. Isola.** 2001. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res* **264**:211-8.
47. **Woolsey, A. M., L. Sunwoo, C. A. Petersen, S. M. Brachmann, L. C. Cantley, and B. A. Burleigh.** 2003. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci* **116**:3611-22.
48. **Zajchowski, L. D., and S. M. Robbins.** 2002. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem* **269**:737-52.

Discussion

Les macrophages sont des cellules indispensables au niveau de la défense immunitaire mais aussi lors du développement et de la régénération des tissus. Ce qui leur donne ces rôles primordiaux, c'est leur capacité à engloutir des particules plus grosses qu'eux-mêmes par un processus que l'on nomme phagocytose (May, R.C. et Machesky, L.M.2001). Ce phénomène est régit par l'interaction de particules avec une multitude de récepteurs à la surface même des macrophages, leur donnant ainsi un grand pouvoir de reconnaissance. S'ensuit une mobilisation du cytosquelette menant à l'extension de membranes autour de la particule à ingérer (Booth, J.W.*et al.*2001). Une fois engloutie, cette même particule se retrouve dans un compartiment, notamment le phagosome. Éventuellement, ce phagosome interagira de façon transitoire et séquentielle avec des endosomes et des lysosomes qui lui transféreront des protéases, des hydrolases ainsi qu'un milieu plus acide menant à la dégradation de la particule (Aderem, A. et Underhill, D.M.1999; Allen, L.A. et Aderem, A.1996; Desjardins, M.1995; Desjardins, M. *et al.*1994; Desjardins, M.*et al.*1994; Desjardins, M.*et al.*1997). Ces événements constituent le processus de maturation du phagosome.

La phagocytose est un mécanisme de défense exemplaire certes, mais non infaillible puisque plusieurs microorganismes s'en servent tel un cheval de Troie pour accéder à l'hôte sans se faire remarquer (Duclos, S. et Desjardins, M.2000). Tel est le cas pour le parasite intracellulaire *Leishmania donovani*, un protozoaire flagellé appartenant à la famille des Trypanosomatides, qui infectent la lignée des monocytes/macrophages chez les mammifères (Alexander, J. et Russell, D.G.1992; Alexander, J.*et al.*1999). Dans les régions tropicales et subtropicales, ces derniers sont la cause de la leishmaniose viscérale aussi connue sous le nom de kala-azar, une maladie pouvant être fatale si elle n'est pas traitée (Alexander, J.*et al.*1999). Afin de survivre à l'intérieur des macrophages, les promastigotes de *L. donovani* vont inhiber de façon transitoire la biogénèse du phagolysosome. C'est la molécule de surface lipophosphoglycan (LPG), la plus abondante à la surface du promastigote, qui en est responsable. En s'insérant dans la membrane du phagosome, le LPG altère les propriétés fusogéniques de cette dernière et empêche l'activation ainsi que le recrutement de protéines nécessaires à la maturation du phagosome (Descoteaux, A. et Turco, S.J.2002;

Desjardins, M. et Descoteaux, A.1997). Ceci a pu être découvert, entre autre, grâce à la forme mutante du promastigote de *Leishmania donovani*, soit la forme *lpg2-KO* (Descoteaux, A.*et al.*1995). N'ayant pas de LPG à sa surface, celui-ci est rapidement dégradé à l'intérieur du phagolysosome (Desjardins, M. et Descoteaux, A.1997; McNeely, T.B. et Turco, S.J.1990). Cette astuce de la part de *L. donovani* a donc suscité beaucoup d'attention de la part des scientifiques. Plusieurs recherches se concentrent sur les événements qui engendrent l'inhibition de la biogénèse du phagolysosome.

Certes, plusieurs étapes menant à l'entrée des parasites à l'intérieur des macrophages suivant leur interaction avec les récepteurs, demeurent encore dans l'ombre. C'est pourquoi nous avons dirigé nos recherches sur des facteurs pouvant avoir un rôle important dans l'internalisation du parasite. De plus, les molécules de LPG des promastigotes sont détectées à la membrane des macrophages, au site d'internalisation, de 5 à 10 minutes suivant le début de l'infection (Tolson, D.L.*et al.*1989). Or, les molécules de LPG se retrouvent insérées dans la membrane avant même la formation complète du phagosome. Voici pourquoi il nous intéressait d'observer si le LPG des promastigotes agissait à des étapes plus préliminaires afin d'inhiber la biogénèse du phagolysosome. À cette fin, nous avons utilisé les promastigotes déficients en LPG (*lpg2-KO*) en parallèle avec les promastigotes de type sauvage tout au long de nos expérimentations.

Nous avons d'abord porté notre attention sur la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K). Celle-ci est impliquée dans une multitude de fonctions cellulaires incluant le trafic membranaire, l'apoptose, la prolifération cellulaire et la phagocytose. Il existe trois grandes classes de PI3-kinases possédant chacune plusieurs isoenzymes (Vanhaesebroeck, B. et Waterfield, M.D.1999; Wymann, M.P.*et al.*2003). C'est la PI3-K de classe IA qui est la plus importante au niveau de l'internalisation via les récepteurs Fc et du complément, tandis que l'activité de la PI3-K de classe III est nécessaire à la maturation du phagosome et intervient au tout début de la maturation (Vieira, O.V.*et al.*2001). La PI3-K de classe IA est constituée de deux sous-unités, une sous-unité adaptatrice (p85) et une sous-unité catalytique (p110). Lors de l'activation des

récepteurs de phagocytose, le dimère p85/p110 est recruté à la membrane plasmique pour générer les PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ qui recruteront à leur tour d'autres protéines effectrices (Gillooly, D.J. *et al.*2001). La PI3-K de classe III est également un hétérodimère composé de la sous-unité catalytique nommée Vps34p et découverte pour la première fois chez la levure *S. saccharomyces*, ainsi que de la sérine/thréonine kinase Vps15p chez la levure et p150 chez les mammifères (Wymann, M.P. et Pirola, L.1998). Un important point d'intérêt sur la PI3-K est qu'elle est importante pour l'invasion de différents microorganismes tels que les bactéries *Listeria monocytogenes* (Ireton, K.*et al.*1996) qui infectent des cellules non-phagocytiques, *Neisseria gonorrhoeae* (Booth, J.W.*et al.*2003) et *Helicobacter pylori* (Kwok, T. *et al.*2002). Elle est également nécessaire à l'invasion du parasite *Trypanosoma cruzi* (Wilkowsky, S.E.*et al.*2001; Woolsey, A.M.*et al.*2003), un protozoaire appartenant à la même famille que *Leishmania*.

Nous avons alors entrepris la tâche d'investiguer le rôle de la PI3-Kinase dans la phagocytose des promastigotes de *Leishmania donovani* par les macrophages RAW 264.7 dans un contexte d'opsonisation au complément. Bien que les promastigotes de *Leishmania donovani* peuvent être ingérés sans opsonisation, *in vivo*, ceux-ci sont recouverts des molécules du complément C3b et iC3b (Mosser, D.M. et Rosenthal, L.A.1993; Puentes, S.M.*et al.*1989) pour se faire phagocyter via les récepteurs CR1 et CR3. Nous avons donc jugé pertinent de travailler avec des parasites opsonisés avec du sérum nous rapprochant ainsi de ce qui se passe *in vivo*. Cependant, nous avons utilisé du sérum de souris déficientes en C5 pour ainsi éviter la lyse du mutant *lpg2-KO*.

Dans le but de déterminer le rôle de la PI3-K dans l'internalisation des promastigotes de *L. donovani*, nous avons tout d'abord utilisé la wortmannin, un inhibiteur pharmacologique de la kinase qui agit en alkylant un résidu lysine du site de liaison à l'ATP présent sur la sous-unité catalytique p110 (Wymann, M.P. *et al.*1996). L'avantage de cet inhibiteur est que son action est irréversible et il agit à de faibles concentrations. Cette approche a souvent été employée lors de recherches portant sur l'implication de la PI3-K dans plusieurs processus cellulaires. Nos résultats démontrent

une diminution de la phagocytose pour les promastigotes de type sauvage (WT) et *lpg2-KO* lors du traitement des cellules avec la wortmannin. Cependant, l'entrée des promastigotes *lpg2-KO* semble être moins affectée par la présence de l'inhibiteur. Cette différence pourrait indiquer une variation au niveau de l'internalisation entre les promastigotes WT et *lpg2-KO*. Cependant, la spécificité de la wortmannin diminue lorsque sa concentration est augmentée (Stein, R.C.2001). Cette défaillance pourrait donc être la cause de la variabilité observée. De plus, cet inhibiteur ne pouvait nous permettre de distinguer l'implication des PI3-K de classe I entre celle des PI3-K de classe III n'étant pas spécifique à une seule classe de PI3-K. C'est pourquoi nous avons jugé nécessaire d'utiliser des approches additionnelles afin de soutenir ou infirmer les résultats obtenus lors de notre première expérience.

Pour les PI3-K de classe IA, il existe trois isoformes pour la sous-unité catalytique chez les mammifères, p110 α , p110 β et p110 δ codés par trois gènes distincts. Trois gènes codent pour les sous-unités p85 α , p85 β et p55 γ et quatre sous-unités adaptatrices supplémentaires sont générées par épissage alternatif (Vanhaesebroeck, B. et Waterfield, M.D.1999). Malgré la variété d'isoenzymes disponibles, ils ne sont pas tous requis lors de la phagocytose. Les isoenzymes p85 α et β (Vieira, O.V.*et al.*2001) de la sous-unité adaptatrice et l'isoenzyme p110 β (Leverrier, Y.*et al.*2003) de la sous-unité catalytique sont les plus importants lors de l'internalisation via les récepteurs Fc et du complément. C'est pourquoi nous avons entrepris d'observer plus spécifiquement le rôle de la sous-unité p85 α de la classe IA dans la phagocytose de *Leishmania*. La surexpression du mutant Δ p85 α cause une diminution significative de l'entrée des promastigotes WT semblable à celle observée avec le traitement à la wortmannin. Cependant, la phagocytose des promastigotes *lpg2-KO* s'en est trouvée beaucoup plus affectée que lors de la première expérience avec une diminution presque équivalente à celle obtenue pour les promastigotes de type sauvage. Le pourcentage de phagocytose résiduel pourrait être expliqué par la présence des autres isoenzymes encore intactes tels que p85 et p55 γ , tous deux étant exprimés chez les macrophages RAW 264.7 (Yu, W. *et al.*2000).

