

INRS-Institut Armand-Frappier

**Rôles des Toll-like receptors (TLRs) dans la  
reconnaissance des promastigotes de  
*Leishmania donovani* par le macrophage**

Par

Jean-Frédéric Flandin

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Dr Charles Dozois INRS-Institut Armand-Frappier
Examineurs externes	Dr Salman Qureshi Centre for the study of Host Resistance Université McGill
	Dre Sachiko Sato Faculté de médecine Université Laval
Directeur de recherche	Dr Albert Descoteaux INRS-Institut Armand-Frappier

## RÉSUMÉ

La leishmaniose représente une maladie grave et endémique dans plusieurs pays en voie de développement et, à ce titre, représente un grave problème de santé publique. La forme la plus grave de cette parasitose, la leishmaniose viscérale, est causée par le parasite *L. donovani*. Le macrophage, cellule-hôte de ces parasites, joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire, et l'interaction entre les promastigotes de *Leishmania* et le macrophage est une étape clé pour le déroulement de l'infection.

Alors que les promastigotes de *L. donovani* pénètrent silencieusement dans les macrophages naïfs afin d'établir l'infection, les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  déclenchent une réponse immunitaire permettant le contrôle des parasites. Cette observation nous a permis d'émettre l'hypothèse qu'un récepteur de reconnaissance du promastigote de *L. donovani* est induit par l'IFN- $\gamma$ . Dans la première publication, nous avons démontré que TLR3 est le seul TLR dont l'expression est induite par l'IFN- $\gamma$ . De plus, nous avons démontré que ce récepteur est primordial pour la sécrétion de NO et de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  en réponse aux promastigotes de *L. donovani*, et donc dans l'activité leishmanicide de ces cellules. Finalement, nos résultats confirment le rôle de TLR2 dans la reconnaissance des unités répétées des phosphoglycans de *Leishmania* et l'implication des TLRs dans l'internalisation des promastigotes.

En réponse à un pathogène, les macrophages induisent l'expression de plusieurs gènes importants pour le contrôle de l'infection. Dans le deuxième papier présenté, nous avons étudié l'effet d'une stimulation de *L. donovani* sur l'expression des différents TLRs. Nos résultats démontrent que les promastigotes induisent l'expression de TLR3 suite à leur phagocytose par les macrophages naïfs. En plus, l'utilisation de divers signaux phagocytiques démontre que l'induction de TLR3 fait partie d'un mécanisme général du macrophage découlant de la phagocytose, permettant ainsi d'identifier TLR3 comme un « senseur » de particules ingérées.

Les travaux réalisés lors de ces études démontrent que TLR3 est important pour identifier les particules ingérées. Ainsi, son rôle dans la reconnaissance et le déclenchement d'une réponse immunitaire adéquate envers *L. donovani* est primordial.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xi
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>5</b>
<b>1. <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Les parasitoses.....</b>	<b>6</b>
1.1.1 La leishmaniose.....	6
1.1.1.1 La leishmaniose cutanée .....	8
1.1.1.2 La leishmaniose muco-cutanée .....	9
1.1.1.3 La leishmaniose viscérale .....	9
1.1.1.4 Co-infections <i>Leishmania</i> /VIH.....	12
1.1.2 Les traitements .....	12
1.1.2.1 Méthodes prophylactiques .....	12
1.1.2.2 Méthodes curatives .....	13
1.1.2.3 Les vaccins.....	14
<b>1.2 Les <i>Leishmania</i> .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Cycle de vie de <i>Leishmania</i> .....	16
1.2.2 La mouche des sables .....	18
1.2.3 Le RNA editing .....	21
1.2.4 Les glycoconjugués de <i>Leishmania</i> .....	23
1.2.4.1 Le lipophosphoglycan (LPG).....	23
1.2.4.2 Les GIPLs .....	26
1.2.4.3 GP63 .....	27
1.2.4.4 Le proteophosphoglycan.....	28
1.2.4.5 La phosphatase alcaline sécrétée.....	28