La prochaine étape de notre investigation se voulait être une approche nous permettant de visualiser l'implication de la PI3-Kinase de classe I lors de la phagocytose des promastigotes de *L. donovani*. À l'aide d'un anticorps spécifique à la sous-unité p85 α , nous avons pu observer le recrutement de la PI3-K aux phagosomes contenant des promastigotes de type sauvage autant que pour des phagosomes contenant des promastigotes déficients en LPG. Nous avons également réussi à localiser les produits de la PI3-K, les PI(3,4)P₂ et les PI(3,4,5)P₃ aux phagosomes à l'aide des constructions AKT-PH-GFP. Nous avons observé que le recrutement était aussi fréquent pour les parasites de type sauvage autant que pour les parasites *lpg2-KO*.

S. Scianimanico et son groupe ont observé que les phagosomes contenant des promastigotes de type sauvage possèdent le marqueur d'endosomes précoces EEA1 (Early Endosome Antigen 1) cependant, un faible pourcentage de ceux-ci réussissaient à acquérir le marqueur d'endosomes tardifs Rab 7 (Scianimanico, S.*et al.*1999). Le marqueur EEA1 possède le domaine FYVE, un domaine de liaison spécifique aux PI(3)P générés par la PI3-K de classe III. Ces phosphoinositides ainsi que la GTPase Rab5, mènent au recrutement de EEA1 aux phagosomes (Simonsen, A.*et al.*1998). Afin de supporter cette observation, nous avons observé la présence la PI3-K de classe III ainsi que des PI(3)P en surexprimant le domaine FYVE de EEA1 fusionné à la GFP. L'accumulation de la protéine de fusion aux phagosomes contenant des promastigotes de type sauvage et *lpg2-KO* démontre bien que les molécules de LPG agissent sur la maturation du phagosome à une étape subséquente à l'acquisition des marqueurs précoces de maturation.

Conjointement, nos résultats démontrent que les PI3-Kinase de classe I et III sont impliquées dans la phagocytose des promastigotes de *L. donovani* opsonisés au complément. De plus, la PI3-K de classe I semble être aussi importante dans l'internalisation des promastigotes déficients en LPG autant que pour celle des promastigotes de type sauvage. Il est donc clair que le LPG n'affecte ni le recrutement, ni l'activation des PI3-Kinases au phagosome.

Tout récemment, les radeaux lipidiques sont devenus le centre d'attention dans plusieurs domaines de recherche. Ces régions dynamiques que l'on retrouve à la membrane plasmique et sur les membranes endosomales, dans le RE et au Golgi où les protéines ancrées au GPI sont triées, démontrent des caractéristiques particulières (Helms, J.B. et Zurzolo, C.2004; Sarnataro, D. *et al.*2004). Celles-ci sont insolubles lorsque traitées avec des détergents tel que le Triton X-100, ont une faible densité et sont enrichies en cholestérol, sphingolipides, glycosphingolipides et en protéines ancrées par le GPI (Brown, D.A. et London, E.2000; Fivaz, M.*et al.*1999; Helms, J.B. et Zurzolo, C.2004; Hinchliffe, K. et Irvine, R.1997; Iwabuchi, K. *et al.*1998; Jacobson, K. et Dietrich, C.1999; Pralle, A.*et al.*2000; Sargiacomo, M.*et al.*1993; Simons, K. et Ikonen, E.1997; Zajchowski, L.D. et Robbins, S.M.2002). Ces microdomaines sont dynamiques puisqu'ils peuvent être internalisés de la membrane plasmique et être recyclés. En effet, les glycosphingolipides sont internalisés de la membrane plasmique par un mécanisme indépendant de la clathrine et plutôt relié aux caveolae. Subséquemment, les vésicules fusionnent avec les endosomes précoces pour être séparés en deux réservoirs distincts; un premier transporté au Golgi via les endosomes tardifs et un second recyclé à la membrane plasmique (Pagano, R.E. et Chen, C.S.1998; Sharma, D.K. *et al.*2003). Il existe une sous-population de radeaux lipidiques du nom de caveolae. Ces derniers se définissent par de petites invaginations en forme de flacon. Ils sont formés par la coalescence de petits radeaux lipidiques entraînée par l'oligomérisation de la caveoline-1 (Anderson, R.G.1998; Helms, J.B. et Zurzolo, C.2004; Rothberg, K.G.*et al.*1992).

Ces microdomaines servent une multitude de fonctions pour la cellule certes, mais sont aussi utiles pour l'infection de plusieurs microorganismes. Le pathogène intracellulaire *Mycobacterium bovis* BCG se lie au cholestérol avec beaucoup d'affinité et ne peut être internalisé par les macrophages lorsque ces derniers sont traités avec des agents qui perturbent le niveau de cholestérol (Gatfield, J. et Pieters, J.2000). L'adhésine FimH à la surface de la bactérie *E.coli* se lie au récepteur CD48, une protéine ancrée au GPI et présente dans les radeaux lipidiques du phagocyte (Shin, J.S. *et al.*2000). Des structures similaires aux caveolae ont été détectées dans les membranes entourant le

parasite *Plasmodium falciparum* (Olliaro, P. et Castelli, F.1997). C'est pourquoi nous avons trouvé pertinent de vérifier si les radeaux lipidiques sont également nécessaires à l'internalisation des promastigotes de *Leishmania donovani* opsonisés au complément. Nos résultats démontrent clairement que la déplétion en cholestérol par la M β CD diminue significativement l'entrée des parasites dans leurs cellules hôtes et ce, autant pour les promastigotes de type sauvage que pour les promastigotes *lpg2-KO*. Ce résultat va cependant à l'encontre des observations obtenues par Pucadyil et ses collègues. Ce dernier a démontré que la déplétion en cholestérol chez les macrophages n'affectait aucunement la phagocytose des promastigotes de *L. donovani* opsonisés au complément tandis que l'internalisation des parasites non-opsonisés en était significativement diminuée (Pucadyil, T.J.*et al.*2004). Nous pouvons expliquer cette divergence dans nos résultats par le fait que nous ayons utilisé des méthodes différentes pour arriver à nos conclusions. Ils ont utilisé des parasites marqués au tritium et à la FITC et l'efficacité d'infection a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation et à l'aide de cytométrie en flux. Nos analyses d'infection se sont faites au microscope confocal, l'actine des macrophages et les parasites étant marqués avec des fluorochromes. Cette technique nous permettait de différencier visuellement les parasites ingérés des parasites simplement liés aux macrophages. De plus, nous avons utilisé une souche différente de *L. donovani* ce qui pourrait également contribuer à la variation dans nos résultats.

Une observation additionnelle a attiré notre attention démontrant que la PI3-Kinase de classe I se localise aux caveolae dans des fibroblastes humains et des cellules endothéliales microvasculaires de poumons chez les rats (RLMVEC) (Liu, J.*et al.*1997; Liu, P.*et al.*1996). De plus, lors d'une autre étude, des phosphoinositides tels que phosphatidylinositol et les PtdIns(4,5)P₂ ont été isolés dans des fractions membranaires représentant les caveolae dans des cellules MDCK (Hope, H.R. et Pike, L.J.1996). Ceci nous a mené vers l'hypothèse qu'en absence de radeaux lipidiques intacts, la localisation de la PI3-Kinase serait affectée. Nous avons alors tenté de repérer AKT-PH aux phagosomes contenant des promastigotes chez des cellules déplétées en cholestérol. Le pourcentage de phagosomes positifs en AKT-PH-GFP était beaucoup plus petit lorsque les cellules avaient été traitées à la M β CD. L'absence des PI(3,4)P₂ et des PI(3,4,5)P₃

aux phagosomes démontre que la PI3-K de classe I n'est pas recrutée ou simplement qu'elle n'est pas activée à cet endroit. Puisque les macrophages RAW 264.7 possèdent des caveolae (Lei, M.G. et Morrison, D.C.2000) et que PI3-K s'y localise dans d'autres lignées cellulaires, il serait logique que la distribution de la kinase soit affectée en l'absence de ces microdomaines. De plus, d'autres facteurs nécessaires au recrutement de la PI3-K, tels que les kinases de la famille Src (Davy, A. *et al.*2000; Furuchi, T. et Anderson, R.G.1998; Liu, J.*et al.*1997; Robbins, S.M. *et al.*1995) et Shc (Teixeira, A. *et al.*1999) sont également enrichis dans les radeaux lipidiques. La protéine activatrice Ras se retrouve aussi dans les radeaux lipidiques et donc la désorganisation de ceux-ci par la déplétion en cholestérol affecterait aussi la distribution de la protéine Ras (Iwabuchi, K.*et al.*1998). Il aurait été pertinent d'élucider si la désorganisation des radeaux lipidiques affecte spécifiquement le recrutement de la PI3-Kinase ou simplement son activation au phagosome en détectant directement sa présence avec l'anticorps dirigé contre la sous-unité p85 α . De plus, nous ne savons pas si toutes les classes de PI3-K et toutes les isoenzymes sont partie intégrale des radeaux lipidiques.

La diminution de phagocytose observée lors de la désorganisation des radeaux lipidiques (WT :72%; *lpg2-KO* :64%) est plus importante que celle observée lors de l'inhibition de la PI3-K soit par la wortmannin (WT :60%; *lpg2-KO* :22%) ou lors de la surexpression du dominant-négatif (WT :52%; *lpg2-KO* :49%). Ceci peut être expliqué par le simple fait qu'en perturbant l'intégrité des radeaux lipidiques, on affecte plusieurs voies de signalisation simultanément incluant celle de la PI3-K. Donc, l'effet de la M β CD sur l'internalisation de *L. donovani* n'est pas causé uniquement par l'absence de la PI3-K puisque plusieurs autres facteurs impliqués dans la phagocytose tels que l'actine-G monomérique (Chang, W.J. *et al.*1994; Lisanti, M.P. *et al.*1994; Lisanti, M.P. *et al.*1994; Smart, E.J.*et al.*1995) la myosine, PKC α et les GTPases Rap se retrouvent aussi dans ces microdomaines. Comme témoin, il aurait été intéressant de rajouter du cholestérol aux cellules et d'observer si le nombre de phagosomes positifs en AKT-PH augmente.

Or, ces expériences nous ont permis de démontrer que les radeaux lipidiques, incluant les caveolae sont donc importants pour l'internalisation des promastigotes de *Leishmania donovani* opsonisés au complément

Conclusion

En somme, nous avons démontré que la PI3-K, plus spécifiquement de classe IA, est nécessaire à l'internalisation des promastigotes de *Leishmania donovani* opsonisés au complément. Nous avons également pu observer une accumulation de la PI3-Kinase de classe I sur les phagosomes 15 minutes suivant le début de la phagocytose. Ensuite, la localisation aux phagosomes des PI3-K de classe III lors de la phagocytose des promastigotes de type sauvage nous a permis de supporter les observations que l'inhibition de la maturation se réalise subséquentement à l'acquisition des marqueurs d'endosomes précoces (Scianimanico, S.*et al.*1999). De plus, les radeaux lipidiques se sont aussi avérés importants pour l'entrée des promastigotes dans les macrophages. La perturbation de ces microdomaines affecte donc soit le recrutement de la PI3-K de classe I ou son activation. Bien que ces microdomaines soient importants pour l'internalisation des promastigotes, leur rôle durant l'inhibition de la maturation du phagosome par *Leishmania* reste ambigu puisque Dermine et collègues ont démontré que ce protozoaire inhibe l'acquisition d'un marqueur de radeaux lipidique, la flotilline-1 (Dermine, J.F.*et al.*2001). Puisque la molécule de LPG des promastigotes s'insère dans la membrane du phagosome (Tolson, D.L.*et al.*1990) et que celle-ci possède une ancre GPI, il est possible que cette dernière agisse sur les radeaux lipidiques (Descoteaux, A. et Turco, S.J.1999). Il serait intéressant d'étudier ce qu'il se passe durant la maturation du phagosome en utilisant d'autres marqueurs de radeaux lipidiques tels que les caveolines, d'autres protéines ancrées au GPI et les gangliosides GM1 (Zajchowski, L.D. et Robbins, S.M.2002).

Tout au long de nos expérimentations, les promastigotes de type sauvage se sont comportés de la même façon que les promastigotes *lpg2-KO*. Ceci nous indique alors que bien que les molécules de LPG s'insèrent dans la membrane du phagosome naissant (Tolson, D.L.*et al.*1990), ils n'affectent pas la biogénèse du phagolysosome au niveau de la PI3-Kinase de classe I et III. De plus, leur présence ne change aucunement le besoin de radeaux lipidiques intacts pour l'internalisation des promastigotes de *Leishmania donovani*.

Suite à la première infection, ce sont les amastigotes qui sont libérés des macrophages et vont infecter les cellules avoisinantes. Afin d'approfondir notre projet, il serait intéressant d'investiguer si la forme amastigote de *Leishmania* requiert, de la même façon que la forme promastigote, la PI3-K ainsi que les radeaux lipidiques pour son entrée dans les macrophages.

L'actine-F et la protéine kinase $C\alpha$ (PKC α) sont deux facteurs sur lesquels le LPG agit afin d'empêcher la maturation du phagosome. L'actine-F périphagosomale s'accumule autour des phagosomes contenant des promastigotes de type sauvage (Holm, A. *et al.* 2001) comparativement aux phagosomes contenant des promastigotes *lpg2-KO*. De plus, il a été démontré que le recrutement et l'activation de PKC α étaient inhibés par le LPG des promastigotes (Descoteaux, A. *et al.* 1992; McNeely, T.B. et Turco, S.J. 1987). Lors de la phagocytose via les récepteurs Fc, la dépolymérisation des filaments d'actine coïncide avec la disparition des PI(4,5)P₂ autour du phagosome (Botelho, R.J. *et al.* 2000). Ces phosphoinositides sont transformés soit en PI(3,4,5)P₃ par la PI3-Kinase, soit en diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C (PLC) (Botelho, R.J. *et al.* 2000; Greenberg, S. 2001). Le DAG est un activateur de PKC α (Kishimoto, A. *et al.* 1980). Il serait alors intéressant de vérifier si la PLC est activée ou recrutée aux phagosomes contenant des promastigotes de types sauvage versus des phagosomes contenant des promastigotes. L'inactivation de la PLC pourrait expliquer en partie l'inhibition de la dépolymérisation des filaments d'actine ainsi que l'inhibition de la PKC α .

Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Albert Descoteaux qui m'a donné la chance de faire ma maîtrise au sein de son laboratoire. J'aimerais aussi remercier tous les membres de mon laboratoire passés et présents qui m'ont aidé de plusieurs façons tout au long de mes années de maîtrise. J'aimerais remercier tout spécialement Robert Lodge pour ses conseils indispensables qui ont fait de mon projet une réussite. Un gros merci à Marcel Desrosiers pour son expertise en microscopie à fluorescence et confocale.

Derrière chaque étudiant, il y a une famille... Merci beaucoup à Papa, Maman et Katou pour votre support, vos précieux conseils, votre patience et surtout d'avoir cru en moi. Il n'y a malheureusement pas de diplôme assez prestigieux pour souligner ce que vous avez fait pour moi. Sachez que j'en suis énormément reconnaissante. Merci à José Bernard pour m'avoir appuyé sans hésitation pendant tout ce temps.

Liste des références

1. ADEREM, A. et D.M. UNDERHILL. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol, vol. 17. no., p. 593-623.
2. ALEXANDER, J. et D.G. RUSSELL. 1992. The interaction of Leishmania species with macrophages. Adv Parasitol, vol. 31. no., p. 175-254.
3. ALEXANDER, J., A.R. SATOSKAR et D.G. RUSSELL. 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. J Cell Sci, vol. 112 Pt 18. no., p. 2993-3002.
4. ALEXOPOULOU, L., A.C. HOLT, R. MEDZHITOV et R.A. FLAVELL. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature, vol. 413. no. 6857, p. 732-738.
5. ALLEN, L.A. et A. ADEREM. 1995. Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts. Embo J, vol. 14. no. 6, p. 1109-1121.
6. ALLEN, L.A. et A. ADEREM. 1996. Mechanisms of phagocytosis. Curr Opin Immunol, vol. 8. no. 1, p. 36-40.
7. ALLEN, L.A. et A. ADEREM. 1996. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. J Exp Med, vol. 184. no. 2, p. 627-637.
8. ANDERSON, R.G. 1998. The caveolae membrane system. Annu Rev Biochem, vol. 67. no., p. 199-225.
9. APOSTOLOPOULOS, V. et I.F. MCKENZIE. 2001. Role of the mannose receptor in the immune response. Curr Mol Med, vol. 1. no. 4, p. 469-474.
10. ARAKI, N., M.T. JOHNSON et J.A. SWANSON. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. J Cell Biol, vol. 135. no. 5, p. 1249-1260.

11. ARBER, S., F.A. BARBAYANNIS, H. HANSER, C. SCHNEIDER, C.A. STANYON, O. BERNARD et P. CARONI. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. Nature, vol. 393. no. 6687, p. 805-809.
12. ARCARO, A., M.J. ZVELEBIL, C. WALLASCH, A. ULLRICH, M.D. WATERFIELD et J. DOMIN. 2000. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. Mol Cell Biol, vol. 20. no. 11, p. 3817-3830.
13. BAJNO, L., X.R. PENG, A.D. SCHREIBER, H.P. MOORE, W.S. TRIMBLE et S. GRINSTEIN. 2000. Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. J Cell Biol, vol. 149. no. 3, p. 697-706.
14. BALLA, T., T. BONDEVA et P. VARNAI. 2000. How accurately can we image inositol lipids in living cells? Trends Pharmacol Sci, vol. 21. no. 7, p. 238-241.
15. BAMBURG, J.R. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. Annu Rev Cell Dev Biol, vol. 15. no., p. 185-230.
16. BAMBURG, J.R., A. MCGOUGH et S. ONO. 1999. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. Trends Cell Biol, vol. 9. no. 9, p. 364-370.
17. BLANCHONIN, L. et T.D. POLLARD. 1999. Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. J Biol Chem, vol. 274. no. 22, p. 15538-15546.
18. BOOTH, J.W., D. TELIO, E.H. LIAO, S.E. MCCAWE, T. MATSUO, S. GRINSTEIN et S.D. GRAY-OWEN. 2003. Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of Neisseria gonorrhoeae. J Biol Chem, vol. 278. no. 16, p. 14037-14045.
19. BOOTH, J.W., W.S. TRIMBLE et S. GRINSTEIN. 2001. Membrane dynamics in phagocytosis. Semin Immunol, vol. 13. no. 6, p. 357-364.

20. BOTELHO, R.J., M. TERUEL, R. DIERCKMAN, R. ANDERSON, A. WELLS, J.D. YORK, T. MEYER et S. GRINSTEIN. 2000. Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. J Cell Biol, vol. 151. no. 7, p. 1353-1368.
21. BROCK, C., M. SCHAEFER, H.P. REUSCH, C. CZUPALLA, M. MICHALKE, K. SPICHER, G. SCHULTZ et B. NURNBERG. 2003. Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. J Cell Biol, vol. 160. no. 1, p. 89-99.
22. BROWN, D.A. et E. LONDON. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. J Biol Chem, vol. 275. no. 23, p. 17221-17224.
23. BROWN, D.A. et J.K. ROSE. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell, vol. 68. no. 3, p. 533-544.
24. BROWN, E.J. 1991. Complement receptors and phagocytosis. Curr Opin Immunol, vol. 3. no. 1, p. 76-82.
25. BROWN, W.J., D.B. DEWALD, S.D. EMR, H. PLUTNER et W.E. BALCH. 1995. Role for phosphatidylinositol 3-kinase in the sorting and transport of newly synthesized lysosomal enzymes in mammalian cells. J Cell Biol, vol. 130. no. 4, p. 781-796.
26. BRUMELL, J.H. et S. GRINSTEIN. 2003. Role of lipid-mediated signal transduction in bacterial internalization. Cell Microbiol, vol. 5. no. 5, p. 287-297.
27. CARLIER, M.F., V. LAURENT, J. SANTOLINI, R. MELKI, D. DIDRY, G.X. XIA, Y. HONG, N.H. CHUA et D. PANTALONI. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. J Cell Biol, vol. 136. no. 6, p. 1307-1322.
28. CARON, E. et A. HALL. 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. Science, vol. 282. no. 5394, p. 1717-1721.