<b>2.</b>	<b><i>L'immunité innée</i></b> .....	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Le macrophage</b> .....	<b>30</b>
2.1.1	La phagocytose.....	30
2.1.1.1	La dynamique membranaire durant la phagocytose.....	34
2.1.1.2	Les récepteurs phagocytiques .....	35
<b>2.2</b>	<b>Le système du complément</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3</b>	<b>La réponse aux microorganismes pathogènes</b> .....	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b><i>Les Toll-like receptors</i></b> .....	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Historique</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Les motifs moléculaires associés aux microorganismes pathogènes</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Signalisation</b> .....	<b>46</b>
3.3.1	La signalisation MyD88-dépendante.....	47
3.3.2	La signalisation TRIF-dépendante .....	47
3.3.3	Autres protéines adaptatrices.....	49
<b>3.4</b>	<b>Régulation négative des TLRs</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5</b>	<b>Rôles biologiques des TLRs</b> .....	<b>52</b>
<b>3.6</b>	<b>Les NLRs et les RLRs</b> .....	<b>52</b>
3.6.1	Les NOD-like receptors.....	53
3.6.2	Les RIG-like receptors .....	53
<b>4.</b>	<b><i>Interaction Leishmania-macrophage</i></b> .....	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>L'internalisation des promastigotes</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Retard dans la maturation du phagosome</b> .....	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>Altération des voies de signalisation</b> .....	<b>59</b>
4.3.1	Inhibition de la production de NO et ROI .....	59
4.3.2	Inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.....	61
4.3.3	Activation de la production de cytokines anti-inflammatoires.....	61
4.3.4	Inhibition des PKC .....	62
4.3.5	Les MAP kinases.....	63
4.3.6	Inhibition de la voie des JAK/STAT .....	63
4.3.6.1	Induction des SOCS.....	63
4.3.6.2	Activation de SHP-1 .....	64

4.4	Le macrophage activé à l'IFN- $\gamma$ contrôle <i>Leishmania</i> .....	64
4.5	Reconnaissance de <i>Leishmania</i> par les TLRs .....	65
<b>PREMIÈRE PUBLICATION.....</b>		<b>68</b>
	Résumé de la première publication.....	69
	Summary.....	72
	Introduction.....	73
	Results.....	75
	Discussion.....	79
	Materials and methods.....	82
	References.....	87
	Figure legends.....	94
	Figures.....	97
<b>DEUXIÈME PUBLICATION.....</b>		<b>104</b>
	Résumé de la deuxième publication.....	105
	Abstract.....	108
	Introduction.....	109
	Materials and methods.....	111
	Results.....	114
	Discussion.....	118
	References.....	123
	Figure legends.....	127
	Figures.....	130
<b>RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....</b>		<b>137</b>
<b>DISCUSSION.....</b>		<b>145</b>
	<b>1. TLR3 reconnaît la forme promastigote de <i>L. donovani</i>.....</b>	<b>146</b>
	1.1 L'IFN- $\gamma$ induit l'expression de TLR3.....	146

1.1.1 Autres indices de l'implication de TLR3.....	148
1.2 Utilisation du RNAi.....	149
1.3 TLR3 est important pour la sécrétion de NO et TNF- $\alpha$ .....	150
1.4 Autres rôles de TLR3 dans la reconnaissance de <i>L. donovani</i> .....	152
1.5 Ligands potentiels de TLR3.....	154
1.6 Coopération entre les TLRs.....	157
1.7 Rôles des TLRs dans le développement de médicaments.....	159
1.8 Facteur génétique.....	159
<b>2. TLR3 est un senseur de l'identité des particules internalisées.....</b>	<b>161</b>
2.1 Induction de TLR3 par les promastigotes de <i>L. donovani</i> .....	161
2.2 Mécanismes d'induction de TLR3.....	163
2.2.1 Induction de TLR3 suite à la phagocytose.....	163
2.3 Altération de la fonction de TLR3 par <i>Leishmania</i> .....	165
2.3.1 La localisation du récepteur.....	165
2.3.2 Altération de la voie de signalisation des TLR.....	166
 <b>CONCLUSION.....</b>	 <b>168</b>
 <b>REMERCIEMENTS.....</b>	 <b>171</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	 <b>174</b>
 <b>ANNEXE 1.....</b>	 <b>236</b>
 <b>ANNEXE 2.....</b>	 <b>238</b>

# Liste des figures

## Revue de littérature

<b>Figure 1</b> : Distribution de la leishmaniose .....	7
<b>Figure 2</b> : La leishmaniose .....	10
<b>Figure 3</b> : Le parasite <i>Leishmania</i> .....	15
<b>Figure 4</b> : Cycle de vie de <i>Leishmania</i> .....	17
<b>Figure 5</b> : RNA editing .....	22
<b>Figure 6</b> : Les glycoconjugués de <i>Leishmania</i> .....	24
<b>Figure 7</b> : La différenciation en macrophage .....	31
<b>Figure 8</b> : La phagocytose .....	33
<b>Figure 9</b> : Structure de TLR3 .....	45
<b>Figure 10</b> : Voies de signalisation des TLRs .....	48
<b>Figure 11</b> : Coopération entre les TLRs et les NLRs .....	54
<b>Figure 12</b> : <i>Leishmania</i> retarde la maturation du phagosome .....	58
<b>Figure 13</b> : La réponse immunitaire envers les promastigotes de <i>Leishmania</i> .....	66