29. CARON, E., A.J. SELF et A. HALL. 2000. The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin α M β 2 by LPS and other inflammatory mediators. Curr Biol, vol. 10. no. 16, p. 974-978.

30. CELLI, J., M. OLIVIER et B.B. FINLAY. 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. Embo J, vol. 20. no. 6, p. 1245-1258.

31. CHANG, K.P. et D.M. DWYER. 1976. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. Science, vol. 193. no. 4254, p. 678-680.

32. CHANG, W.J., Y.S. YING, K.G. ROTHBERG, N.M. HOOPER, A.J. TURNER, H.A. GAMBLIEL, J. DE GUNZBURG, S.M. MUMBY, A.G. GILMAN et R.G. ANDERSON. 1994. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. J Cell Biol, vol. 126. no. 1, p. 127-138.

33. CLAUS, V., A. JAHRAUS, T. TJELLE, T. BERG, H. KIRSCHKE, H. FAULSTICH et G. GRIFFITHS. 1998. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. J Biol Chem, vol. 273. no. 16, p. 9842-9851.

34. COX, D., B.M. DALE, M. KASHIWADA, C.D. HELGASON et S. GREENBERG. 2001. A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (α (M) β (2); CD11b/CD18). J Exp Med, vol. 193. no. 1, p. 61-71.

35. COX, D., D.J. LEE, B.M. DALE, J. CALAFAT et S. GREENBERG. 2000. A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97. no. 2, p. 680-685.

36. COX, D., C.C. TSENG, G. BJEKIC et S. GREENBERG. 1999. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. J Biol Chem, vol. 274. no. 3, p. 1240-1247.

37. COX, D., D. WESSELS, D.R. SOLL, J. HARTWIG et J. CONDEELIS. 1996. Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility, and phagocytosis defects of ABP-120- Dictyostelium mutants. Mol Biol Cell, vol. 7. no. 5, p. 803-823.
38. CROWLEY, M.T., P.S. COSTELLO, C.J. FITZER-ATTAS, M. TURNER, F. MENG, C. LOWELL, V.L. TYBULEWICZ et A.L. DEFRANCO. 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcgamma receptors on macrophages. J Exp Med, vol. 186. no. 7, p. 1027-1039.
39. DAVID, C., P.S. MCPHERSON, O. MUNDIGL et P. DE CAMILLI. 1996. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93. no. 1, p. 331-335.
40. DAVY, A., C. FEUERSTEIN et S.M. ROBBINS. 2000. Signaling within a caveolae-like membrane microdomain in human neuroblastoma cells in response to fibroblast growth factor. J Neurochem, vol. 74. no. 2, p. 676-683.
41. DEFACQUE, H., E. BOS, B. GARVALOV, C. BARRET, C. ROY, P. MANGEAT, H.W. SHIN, V. RYBIN et G. GRIFFITHS. 2002. Phosphoinositides regulate membrane-dependent actin assembly by latex bead phagosomes. Mol Biol Cell, vol. 13. no. 4, p. 1190-1202.
42. DERMINE, J.F., S. DUCLOS, J. GARIN, F. ST-LOUIS, S. REA, R.G. PARTON et M. DESJARDINS. 2001. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. J Biol Chem, vol. 276. no. 21, p. 18507-18512.
43. DESCOTEAUX, A., Y. LUO, S.J. TURCO et S.M. BEVERLEY. 1995. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of Leishmania. Science, vol. 269. no. 5232, p. 1869-1872.
44. DESCOTEAUX, A., G. MATLASHEWSKI et S.J. TURCO. 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by Leishmania donovani lipophosphoglycan. J Immunol, vol. 149. no. 9, p. 3008-3015.
45. DESCOTEAUX, A. et S.J. TURCO. 1999. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. Biochim Biophys Acta, vol. 1455. no. 2-3, p. 341-352.

46. DESCOTEAUX, A. et S.J. TURCO. 2002. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. Microbes Infect, vol. 4. no. 9, p. 975-981.
47. DESJARDINS, M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. Trends Cell Biol, vol. 5. no. 5, p. 183-186.
48. DESJARDINS, M. 2003. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. Nat Rev Immunol, vol. 3. no. 4, p. 280-291.
49. DESJARDINS, M., J.E. CELIS, G. VAN MEER, H. DIEPLINGER, A. JAHRAUS, G. GRIFFITHS et L.A. HUBER. 1994. Molecular characterization of phagosomes. J Biol Chem, vol. 269. no. 51, p. 32194-32200.
50. DESJARDINS, M. et A. DESCOTEAUX. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. J Exp Med, vol. 185. no. 12, p. 2061-2068.
51. DESJARDINS, M. et G. GRIFFITHS. 2003. Phagocytosis: latex leads the way. Curr Opin Cell Biol, vol. 15. no. 4, p. 498-503.
52. DESJARDINS, M., L.A. HUBER, R.G. PARTON et G. GRIFFITHS. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. J Cell Biol, vol. 124. no. 5, p. 677-688.
53. DESJARDINS, M., N.N. NZALA, R. CORSINI et C. RONDEAU. 1997. Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. J Cell Sci, vol. 110 (Pt 18). no., p. 2303-2314.
54. DHAND, R., K. HARA, I. HILES, B. BAX, I. GOUT, G. PANAYOTOU, M.J. FRY, K. YONEZAWA, M. KASUGA et M.D. WATERFIELD. 1994. PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions. Embo J, vol. 13. no. 3, p. 511-521.

55. DHAND, R., I. HILES, G. PANAYOTOU, S. ROCHE, M.J. FRY, I. GOUT, N.F. TOTTY, O. TRUONG, P. VICENDO, K. YONEZAWA, *et al.* 1994. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. Embo J, vol. 13. no. 3, p. 522-533.
56. DI, A., D.J. NELSON, V. BINDOKAS, M.E. BROWN, F. LIBUNAO et H.C. PALFREY. 2003. Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages. Mol Biol Cell, vol. 14. no. 5, p. 2016-2028.
57. DOMIN, J., F. PAGES, S. VOLINIA, S.E. RITTENHOUSE, M.J. ZVELEBIL, R.C. STEIN et M.D. WATERFIELD. 1997. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. Biochem J, vol. 326 (Pt 1). no., p. 139-147.
58. DOWLER, S., R.A. CURRIE, D.G. CAMPBELL, M. DEAK, G. KULAR, C.P. DOWNES et D.R. ALESSI. 2000. Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. Biochem J, vol. 351. no. Pt 1, p. 19-31.
59. DOYLE, S.E., R.M. O'CONNELL, G.A. MIRANDA, S.A. VAIDYA, E.K. CHOW, P.T. LIU, S. SUZUKI, N. SUZUKI, R.L. MODLIN, W.C. YEH, *et al.* 2004. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. J Exp Med, vol. 199. no. 1, p. 81-90.
60. D'SOUZA-SCHOREY, C., E. VAN DONSELAAR, V.W. HSU, C. YANG, P.D. STAHL et P.J. PETERS. 1998. ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. J Cell Biol, vol. 140. no. 3, p. 603-616.
61. DUCLOS, S. et M. DESJARDINS. 2000. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. Cell Microbiol, vol. 2. no. 5, p. 365-377.
62. DUCLOS, S., R. DIEZ, J. GARIN, B. PAPADOPOULOU, A. DESCOTEAUX, H. STENMARK et M. DESJARDINS. 2000. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. J Cell Sci, vol. 113 Pt 19. no., p. 3531-3541.

63. ELLSON, C.D., S. GOBERT-GOSSE, K.E. ANDERSON, K. DAVIDSON, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST, J.W. THURING, M.A. COOPER, Z.Y. LIM, A.B. HOLMES, *et al.* 2001. PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). Nat Cell Biol, vol. 3. no. 7, p. 679-682.

64. FIVAZ, M., L. ABRAMI et F.G. VAN DER GOOT. 1999. Landing on lipid rafts. Trends Cell Biol, vol. 9. no. 6, p. 212-213.

65. FRANKE, T.F., D.R. KAPLAN, L.C. CANTLEY et A. TOKER. 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. Science, vol. 275. no. 5300, p. 665-668.

66. FRASER, I.P., H. KOZIEL et R.A. EZEKOWITZ. 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. Semin Immunol, vol. 10. no. 5, p. 363-372.

67. FRATTI, R.A., J.M. BACKER, J. GRUENBERG, S. CORVERA et V. DERETIC. 2001. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. J Cell Biol, vol. 154. no. 3, p. 631-644.

68. FRATTI, R.A., J. CHUA, I. VERGNE et V. DERETIC. 2003. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 100. no. 9, p. 5437-5442.

69. FURUCHI, T. et R.G. ANDERSON. 1998. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). J Biol Chem, vol. 273. no. 33, p. 21099-21104.

70. GAGNON, E., S. DUCLOS, C. RONDEAU, E. CHEVET, P.H. CAMERON, O. STEELE-MORTIMER, J. PAIEMENT, J.J. BERGERON et M. DESJARDINS. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. Cell, vol. 110. no. 1, p. 119-131.