## Première publication

<b>Figure 1</b> : IRAK-1 is activated in IFN- $\gamma$ -primed macrophages during infection with <i>L. donovani</i> promastigotes .....	97
<b>Figure 2</b> : TLR3 is up-regulated in IFN- $\gamma$ -primed macrophages .....	98
<b>Figure 3</b> : RNAi inhibits the expression of IRAK-1, MyD88, TLR2 and TLR3 .....	99
<b>Figure 4</b> : The silencing of IRAK-1, MyD88, TLR2 and TLR3 impairs NO secretion by IFN- $\gamma$ -primed macrophages exposed to <i>L. donovani</i> promastigotes .....	100
<b>Figure 5</b> : The silencing of IRAK-1, MyD88, TLR2 and TLR3 impairs TNF- $\alpha$ secretion by IFN- $\gamma$ -primed macrophages exposed to <i>L. donovani</i> promastigotes .....	101

<b>Figure 6 : TLR2 and TLR3 participate in the phagocytosis of <i>L. donovani</i> promastigotes.....</b>	<b>102</b>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure 7 : TLR3 plays a role in the leishmanicidal activity of IFN-<math>\gamma</math>-primed macrophages.....</b>	<b>103</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

## **Deuxième publication**

<b>Figure 1 : TLR3 mRNA is induced by <i>L. donovani</i> promastigotes.....</b>	<b>130</b>
---------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure 2 : TLR3 mRNA is not induced by Gal<math>\beta</math>1,4Man-PO<sub>4</sub>-deficient <i>L. donovani</i> promastigotes.....</b>	<b>131</b>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure 3 : TLR3 expression is induced by <i>L. donovani</i> promastigotes.....</b>	<b>132</b>
---------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure 4 : TLR3 mRNA induction is not caused by <i>L. donovani</i> DNA, RNA or proteins.....</b>	<b>133</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure 5 : TLR3 mRNA induction occurs following phagocytosis of <i>L. donovani</i> promastigotes.....</b>	<b>134</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure 6 : TLR3 mRNA is induced following a phagocytic signal.....</b>	<b>135</b>
---------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure 7 : TLR3 is located at the membrane of <i>Leishmania</i>-containing phagosomes.....</b>	<b>136</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

## **Figures supplémentaires**

<b>Figure S1 : <i>L. donovani</i> induit la transcription d'iNOS et TNF-<math>\alpha</math> dans les macrophages activés à l'IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>138</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure S2 : <i>L. donovani</i> induit IL-12p40 dans les macrophages activés à l'IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>139</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure S3 : TLR2 et TLR3 sont localisés à la membrane des phagosomes contenant les promastigotes de <i>L. donovani</i>.....</b>	<b>140</b>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure S4 : Les TLRs permettent l'internalisation des promastigotes.....</b>	<b>141</b>
---------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Figure S5 : TLR3 est impliqué dans la sécrétion de NO et de TNF-<math>\alpha</math> en réponse à <i>L. donovani</i>, <i>L. major</i> et <i>L. infantum</i>.....</b>	<b>142</b>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------



**Figure S6 : A la recherche du ligand de TLR3.....143**  
**Figure S7 : L'ARNg ne cause pas la sécrétion de NO et de TNF- $\alpha$ .....144**

## Liste des tableaux

<b>Tableau I : <i>Leishmania</i> et ses vecteurs .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau II : Les TLRs reconnaissent des PAMPs .....</b>	<b>43</b>

## Liste des abréviations

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Activated protein-1
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BMM	Bone marrow-derived macrophages
CD	Cluster of differentiation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CR	Complement receptor
db	double brin
DD	Death domain
ER	Réticulum endoplasmique
ERK	Extracellular regulated kinase
FcR	Récepteur du fragment Fc des immunoglobulines
GFP	Green fluorescent protein
GIPL	Glycosyl-inositolphospholipide
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
ISRE	IFN-stimulated response elements
JAK	Janus activated kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LBP	LPS binding protein
LPG	Lipophosphoglycan

LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
Mal	MyD88 adaptor-like
MAPk	Mitogen-activated protein kinase
MR	Récepteur mannose
MyD88	Myeloid differentiation protein 88
NF-	Nuclear factor
NK	Natural killer
NLR	NOD-like receptors
NO	Oxyde nitrique
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
nt	nucléotide
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PG	Phosphoglycan
PGN	Peptidoglycan
PI3k	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PPG	Protéophosphoglycan
PRR	Pattern recognition receptor
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
PS	Phosphatidylsérine
PTK	Protein tyrosine kinase
RLR	RIG-like receptors
RNAi	RNA interference
sAP	alcaline phosphatase sécrétée
SARM	sterile alpha and HEAT/Armadillo motif
sb	simple brin
SHP	Src homology 2 domain phosphotyrosine phosphatase
si	Small interfering (RNA)
SOCS	Suppressors of cytokine signaling

SR	Scavenger receptor
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TDR	Tropical disease research
TGF	Tumor growth factor
Th	T helper
TICAM	TIR containing adaptor molecule
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Tollip	Toll-interacting protein
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN $\beta$

# **INTRODUCTION**

En considérant le nombre d'années perdues pour cause de mort prématurée ou d'infirmité (DALYs), la leishmaniose est la seconde maladie tropicale en importance après la malaria (OMS). Endémique sur tous les continents (à l'exception de l'Océanie), cette parasitose constitue un important problème de santé publique dans un très grand nombre de pays sous-développés ou en voie de développement. La recherche pharmaceutique se concentrant principalement sur les problèmes de nos pays industrialisés et non sur les maladies tropicales, plusieurs de celles-ci souffrent d'un sous-financement chronique, d'où l'inclusion de la leishmaniose dans le groupe des maladies négligées. Regroupées sous le terme de leishmaniose, on retrouve trois différentes maladies variant en intensité et manifestations cliniques. Alors que la leishmaniose cutanée se résorbe généralement d'elle-même, la leishmaniose viscérale est mortelle si non traitée. Ainsi, *Leishmania donovani*, l'agent causal de la leishmaniose viscérale, est un important pathogène humain. Les leishmanies sont des parasites biphasiques alternant entre deux formes : les promastigotes dans leur vecteur, la mouche des sables, et les amastigotes dans les phagolysosomes des macrophages. Inoculés dans le sang de l'hôte mammifère lors d'un repas sanguin par une mouche des sables infectée, les promastigotes sont rapidement phagocytés par les macrophages. Suite à leur internalisation, ceux-ci se différencient en amastigotes, soit la forme pouvant survivre et proliférer dans l'environnement hostile du phagolysosome. Cette étape du contact initial entre le promastigote et le macrophage représente l'étape-clé dans l'établissement de l'infection. De nombreuses études ont démontré *in vivo* que le patron de cytokines dans l'environnement est un élément essentiel. Alors qu'un environnement de type Th2 (IL-4, IL-10) permet l'établissement de l'infection et ultimement le développement de la leishmaniose, un patron en cytokines de type Th1 (IL-12, IFN- $\gamma$ ) confère la résistance envers les leishmanies.

Depuis une dizaine d'années, plus précisément depuis la découverte et la caractérisation des Toll-like receptors (TLRs), l'immunité innée occupe une place de choix dans la recherche envers les différents microorganismes pathogènes. Anciennement considérée comme étant trop primitive, l'immunité innée permet

maintenant, depuis la caractérisation des TLRs, de bien comprendre la réponse envers différents microorganismes. En effet, ces récepteurs transmembranaires de type I reconnaissent des motifs moléculaires associés aux microorganismes pathogènes (PAMPs) et déclenchent la réponse immunitaire appropriée afin de combattre l'envahisseur.

En réponse à une attaque par un microorganisme, la cellule immunitaire entreprend une reprogrammation intensive de son transcriptome. Via l'induction de différents gènes, la cellule acquiert les armes nécessaires à combattre avec succès cet ennemi. L'étude des gènes régulés positivement suite à la rencontre avec l'envahisseur donne un indice quant à l'identité des protéines nécessaires à une réponse immunitaire appropriée. D'ailleurs, l'augmentation de l'expression d'un TLR suite à une stimulation par un microorganisme pathogène est généralement un indice de son implication dans la réponse immunitaire.

Tel que mentionné précédemment, l'interaction entre les promastigotes et le macrophage est l'étape fondamentale dans l'établissement de l'infection. Plusieurs études ont démontré que *in vitro*, les macrophages préalablement activés à l'IFN- $\gamma$  peuvent adéquatement tuer et donc résister à une infection par *Leishmania*. Dans notre laboratoire, nous avons précédemment démontré que, chez les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ , les voies de signalisation p38 MAPk et ERK1/2 sont activées en réponse aux promastigotes de *L. donovani*. De plus, chez ces macrophages, l'infection résulte en la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 ainsi qu'en la sécrétion de NO, IL-1 et TNF- $\alpha$ .

Étant donné l'importance des TLRs dans la réponse immunitaire innée envers de nombreux microorganismes pathogènes, plusieurs groupes se sont penchés sur le rôle de ces récepteurs dans la reconnaissance et la réponse immunitaire envers les leishmanies. Jusqu'à présent, deux différents TLRs ont été reliés à la réponse immunitaire envers *L. major*, soit TLR2 et TLR4. Cependant, ces deux récepteurs sont



exprimés chez les macrophages au repos, ils ne peuvent donc pas, à eux seuls, expliquer la différence dans la réponse immunitaire entre les macrophages naïfs et activés à l'IFN- $\gamma$ . Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'un récepteur de reconnaissance est induit par l'IFN- $\gamma$  et confère la résistance aux leishmanies chez ces macrophages. Ce projet de recherche a donc comme objectif général de comprendre le rôle des PRRs dans la réponse immunitaire envers *L. donovani*. Plus spécifiquement, deux objectifs peuvent ressortir de l'ensemble des travaux effectués :

1) Identifier et caractériser le récepteur présent chez les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  qui permet efficacement de combattre une infection par *L. donovani*