71. GAIDAROV, I., M.E. SMITH, J. DOMIN et J.H. KEEN. 2001. The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. Mol Cell, vol. 7. no. 2, p. 443-449.
72. GARCIA, P., R. GUPTA, S. SHAH, A.J. MORRIS, S.A. RUDGE, S. SCARLATA, V. PETROVA, S. MCLAUGHLIN et M.J. REBECCHI. 1995. The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes. Biochemistry, vol. 34. no. 49, p. 16228-16234.
73. GARIN, J., R. DIEZ, S. KIEFFER, J.F. DERMINE, S. DUCLOS, E. GAGNON, R. SADOUL, C. RONDEAU et M. DESJARDINS. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. J Cell Biol, vol. 152. no. 1, p. 165-180.
74. GATFIELD, J. et J. PIETERS. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. Science, vol. 288. no. 5471, p. 1647-1650.
75. GAULLIER, J.M., A. SIMONSEN, A. D'ARRIGO, B. BREMNES, H. STENMARK et R. AASLAND. 1998. FYVE fingers bind PtdIns(3)P. Nature, vol. 394. no. 6692, p. 432-433.
76. GHAZIZADEH, S., J.B. BOLEN et H.B. FLEIT. 1995. Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. Biochem J, vol. 305 (Pt 2). no., p. 669-674.
77. GHAZIZADEH, S. et H.B. FLEIT. 1994. Tyrosine phosphorylation provides an obligatory early signal for Fc gamma RII-mediated endocytosis in the monocytic cell line THP-1. J Immunol, vol. 152. no. 1, p. 30-41.
78. GILLOOLY, D.J., A. SIMONSEN et H. STENMARK. 2001. Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. Biochem J, vol. 355. no. Pt 2, p. 249-258.
79. GILLOOLY, D.J., A. SIMONSEN et H. STENMARK. 2001. Phosphoinositides and phagocytosis. J Cell Biol, vol. 155. no. 1, p. 15-17.

80. GIORGIONE, J.R., S.J. TURCO et R.M. EPAND. 1996. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93. no. 21, p. 11634-11639.
81. GOLD, E.S., D.M. UNDERHILL, N.S. MORRISSETTE, J. GUO, M.A. MCNIVEN et A. ADEREM. 1999. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. J Exp Med, vol. 190. no. 12, p. 1849-1856.
82. GORVEL, J.P., P. CHAVRIER, M. ZERIAL et J. GRUENBERG. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. Cell, vol. 64. no. 5, p. 915-925.
83. GRAY, A., J. VAN DER KAAY et C.P. DOWNES. 1999. The pleckstrin homology domains of protein kinase B and GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1) are sensitive and selective probes for the cellular detection of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and/or phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in vivo. Biochem J, vol. 344 Pt 3. no., p. 929-936.
84. GREEN, P.J., T. FEIZI, M.S. STOLL, S. THIEL, A. PRESCOTT et M.J. MCCONVILLE. 1994. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. Mol Biochem Parasitol, vol. 66. no. 2, p. 319-328.
85. GREENBERG, S. 1995. Signal transduction of phagocytosis. Trends Cell Biol, vol. 5. no. 3, p. 93-99.
86. GREENBERG, S. 2001. Diversity in phagocytic signalling. J Cell Sci, vol. 114. no. Pt 6, p. 1039-1040.
87. GREENBERG, S., P. CHANG, D.C. WANG, R. XAVIER et B. SEED. 1996. Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93. no. 3, p. 1103-1107.
88. HACKAM, D.J., O.D. ROTSTEIN, C. SJOLIN, A.D. SCHREIBER, W.S. TRIMBLE et S. GRINSTEIN. 1998. v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95. no. 20, p. 11691-11696.

89. HARA, K., K. YONEZAWA, H. SAKAUE, A. ANDO, K. KOTANI, T. KITAMURA, Y. KITAMURA, H. UEDA, L. STEPHENS, T.R. JACKSON, *et al.* 1994. 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 91. no. 16, p. 7415-7419.
90. HARDER, T., P. SCHEIFFELE, P. VERKADE et K. SIMONS. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. J Cell Biol, vol. 141. no. 4, p. 929-942.
91. HARLAN, J.E., P.J. HAJDUK, H.S. YOON et S.W. FESIK. 1994. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Nature, vol. 371. no. 6493, p. 168-170.
92. HARRISON, R.E., C. BUCCI, O.V. VIEIRA, T.A. SCHROER et S. GRINSTEIN. 2003. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. Mol Cell Biol, vol. 23. no. 18, p. 6494-6506.
93. HARTWIG, J.H. 1995. Actin-binding proteins. 1: Spectrin super family. Protein Profile, vol. 2. no. 7, p. 703-800.
94. HASHIMOTO, C., K.L. HUDSON et K.V. ANDERSON. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell, vol. 52. no. 2, p. 269-279.
95. HAYASHI, F., K.D. SMITH, A. OZINSKY, T.R. HAWN, E.C. YI, D.R. GOODLETT, J.K. ENG, S. AKIRA, D.M. UNDERHILL et A. ADEREM. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature, vol. 410. no. 6832, p. 1099-1103.
96. HELMS, J.B. et C. ZURZOLO. 2004. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. Traffic, vol. 5. no. 4, p. 247-254.

97. HEMMI, H., O. TAKEUCHI, T. KAWAI, T. KAISHO, S. SATO, H. SANJO, M. MATSUMOTO, K. HOSHINO, H. WAGNER, K. TAKEDA, *et al.* 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature, vol. 408. no. 6813, p. 740-745.
98. HERWALDT, B.L. 1999. Leishmaniasis. Lancet, vol. 354. no. 9185, p. 1191-1199.
99. HINCHLIFFE, K. et R. IRVINE. 1997. Inositol lipid pathways turn turtle. Nature, vol. 390. no. 6656, p. 123-124.
100. HOLM, A., K. TEJLE, K.E. MAGNUSSON, A. DESCOTEAUX et B. RASMUSSEN. 2001. Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. Cell Microbiol, vol. 3. no. 7, p. 439-447.
101. HOLT, K.H., L. OLSON, W.S. MOYE-ROWLEY et J.E. PESSIN. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high-affinity interactions between distinct domains within the p110 and p85 subunits. Mol Cell Biol, vol. 14. no. 1, p. 42-49.
102. HOPE, H.R. et L.J. PIKE. 1996. Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. Mol Biol Cell, vol. 7. no. 6, p. 843-851.
103. ILG, T., D. CRAIK, G. CURRIE, G. MULTHAUP et A. BACIC. 1998. Stage-specific proteophosphoglycan from Leishmania mexicana amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides. J Biol Chem, vol. 273. no. 22, p. 13509-13523.
104. ILG, T., Y.D. STIERHOF, D. CRAIK, R. SIMPSON, E. HANDMAN et A. BACIC. 1996. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by Leishmania parasites. J Biol Chem, vol. 271. no. 35, p. 21583-21596.
105. ILG, T., Y.D. STIERHOF, M.J. MCCONVILLE et P. OVERATH. 1995. Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by Leishmania mexicana amastigotes. Eur J Cell Biol, vol. 66. no. 2, p. 205-215.

106. ILG, T., Y.D. STIERHOF, M. WIESE, M.J. MCCONVILLE et P. OVERATH. 1994. Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*. Parasitology, vol. 108 Suppl. no., p. S63-71.
107. INDIK, Z.K., S. HUNTER, M.M. HUANG, X.Q. PAN, P. CHIEN, C. KELLY, A.I. LEVINSON, R.P. KIMBERLY et A.D. SCHREIBER. 1994. The high affinity Fc gamma receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: the gamma subunit of Fc gamma RIIIA imparts phagocytic function to Fc gamma RI. Exp Hematol, vol. 22. no. 7, p. 599-606.
108. IRETON, K., B. PAYRASTRE, H. CHAP, W. OGAWA, H. SAKAUE, M. KASUGA et P. COSSART. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. Science, vol. 274. no. 5288, p. 780-782.
109. ISAKOFF, S.J., T. CARDOZO, J. ANDREEV, Z. LI, K.M. FERGUSON, R. ABAGYAN, M.A. LEMMON, A. ARONHEIM et E.Y. SKOLNIK. 1998. Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. Embo J, vol. 17. no. 18, p. 5374-5387.
110. ISSHIKI, M. et R.G. ANDERSON. 1999. Calcium signal transduction from caveolae. Cell Calcium, vol. 26. no. 5, p. 201-208.
111. IWABUCHI, K., K. HANDA et S. HAKOMORI. 1998. Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. J Biol Chem, vol. 273. no. 50, p. 33766-33773.
112. JACOBSON, K. et C. DIETRICH. 1999. Looking at lipid rafts? Trends Cell Biol, vol. 9. no. 3, p. 87-91.
113. JAHRAUS, A., T.E. TJELLE, T. BERG, A. HABERMANN, B. STORRIE, O. ULLRICH et G. GRIFFITHS. 1998. In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. J Biol Chem, vol. 273. no. 46, p. 30379-30390.

114. JANEWAY, C.A., JR. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. Immunol Today, vol. 13. no. 1, p. 11-16.
115. KAPPELLER, R., K.V. PRASAD, O. JANSSEN, W. HOU, B.S. SCHAFFHAUSEN, C.E. RUDD et L.C. CANTLEY. 1994. Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem, vol. 269. no. 3, p. 1927-1933.
116. KILLICK-KENDRICK, R. 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their phlebotomine vectors. Bull Soc Pathol Exot Filiales, vol. 78. no. 5 Pt 2, p. 747-755.
117. KILLICK-KENDRICK, R. 1990. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann Parasitol Hum Comp, vol. 65 Suppl 1. no., p. 37-42.
118. KILLICK-KENDRICK, R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med Vet Entomol, vol. 4. no. 1, p. 1-24.
119. KILSDONK, E.P., P.G. YANCEY, G.W. STOUT, F.W. BANGERTER, W.J. JOHNSON, M.C. PHILLIPS et G.H. ROTHBLAT. 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. J Biol Chem, vol. 270. no. 29, p. 17250-17256.
120. KISHIMOTO, A., Y. TAKAI, T. MORI, U. KIKKAWA et Y. NISHIZUKA. 1980. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. J Biol Chem, vol. 255. no. 6, p. 2273-2276.
121. KLIPPEL, A., J.A. ESCOBEDO, M. HIRANO et L.T. WILLIAMS. 1994. The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity. Mol Cell Biol, vol. 14. no. 4, p. 2675-2685.
122. KLIPPEL, A., J.A. ESCOBEDO, Q. HU et L.T. WILLIAMS. 1993. A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo. Mol Cell Biol, vol. 13. no. 9, p. 5560-5566.

123. KLIPPEL, A., C. REINHARD, W.M. KAVANAUGH, G. APELL, M.A. ESCOBEDO et L.T. WILLIAMS. 1996. Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. Mol Cell Biol, vol. 16. no. 8, p. 4117-4127.
124. KOJIMA, T., M. FUKUDA, Y. WATANABE, F. HAMAZATO et K. MIKOSHIBA. 1997. Characterization of the pleckstrin homology domain of Btk as an inositol polyphosphate and phosphoinositide binding domain. Biochem Biophys Res Commun, vol. 236. no. 2, p. 333-339.
125. KRUGMANN, S., A. EGUINO, A.H. MCGREGOR, P.T. HAWKINS et L.R. STEPHENS. 1997. Structural analysis of a novel isoform of phosphoinositide 3OH-kinase. Biochem Soc Trans, vol. 25. no. 4, p. S604.
126. KWOK, T., S. BACKERT, H. SCHWARZ, J. BERGER et T.F. MEYER. 2002. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. Infect Immun, vol. 70. no. 4, p. 2108-2120.
127. LEI, M.G. et D.C. MORRISON. 2000. Differential expression of caveolin-1 in lipopolysaccharide-activated murine macrophages. Infect Immun, vol. 68. no. 9, p. 5084-5089.
128. LENNARTZ, M.R., A.F. YUEN, S.M. MASI, D.G. RUSSELL, K.F. BUTTLE et J.J. SMITH. 1997. Phospholipase A2 inhibition results in sequestration of plasma membrane into electronlucent vesicles during IgG-mediated phagocytosis. J Cell Sci, vol. 110 (Pt 17). no., p. 2041-2052.
129. LEVERRIER, Y., K. OKKENHAUG, C. SAWYER, A. BILANCIO, B. VANHAESEBROECK et A.J. RIDLEY. 2003. Class I phosphoinositide 3-kinase p110beta is required for apoptotic cell and Fcgamma receptor-mediated phagocytosis by macrophages. J Biol Chem, vol. 278. no. 40, p. 38437-38442.
130. LISANTI, M.P., P.E. SCHERER, Z. TANG et M. SARGIACOMO. 1994. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. Trends Cell Biol, vol. 4. no. 7, p. 231-235.

131. LISANTI, M.P., P.E. SCHERER, J. VIDUGIRIENE, Z. TANG, A. HERMANOWSKI-VOSATKA, Y.H. TU, R.F. COOK et M. SARGIACOMO. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. J Cell Biol, vol. 126. no. 1, p. 111-126.
132. LIU, J., P. OH, T. HORNER, R.A. ROGERS et J.E. SCHNITZER. 1997. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. J Biol Chem, vol. 272. no. 11, p. 7211-7222.
133. LIU, P., Y. YING, Y.G. KO et R.G. ANDERSON. 1996. Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. J Biol Chem, vol. 271. no. 17, p. 10299-10303.
134. LIU, X., L.E. MARENGERE, C.A. KOCH et T. PAWSON. 1993. The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. Mol Cell Biol, vol. 13. no. 9, p. 5225-5232.
135. LOWRY, M.B., A.M. DUCHEMIN, J.M. ROBINSON et C.L. ANDERSON. 1998. Functional separation of pseudopod extension and particle internalization during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. J Exp Med, vol. 187. no. 2, p. 161-176.
136. LUTZ, M.A. et P.H. CORRELL. 2003. Activation of CR3-mediated phagocytosis by MSP requires the RON receptor, tyrosine kinase activity, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C zeta. J Leukoc Biol, vol. 73. no. 6, p. 802-814.
137. MACHESKY, L.M. et K.L. GOULD. 1999. The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. Curr Opin Cell Biol, vol. 11. no. 1, p. 117-121.
138. MACHESKY, L.M. et R.H. INSALL. 1999. Signaling to actin dynamics. J Cell Biol, vol. 146. no. 2, p. 267-272.
139. MANSFIELD, P.J., J.A. SHAYMAN et L.A. BOXER. 2000. Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. Blood, vol. 95. no. 7, p. 2407-2412.

140. MARSHALL, J.G., J.W. BOOTH, V. STAMBOLIC, T. MAK, T. BALLA, A.D. SCHREIBER, T. MEYER et S. GRINSTEIN. 2001. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. J Cell Biol, vol. 153. no. 7, p. 1369-1380.

141. MAY, R.C. et L.M. MACHESKY. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. J Cell Sci, vol. 114. no. Pt 6, p. 1061-1077.

142. MCBRIDE, H.M., V. RYBIN, C. MURPHY, A. GINER, R. TEASDALE et M. ZERIAL. 1999. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. Cell, vol. 98. no. 3, p. 377-386.

143. MCCONVILLE, M.J. et M.A. FERGUSON. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochem J, vol. 294 (Pt 2). no., p. 305-324.

144. MCNEELY, T.B. et S.J. TURCO. 1987. Inhibition of protein kinase C activity by the Leishmania donovani lipophosphoglycan. Biochem Biophys Res Commun, vol. 148. no. 2, p. 653-657.

145. MCNEELY, T.B. et S.J. TURCO. 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of Leishmania donovani within human monocytes. J Immunol, vol. 144. no. 7, p. 2745-2750.

146. MEDZHITOV, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol, vol. 1. no. 2, p. 135-145.

147. MIAO, L., A. STAFFORD, S. NIR, S.J. TURCO, T.D. FLANAGAN et R.M. EPAND. 1995. Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of Leishmania donovani. Biochemistry, vol. 34. no. 14, p. 4676-4683.

148. MISAWA, H., M. OHTSUBO, N.G. COPELAND, D.J. GILBERT, N.A. JENKINS et A. YOSHIMURA. 1998. Cloning and characterization of a novel class II phosphoinositide 3-kinase containing C2 domain. Biochem Biophys Res Commun, vol. 244. no. 2, p. 531-539.

149. MORRISSETTE, N.S., E.S. GOLD, J. GUO, J.A. HAMERMAN, A. OZINSKY, V. BEDIAN et A.A. ADEREM. 1999. Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against novel components of macrophage phagosomes. J Cell Sci, vol. 112 (Pt 24). no., p. 4705-4713.
150. MOSSER, D.M. et L.A. ROSENTHAL. 1993. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. Semin Cell Biol, vol. 4. no. 5, p. 315-322.
151. MUKHERJEE, S., R.N. GHOSH et F.R. MAXFIELD. 1997. Endocytosis. Physiol Rev, vol. 77. no. 3, p. 759-803.
152. MULLIN, N.P., K.T. HALL et M.E. TAYLOR. 1994. Characterization of ligand binding to a carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. J Biol Chem, vol. 269. no. 45, p. 28405-28413.
153. MULLIN, N.P., P.G. HITCHEN et M.E. TAYLOR. 1997. Mechanism of Ca²⁺ and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. J Biol Chem, vol. 272. no. 9, p. 5668-5681.
154. MULLINS, R.D., J.A. HEUSER et T.D. POLLARD. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95. no. 11, p. 6181-6186.
155. NAGAISHI, K., R. ADACHI, T. KAWANISHI, T. YAMAGUCHI, T. KASAHARA, T. HAYAKAWA et K. SUZUKI. 1999. Participation of cofilin in opsonized zymosan-triggered activation of neutrophil-like HL-60 cells through rapid dephosphorylation and translocation to plasma membranes. J Biochem (Tokyo), vol. 125. no. 5, p. 891-898.
156. NANAVATI, C., V.S. MARKIN, A.F. OBERHAUSER et J.M. FERNANDEZ. 1992. The exocytotic fusion pore modeled as a lipidic pore. Biophys J, vol. 63. no. 4, p. 1118-1132.

157. NGUYEN, D.H. et J.E. HILDRETH. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. J Virol, vol. 74. no. 7, p. 3264-3272.
158. NIELSEN, E., S. CHRISTOFORIDIS, S. UTENWEILER-JOSEPH, M. MIACZYNSKA, F. DEWITTE, M. WILM, B. HOFLACK et M. ZERIAL. 2000. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. J Cell Biol, vol. 151. no. 3, p. 601-612.
159. NINOMIYA, N., K. HAZEKI, Y. FUKUI, T. SEYA, T. OKADA, O. HAZEKI et M. UI. 1994. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. J Biol Chem, vol. 269. no. 36, p. 22732-22737.
160. OATEY, P.B., K. VENKATESWARLU, A.G. WILLIAMS, L.M. FLETCHER, E.J. FOULSTONE, P.J. CULLEN et J.M. TAVARE. 1999. Confocal imaging of the subcellular distribution of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in insulin- and PDGF-stimulated 3T3-L1 adipocytes. Biochem J, vol. 344 Pt 2. no., p. 511-518.
161. OLAZABAL, I.M., E. CARON, R.C. MAY, K. SCHILLING, D.A. KNECHT et L.M. MACHESKY. 2002. Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis. Curr Biol, vol. 12. no. 16, p. 1413-1418.
162. OLLIARO, P. et F. CASTELLI. 1997. Plasmodium falciparum: an electronmicroscopy study of caveolae and trafficking between the parasite and the extracellular medium. Int J Parasitol, vol. 27. no. 9, p. 1007-1012.
163. ORLANDI, P.A. et P.H. FISHMAN. 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. J Cell Biol, vol. 141. no. 4, p. 905-915.
164. OTTO, J.J. 1994. Actin-bundling proteins. Curr Opin Cell Biol, vol. 6. no. 1, p. 105-109.
165. OZINSKY, A., D.M. UNDERHILL, J.D. FONTENOT, A.M. HAJJAR, K.D. SMITH, C.B. WILSON, L. SCHROEDER et A. ADEREM. 2000. The repertoire for

pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97. no. 25, p. 13766-13771.

166. PAGANO, R.E. et C.S. CHEN. 1998. Use of BODIPY-labeled sphingolipids to study membrane traffic along the endocytic pathway. Ann N Y Acad Sci, vol. 845. no., p. 152-160.