2) Étudier l'effet de *L. donovani* sur l'expression des différents TLRs dans les macrophages au repos

Les différents résultats obtenus lors de ces longues années de doctorat sont ici présentés en deux articles. Le premier, traitant du rôle de TLR2 et TLR3 dans la reconnaissance des promastigotes de *L. donovani*, a été publié plus tôt cette année dans *European Journal of Immunology*. Le second article est présentement sous forme de manuscrit et sera soumis incessamment à *Journal of Immunology*. Suite à la publication du premier article, le journal *Modern Aspects of Immunobiology* nous a contacté afin d'écrire un résumé de nos travaux sous la forme d'interview (Annexe I). Pour débiter cette thèse, la revue de littérature qui suit permet d'exposer l'état des connaissances dans les quatre domaines importants dans cette recherche, soit 1) *Leishmania*, 2) l'immunité innée, 3) les TLRs et 4) l'interaction *Leishmania*/macrophage.

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

# **1 Leishmania**

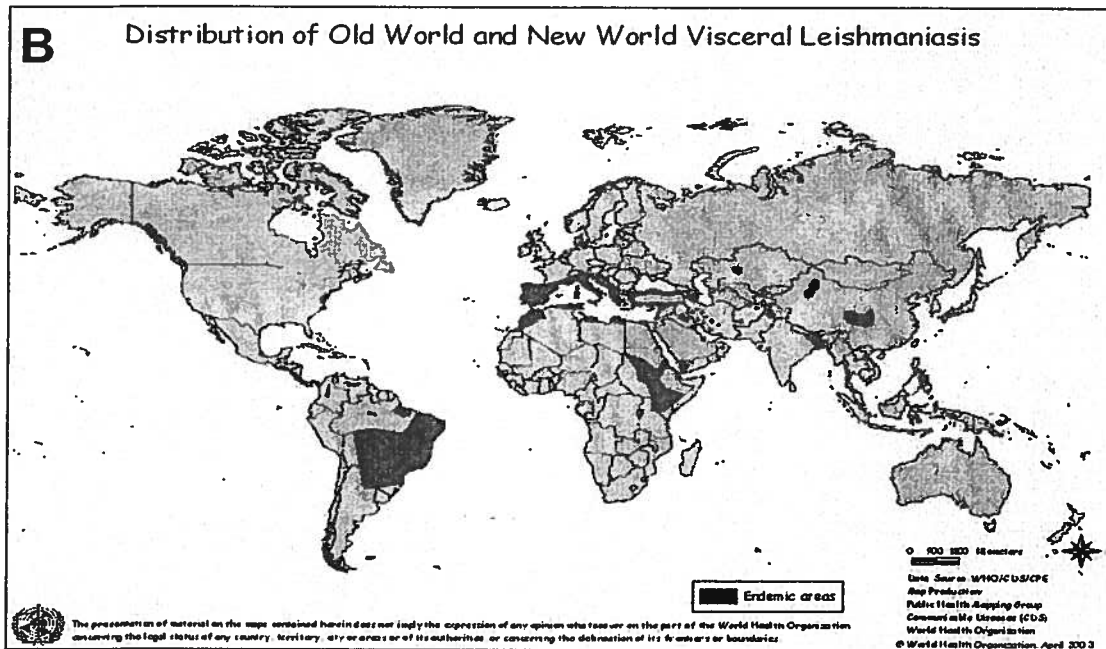
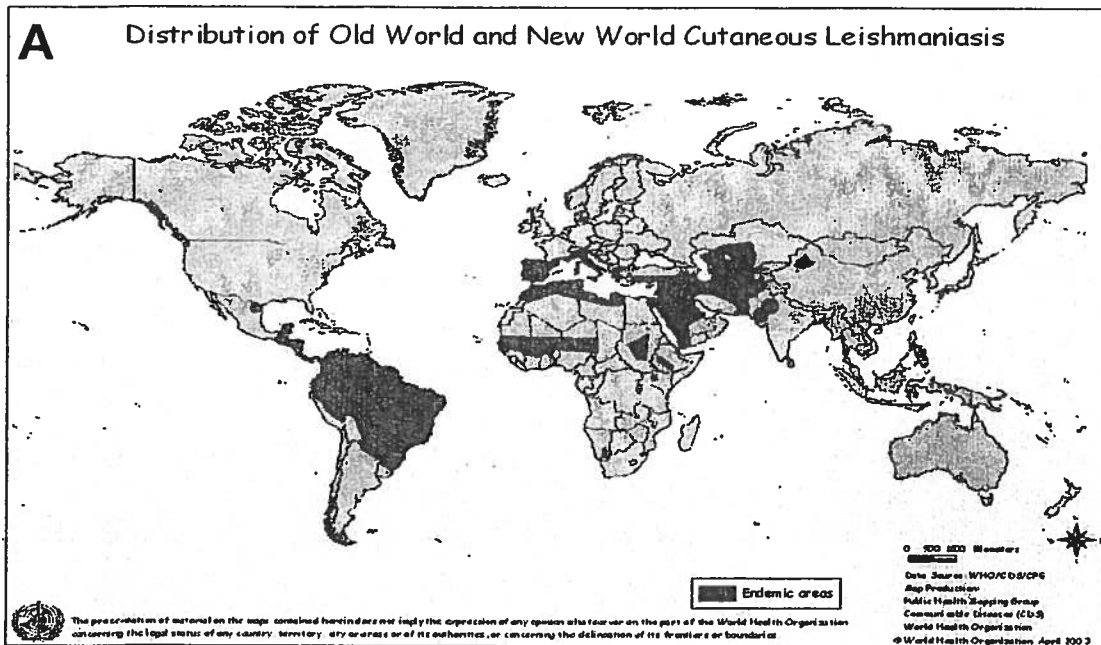
## **1.1 Les parasitoses**