167. PANARETOU, C., J. DOMIN, S. COCKCROFT et M.D. WATERFIELD. 1997. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. J Biol Chem, vol. 272. no. 4, p. 2477-2485.

168. PARK, J.G., R.E. ISAACS, P. CHIEN et A.D. SCHREIBER. 1993. In the absence of other Fc receptors, Fc gamma RIIIA transmits a phagocytic signal that requires the cytoplasmic domain of its gamma subunit. J Clin Invest, vol. 92. no. 4, p. 1967-1973.

169. PATKI, V., J. VIRBASISUS, W.S. LANE, B.H. TOH, H.S. SHPETNER et S. CORVERA. 1997. Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 94. no. 14, p. 7326-7330.

170. PAVALKO, F.M. et S.M. LAROCHE. 1993. Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. J Immunol, vol. 151. no. 7, p. 3795-3807.

171. PEYRON, P., C. BORDIER, E.N. N'DIAYE et I. MARIDONNEAU-PARINI. 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. J Immunol, vol. 165. no. 9, p. 5186-5191.

172. PITT, A., L.S. MAYORGA, P.D. STAHL et A.L. SCHWARTZ. 1992. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. J Clin Invest, vol. 90. no. 5, p. 1978-1983.

173. POLLARD, T.D., L. BLANCHONIN et R.D. MULLINS. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Annu Rev Biophys Biomol Struct, vol. 29. no., p. 545-576.
174. PONTING, C.P. 1996. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? Protein Sci, vol. 5. no. 11, p. 2353-2357.
175. PRALLE, A., P. KELLER, E.L. FLORIN, K. SIMONS et J.K. HORBER. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. J Cell Biol, vol. 148. no. 5, p. 997-1008.
176. PRASAD, K.V., O. JANSSEN, R. KAPPELLER, M. RAAB, L.C. CANTLEY et C.E. RUDD. 1993. Src-homology 3 domain of protein kinase p59fyn mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90. no. 15, p. 7366-7370.
177. PRIVE, C. et A. DESCOTEAUX. 2000. Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. Eur J Immunol, vol. 30. no. 8, p. 2235-2244.
178. PUCADYIL, T.J., P. TEWARY, R. MADHUBALA et A. CHATTOPADHYAY. 2004. Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: implications in leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol, vol. 133. no. 2, p. 145-152.
179. PUENTES, S.M., R.P. DA SILVA, D.L. SACKS, C.H. HAMMER et K.A. JOINER. 1990. Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9. J Immunol, vol. 145. no. 12, p. 4311-4316.
180. PUENTES, S.M., D.M. DWYER, P.A. BATES et K.A. JOINER. 1989. Binding and release of C3 from Leishmania donovani promastigotes during incubation in normal human serum. J Immunol, vol. 143. no. 11, p. 3743-3749.
181. PUENTES, S.M., D.L. SACKS, R.P. DA SILVA et K.A. JOINER. 1988. Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes

varying in expression of a surface lipophosphoglycan. J Exp Med, vol. 167. no. 3, p. 887-902.

182. RABINOWITZ, S., H. HORSTMANN, S. GORDON et G. GRIFFITHS. 1992. Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. J Cell Biol, vol. 116. no. 1, p. 95-112.

183. RAVETCH, J.V. 1994. Fc receptors: rubor redux. Cell, vol. 78. no. 4, p. 553-560.

184. RAVETCH, J.V. 1997. Fc receptors. Curr Opin Immunol, vol. 9. no. 1, p. 121-125.

185. RETH, M. 1989. Antigen receptor tail clue. Nature, vol. 338. no. 6214, p. 383-384.

186. RIVERO, F., B. KOPPEL, B. PERACINO, S. BOZZARO, F. SIEGERT, C.J. WEIJER, M. SCHLEICHER, R. ALBRECHT et A.A. NOEGEL. 1996. The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. J Cell Sci, vol. 109 (Pt 11). no., p. 2679-2691.

187. ROBBINS, S.M., N.A. QUINTRELL et J.M. BISHOP. 1995. Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. Mol Cell Biol, vol. 15. no. 7, p. 3507-3515.

188. RODRIGUEZ-VICIANA, P., P.H. WARNE, R. DHAND, B. VANHAESEBROECK, I. GOUT, M.J. FRY, M.D. WATERFIELD et J. DOWNWARD. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. Nature, vol. 370. no. 6490, p. 527-532.

189. ROHATGI, R., L. MA, H. MIKI, M. LOPEZ, T. KIRCHHAUSEN, T. TAKENAWA et M.W. KIRSCHNER. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. Cell, vol. 97. no. 2, p. 221-231.

190. ROITT, I., J. BROSTOFF et D. MALE. 1989. Immunologie fondamentale et appliquée. Paris, MEDSI/McGRAW-HILL, PP.

191. RORDORF-NIKOLIC, T., D.J. VAN HORN, D. CHEN, M.F. WHITE et J.M. BACKER. 1995. Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. J Biol Chem, vol. 270. no. 8, p. 3662-3666.
192. ROSEN, A., K.F. KEENAN, M. THELEN, A.C. NAIRN et A. ADEREM. 1990. Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. J Exp Med, vol. 172. no. 4, p. 1211-1215.
193. ROSENBERGER, C.M., J.H. BRUMELL et B.B. FINLAY. 2000. Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. Curr Biol, vol. 10. no. 22, p. R823-825.
194. ROTHBERG, K.G., J.E. HEUSER, W.C. DONZELL, Y.S. YING, J.R. GLENNEY et R.G. ANDERSON. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell, vol. 68. no. 4, p. 673-682.
195. RUSSELL, S.W. et S. GORDON. 1992. Macrophage Biology and Activation. Berlin, Springer-Verlag, PP. 299.
196. SACKS, D.L. 2001. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. Cell Microbiol, vol. 3. no. 4, p. 189-196.
197. SACKS, D.L., P.F. PIMENTA, M.J. MCCONVILLE, P. SCHNEIDER et S.J. TURCO. 1995. Stage-specific binding of Leishmania donovani to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. J Exp Med, vol. 181. no. 2, p. 685-697.
198. SAKAUE, H., K. HARA, T. NOGUCHI, T. MATOZAKI, K. KOTANI, W. OGAWA, K. YONEZAWA, M.D. WATERFIELD et M. KASUGA. 1995. Ras-independent and wortmannin-sensitive activation of glycogen synthase by insulin in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem, vol. 270. no. 19, p. 11304-11309.

199. SARGIACOMO, M., M. SUDOL, Z. TANG et M.P. LISANTI. 1993. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. J Cell Biol, vol. 122. no. 4, p. 789-807.
200. SARNATARO, D., V. CAMPANA, S. PALADINO, M. STORNAIUOLO, L. NITSCH et C. ZURZOLO. 2004. PrPC Association with Lipid Rafts in the Early Secretory Pathway Stabilizes Its Cellular Conformation. Mol Biol Cell, vol. no.
201. SATO, T.K., M. OVERDUIN et S.D. EMR. 2001. Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. Science, vol. 294. no. 5548, p. 1881-1885.
202. SCHNEIDER, P., M.A. FERGUSON, M.J. MCCONVILLE, A. MEHLERT, S.W. HOMANS et C. BORDIER. 1990. Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the Leishmania major promastigote surface protease. J Biol Chem, vol. 265. no. 28, p. 16955-16964.
203. SCIANIMANICO, S., M. DESROSIERS, J.F. DERMINE, S. MERESSE, A. DESCOTEAUX et M. DESJARDINS. 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by Leishmania donovani promastigotes. Cell Microbiol, vol. 1. no. 1, p. 19-32.
204. SERVANT, G., O.D. WEINER, P. HERZMARK, T. BALLA, J.W. SEDAT et H.R. BOURNE. 2000. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. Science, vol. 287. no. 5455, p. 1037-1040.
205. SHARMA, D.K., A. CHOUDHURY, R.D. SINGH, C.L. WHEATLEY, D.L. MARKS et R.E. PAGANO. 2003. Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. J Biol Chem, vol. 278. no. 9, p. 7564-7572.
206. SHIMAZU, R., S. AKASHI, H. OGATA, Y. NAGAI, K. FUKUDOME, K. MIYAKE et M. KIMOTO. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med, vol. 189. no. 11, p. 1777-1782.
207. SHIN, J.S., Z. GAO et S.N. ABRAHAM. 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. Science, vol. 289. no. 5480, p. 785-788.

208. SIELING, P.A. et R.L. MODLIN. 2002. Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. Curr Opin Microbiol, vol. 5. no. 1, p. 70-75.
209. SIMONS, K. et E. IKONEN. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature, vol. 387. no. 6633, p. 569-572.
210. SIMONSEN, A., R. LIPPE, S. CHRISTOFORIDIS, J.M. GAULLIER, A. BRECH, J. CALLAGHAN, B.H. TOH, C. MURPHY, M. ZERIAL et H. STENMARK. 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. Nature, vol. 394. no. 6692, p. 494-498.
211. SIMONSEN, A. et H. STENMARK. 2001. PX domains: attracted by phosphoinositides. Nat Cell Biol, vol. 3. no. 8, p. E179-182.
212. SJOLANDER, A., K. YAMAMOTO, B.E. HUBER et E.G. LAPETINA. 1991. Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 88. no. 18, p. 7908-7912.
213. SMART, E.J., G.A. GRAF, M.A. MCNIVEN, W.C. SESSA, J.A. ENGELMAN, P.E. SCHERER, T. OKAMOTO et M.P. LISANTI. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol Cell Biol, vol. 19. no. 11, p. 7289-7304.
214. SMART, E.J., Y.S. YING, C. MINEO et R.G. ANDERSON. 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92. no. 22, p. 10104-10108.
215. SPATH, G.F., L. EPSTEIN, B. LEADER, S.M. SINGER, H.A. AVILA, S.J. TURCO et S.M. BEVERLEY. 2000. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97. no. 16, p. 9258-9263.
216. STACK, J.H., D.B. DEWALD, K. TAKEGAWA et S.D. EMR. 1995. Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and

the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. J Cell Biol, vol. 129. no. 2, p. 321-334.