Depuis les 30 dernières années, la médecine a fait des bonds de géant, l'espérance de vie augmentant de quatre mois en moyenne à chaque année. Cependant, les répercussions ne sont pas égales pour tous. Dans nos pays industrialisés, les maladies causées par les parasites ne représentent environ qu'1% des décès annuels. Cependant, dans les pays en voie de développement ou sous-développés, les parasites causent environ 40% des mortalités. En 1999, les maladies infectieuses ont causé 14 millions de morts dans ces pays (Organisation Mondiale de la Santé, OMS).

Ce déséquilibre se reflète aussi dans l'industrie pharmaceutique. Entre 1975 et 2000, 1393 nouveaux médicaments ont été homologués. De ce nombre, seulement 15 nouveaux médicaments ciblent les maladies infectieuses. Par opposition, 179 nouveaux médicaments ont été homologués pour les maladies cardio-vasculaires seulement (Trouiller *et al.*, 2002). Devant cette situation très préoccupante, l'OMS a démarré en 1975 le programme «Tropical disease research (TDR)» afin de favoriser la recherche sur dix grandes maladies infectieuses négligées soit 1) la trypanosomiase africaine (maladie du sommeil), 2) la fièvre dengue, 3) la leishmaniose, 4) la malaria, 5) la schistosomiase, 6) la tuberculose, 7) la trypanosomiase sud-américaine (maladie de Chagas), 8) la lèpre, 9) les filarioses lymphatiques et 10) l'onchocerciose (OMS, TDR).

### **1.1.1 La leishmaniose**

Environ 12 millions de personnes réparties dans 88 pays souffrent de leishmaniose avec deux millions de nouveaux cas déclarés à chaque année (1,5 millions leishmaniose cutanée, 500 000 leishmaniose viscérale) (Figure 1). Selon l'OMS, la leishmaniose cause 2,4 millions DALYs (disability-adjusted life years-nombre d'années perdues pour cause d'infirmité ou de mort prématurée) et 70 000 décès annuellement.



Source: OMS (2003)

**FIGURE 1: DISTRIBUTION DE LA LEISHMANIOSE** La leishmaniose est décelée dans 88 pays à travers le monde. A) L’Afghanistan, l’Arabie Saoudite, l’Algérie, le Brésil, l’Iran, l’Irak, la Syrie et le Soudan regroupent 90% des cas de leishmaniose cutanée. B) Le Brésil, l’Inde et le Soudan regroupent 90% des cas de leishmaniose viscérale.

Endémique principalement en Amérique du Sud, en Asie du Sud-Est et en Afrique subsaharienne, la leishmaniose est considérée comme une maladie de la pauvreté. En effet, les personnes atteintes de cette parasitose vivent principalement dans les zones rurales et les banlieues défavorisées des pays en voie de développement. Par exemple, une étude récente en Inde a démontré que 88% des personnes atteintes avaient un revenu inférieur à 2\$ US par jour, un environnement socioculturel pauvre et un faible taux d'éducation (rapport annuel, TDR 2005). De plus, les principales épidémies de leishmaniose au Soudan suivent les grands mouvements de populations causés par les inondations, les famines et les conflits (Zijlstra et El-Hassan, 2001).

Le terme leishmaniose réfère à trois maladies différentes ayant des manifestations cliniques distinctes et étant causées par différentes espèces du parasite *Leishmania spp.* La leishmaniose se manifeste généralement suite à l'inoculation des parasites par la mouche des sables (sandfly) femelle du genre *Phlebotomus sp.* (Ancien monde) ou *Lutzomyia sp.* (Nouveau monde) lors d'un repas sanguin. Cependant, la transmission de la leishmaniose peut aussi survenir via le sang soit par l'utilisation de seringues infectées, transfusion sanguine ou transplantation d'organes (Amela *et al.*, 1996, Singh *et al.*, 1996, Barsoum, 2004).

#### 1.1.1.1 La leishmaniose cutanée

La forme la plus bénigne, mais la plus répandue (1,5 millions de nouveaux cas par année) est la leishmaniose cutanée. Cette maladie est caractérisée par l'apparition de papules rouges sur la peau au site d'inoculation quelques jours ou semaines après l'infection (Figure 2B). Ces papules peuvent ensuite former un ulcère. Heureusement, la leishmaniose cutanée est généralement sans conséquence grave pour une personne possédant un système immunitaire normal, les lésions se résorbant d'elles-mêmes après quelques mois (Murray *et al.*, 2005). Ainsi, les principaux stigmates des patients atteints de leishmaniose cutanée sont sociaux et non médicaux. Endémique dans de nombreux pays, 90% des cas se retrouvent en Afghanistan, Arabie Saoudite, Algérie, Brésil, Iran, Irak, Syrie et Soudan (Figure 1A) (OMS). D'ailleurs, dès le XV<sup>ième</sup> et

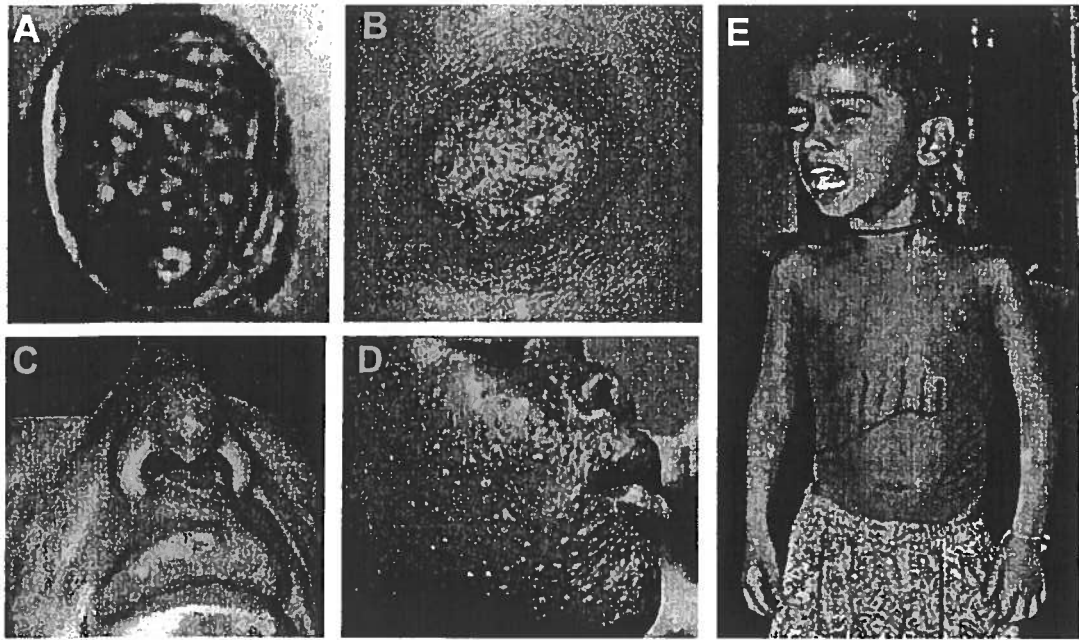
XVI<sup>ième</sup> siècle, des textes Incas mentionnent cette mystérieuse « maladie des Andes » affligeant de nombreux agriculteurs. En plus, des fouilles archéologiques ont révélé des statues de l'époque pré-colombienne présentant des visages avec les symptômes de la leishmaniose (Figure 2A) (OMS). Les trois principales espèces du parasite causant la leishmaniose cutanée sont *L. major*, *L. tropica* et *L. mexicana*.

### 1.1.1.2 La leishmaniose muco-cutanée

Une variante de la leishmaniose cutanée se retrouve en Amérique centrale, entre le centre du Mexique et le nord de l'Argentine, principalement en Bolivie, au Brésil et au Pérou (90% des cas). La leishmaniose muco-cutanée (ou espundia), comme la leishmaniose cutanée, cause l'apparition de papules rouges et, éventuellement, d'ulcères au site d'inoculation. L'agent responsable de cette maladie, *L. braziliensis*, possède un tropisme pour les macrophages du pharynx, de la bouche et du nez. Suite à la résorption de l'ulcère cutané, on observe (même quelques années après la guérison) l'apparition d'une dégénérescence des tissus et même l'apparition de nécroses. Ainsi, cette forme de la maladie cause des déformations via la destruction du nez, lèvres, palais et pharynx des patients infectés (Figure 2C). Cette maladie n'est pas mortelle en soi mais la formation de grandes plaies ouvertes favorise les infections secondaires potentiellement mortelles (Murray *et al.*, 2005).