217. STACK, J.H. et S.D. EMR. 1993. Genetic and biochemical studies of protein sorting to the yeast vacuole. Curr Opin Cell Biol, vol. 5. no. 4, p. 641-646.

218. STAHL, P.D. et R.A. EZEKOWITZ. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. Curr Opin Immunol, vol. 10. no. 1, p. 50-55.

219. STEIN, R.C. 2001. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. Endocr Relat Cancer, vol. 8. no. 3, p. 237-248.

220. STENMARK, H., R. AASLAND et P.C. DRISCOLL. 2002. The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. FEBS Lett, vol. 513. no. 1, p. 77-84.

221. STENMARK, H., R. AASLAND, B.H. TOH et A. D'ARRIGO. 1996. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. J Biol Chem, vol. 271. no. 39, p. 24048-24054.

222. STENMARK, H., R.G. PARTON, O. STEELE-MORTIMER, A. LUTCKE, J. GRUENBERG et M. ZERIAL. 1994. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. Embo J, vol. 13. no. 6, p. 1287-1296.

223. STENMARK, H.É. 2004. Phosphoinositides in Subcellular Targeting and Enzyme Activation. Berlin, Springer-Verlag, PP. 209.

224. STEPHENS, L., C. ELLSON et P. HAWKINS. 2002. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. Curr Opin Cell Biol, vol. 14. no. 2, p. 203-213.

225. STEPHENS, L.R., K.T. HUGHES et R.F. IRVINE. 1991. Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. Nature, vol. 351. no. 6321, p. 33-39.

226. SUTTON, R.B., B.A. DAVLETOV, A.M. BERGHUIS, T.C. SUDHOF et S.R. SPRANG. 1995. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. Cell, vol. 80. no. 6, p. 929-938.
227. SVITKINA, T.M. et G.G. BORISY. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. J Cell Biol, vol. 145. no. 5, p. 1009-1026.
228. SWANSON, J.A. et S.C. BAER. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. Trends Cell Biol, vol. 5. no. 3, p. 89-93.
229. SWANSON, J.A., M.T. JOHNSON, K. BENINGO, P. POST, M. MOOSEKER et N. ARAKI. 1999. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. J Cell Sci, vol. 112 (Pt 3). no., p. 307-316.
230. TAKEGAWA, K., D.B. DEWALD et S.D. EMR. 1995. Schizosaccharomyces pombe Vps34p, a phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase essential for normal cell growth and vacuole morphology. J Cell Sci, vol. 108 (Pt 12). no., p. 3745-3756.
231. TALL, E.G., I. SPECTOR, S.N. PENTYALA, I. BITTER et M.J. REBECCHI. 2000. Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. Curr Biol, vol. 10. no. 12, p. 743-746.
232. TAYLOR, M.E., K. BEZOUSKA et K. DRICKAMER. 1992. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. J Biol Chem, vol. 267. no. 3, p. 1719-1726.
233. TEIXEIRA, A., N. CHAVEROT, C. SCHRODER, A.D. STROSBERG, P.O. COURAUD et S. CAZAUBON. 1999. Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes. J Neurochem, vol. 72. no. 1, p. 120-128.
234. THORNTON, B.P., V. VETVICKA, M. PITMAN, R.C. GOLDMAN et G.D. ROSS. 1996. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). J Immunol, vol. 156. no. 3, p. 1235-1246.

235. TIETZE, C., P. SCHLESINGER et P. STAHL. 1982. Mannose-specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptor and their roles in receptor recycling. J Cell Biol, vol. 92. no. 2, p. 417-424.
236. TOLIAS, K.F., L.C. CANTLEY et C.L. CARPENTER. 1995. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. J Biol Chem, vol. 270. no. 30, p. 17656-17659.
237. TOLSON, D.L., S.J. TURCO, R.P. BEECROFT et T.W. PEARSON. 1989. The immunochemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. Mol Biochem Parasitol, vol. 35. no. 2, p. 109-118.
238. TOLSON, D.L., S.J. TURCO et T.W. PEARSON. 1990. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. Infect Immun, vol. 58. no. 11, p. 3500-3507.
239. TUIJNMAN, W.B., P.J. CAPEL et J.G. VAN DE WINKEL. 1992. Human low-affinity IgG receptor Fc gamma RIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes. Blood, vol. 79. no. 7, p. 1651-1656.
240. TURCO, S.J. et A. DESCOTEAUX. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annu Rev Microbiol, vol. 46. no., p. 65-94.
241. TURCO, S.J. et D.L. SACKS. 1991. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. Mol Biochem Parasitol, vol. 45. no. 1, p. 91-99.
242. TURCO, S.J., G.F. SPATH et S.M. BEVERLEY. 2001. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. Trends Parasitol, vol. 17. no. 5, p. 223-226.
243. ULEVITCH, R.J. et P.S. TOBIAS. 1994. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. Curr Opin Immunol, vol. 6. no. 1, p. 125-130.

244. VANHAESEBROECK, B., S.J. LEEVERS, K. AHMADI, J. TIMMS, R. KATSO, P.C. DRISCOLL, R. WOSCHOLSKI, P.J. PARKER et M.D. WATERFIELD. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu Rev Biochem, vol. 70. no., p. 535-602.
245. VANHAESEBROECK, B. et M.D. WATERFIELD. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. Exp Cell Res, vol. 253. no. 1, p. 239-254.
246. VARNAI, P., K.I. ROTHER et T. BALLA. 1999. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. J Biol Chem, vol. 274. no. 16, p. 10983-10989.
247. VASSELON, T. et P.A. DETMERS. 2002. Toll receptors: a central element in innate immune responses. Infect Immun, vol. 70. no. 3, p. 1033-1041.
248. VASSELON, T., W.A. HANLON, S.D. WRIGHT et P.A. DETMERS. 2002. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates activation of stress-activated MAP kinase p38. J Leukoc Biol, vol. 71. no. 3, p. 503-510.
249. VERGNE, I., J. CHUA et V. DERETIC. 2003. Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. Traffic, vol. 4. no. 9, p. 600-606.
250. VERGNE, I., R.A. FRATTI, P.J. HILL, J. CHUA, J. BELISLE et V. DERETIC. 2004. Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. Mol Biol Cell, vol. 15. no. 2, p. 751-760.
251. VIEIRA, O.V., R.J. BOTELHO, L. RAMEH, S.M. BRACHMANN, T. MATSUO, H.W. DAVIDSON, A. SCHREIBER, J.M. BACKER, L.C. CANTLEY et S. GRINSTEIN. 2001. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. J Cell Biol, vol. 155. no. 1, p. 19-25.

252. VIEIRA, O.V., C. BUCCI, R.E. HARRISON, W.S. TRIMBLE, L. LANZETTI, J. GRUENBERG, A.D. SCHREIBER, P.D. STAHL et S. GRINSTEIN. 2003. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. Mol Cell Biol, vol. 23. no. 7, p. 2501-2514.

253. VIEIRA, O.V., R.E. HARRISON, C.C. SCOTT, H. STENMARK, D. ALEXANDER, J. LIU, J. GRUENBERG, A.D. SCHREIBER et S. GRINSTEIN. 2004. Acquisition of Hrs, an essential component of phagosomal maturation, is impaired by mycobacteria. Mol Cell Biol, vol. 24. no. 10, p. 4593-4604.

254. WATTON, S.J. et J. DOWNWARD. 1999. Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. Curr Biol, vol. 9. no. 8, p. 433-436.

255. WILKOWSKY, S.E., M.A. BARBIERI, P. STAHL et E.L. ISOLA. 2001. Trypanosoma cruzi: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. Exp Cell Res, vol. 264. no. 2, p. 211-218.

256. WOOLSEY, A.M., L. SUNWOO, C.A. PETERSEN, S.M. BRACHMANN, L.C. CANTLEY et B.A. BURLEIGH. 2003. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. J Cell Sci, vol. 116. no. Pt 17, p. 3611-3622.

257. WRIGHT, S.D. et S.C. SILVERSTEIN. 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. J Exp Med, vol. 158. no. 6, p. 2016-2023.

258. WYMAN, M.P., G. BULGARELLI-LEVA, M.J. ZVELEBIL, L. PIROLA, B. VANHAESEBROECK, M.D. WATERFIELD et G. PANAYOTOU. 1996. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. Mol Cell Biol, vol. 16. no. 4, p. 1722-1733.

259. WYMAN, M.P. et L. PIROLA. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. Biochim Biophys Acta, vol. 1436. no. 1-2, p. 127-150.

260. WYMANN, M.P., M. ZVELEBIL et M. LAFFARGUE. 2003. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? Trends Pharmacol Sci, vol. 24. no. 7, p. 366-376.
261. YAMADA, E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. J Biophys Biochem Cytol, vol. 1. no. 5, p. 445-458.
262. YIN, H.L., J.H. ALBRECHT et A. FATTOUM. 1981. Identification of gelsolin, a Ca²⁺-dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. J Cell Biol, vol. 91. no. 3 Pt 1, p. 901-906.
263. YU, H., J.K. CHEN, S. FENG, D.C. DALGARNO, A.W. BRAUER et S.L. SCHREIBER. 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. Cell, vol. 76. no. 5, p. 933-945.
264. YU, W., J. CASSARA et P.F. WELLER. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. Blood, vol. 95. no. 3, p. 1078-1085.
265. ZAJCHOWSKI, L.D. et S.M. ROBBINS. 2002. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. Eur J Biochem, vol. 269. no. 3, p. 737-752.
266. ZHANG, Q., J. CALAFAT, H. JANSSEN et S. GREENBERG. 1999. ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. Mol Cell Biol, vol. 19. no. 12, p. 8158-8168.
267. ZHANG, Q., D. COX, C.C. TSENG, J.G. DONALDSON et S. GREENBERG. 1998. A requirement for ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. J Biol Chem, vol. 273. no. 32, p. 19977-19981.
268. ZILBERSTEIN, D. et M. SHAPIRA. 1994. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annu Rev Microbiol, vol. 48. no., p. 449-470.