### 1.1.1.3 La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale, aussi appelée Kala-Azar (fièvre noire en Hindi) est la forme la plus grave de cette maladie. Si elle n'est pas traitée, la mort s'ensuit entre 6 mois et quelques années après l'infection. Trois différentes régions sont particulièrement affligés par la leishmaniose viscérale : le Brésil, l'Inde et le Soudan (figure 1B). Ce dernier pays représentant même le foyer initial de la leishmaniose viscérale (Pratlong *et al.*, 2001). La grande épidémie de leishmaniose viscérale dans le sud du Soudan entre 1984 et 1994 a causé plus de 100 000 morts, ce qui représente



Sources : A) et E) OMS; B) et C) Herwaldt (1999); D) Zijlstra *et al.* (2003)

**FIGURE 2 : LA LEISHMANIOSE** A) Statuette pré-colombienne présentant les symptômes de la leishmaniose B) Papule typique de la leishmaniose cutanée C) Destruction de la cloison nasale, symptôme de la leishmaniose muco-cutanée D) Nodules caractéristiques de la leishmaniose cutanée post-Kala-Azar (PKDL) E) Hépatosplénomégalie causée par la leishmaniose viscérale.

environ le tiers de la population de cette région (Seaman *et al.*, 1996). En Inde, seulement dans la province de Bihar, au nord-est du pays, de 100 à 200 000 cas sont détectés par année (OMS).

Les principales espèces de *Leishmania* causant la leishmaniose viscérale sont *L. donovani* et *L. infantum* (Vieux monde) et *L. chagasi* (Nouveau monde). Cette maladie ne cause pas de papules au site d'inoculation. Cependant, les parasites responsables de cette forme de maladie infectent préférentiellement les macrophages de la rate, du foie et de la moelle osseuse. Ainsi, on observe une augmentation de la taille de la rate et du foie (hépatosplénomégalie) et s'accompagne de fièvre, nausées, et diarrhées (Figure 2E) (Zijlstra et El-Hassan, 2001).

En plus des facteurs biologiques, les facteurs sociaux jouent aussi un rôle important dans le développement de la leishmaniose viscérale. Une étude épidémiologique dans le village de Barbar El Fugara au Soudan lors de l'épidémie des années 1995 à 1999 a démontré que même si tous les villageois ont été exposés au parasite, environ 20% ont développé la maladie. Les facteurs prédisposant à la maladie sont l'âge (les enfants et les adolescents sont plus susceptibles) et l'origine ethnique. La proximité d'animaux représente un facteur de risque supplémentaire mais seulement au début de l'épidémie (Bucheton *et al.*, 2002).

Suite à la leishmaniose viscérale, certains patients verront l'apparition de nodules dépigmentés à la surface de la peau (Figure 2D). Cette forme, nommée leishmaniose cutanée post-Kala-Azar (PKDL), apparaît généralement entre 0,5 et 13 mois après la leishmaniose viscérale. Cette maladie est surtout décelée au Soudan où jusqu'à 60% des patients développent un PKDL (Berman, 2006). Ces symptômes sont défigurant mais se résorbent généralement d'eux-mêmes (Zijlstra *et al.*, 2003).



#### **1.1.1.4 Co-infections *Leishmania*/VIH**

Étant donné que *Leishmania* se retrouve dans les pays tropicaux, où sont détectés de nombreux autres parasites, certaines personnes sont infectées par plusieurs parasites. Dans la littérature, on dénote d'ailleurs de nombreux cas de co-infections, ces personnes étant atteintes de leishmaniose avec la malaria, tuberculose ou schistosomiase (Zijlstra et El-Hassan, 2001, Murray *et al.*, 2005). Cependant, depuis quelques années, un nombre grandissant de personnes sont infectées par *Leishmania* et le VIH. Ces co-infections sont relativement nouvelles mais extrêmement sérieuses et progressent rapidement. Présentement, la majorité des cas surviennent dans le bassin méditerranéen mais, vu la situation critique du SIDA en Afrique, il est prévisible que le nombre de ces co-infections va grandement augmenter sur ce continent (Dujardin, 2006). Tel que mentionné précédemment, un faible pourcentage des personnes en contact avec les mouches des sables infectées développent la leishmaniose viscérale. Cependant, le SIDA et la leishmaniose viscérale sont reliés en un cercle vicieux. En effet, les patients immunosupprimés courent de 100 à 1000 fois plus de chance de développer la leishmaniose viscérale. En plus, les deux maladies se renforcent mutuellement. Étant donné que les deux maladies ciblent les mêmes cellules, la sévérité des symptômes et leurs conséquences sont exponentiellement augmentées (Olivier *et al.*, 2003, Cruz *et al.*, 2006). Preuve de la dangerosité de ces co-infections, des leishmanies hybrides *L. infantum-L. major* possédant les caractéristiques enzymatiques des deux espèces ont récemment été isolés chez deux patients immunosupprimés (Ravel *et al.*, 2006).

### **1.1.2 Les traitements**

#### **1.1.2.1 Méthodes prophylactiques**

Premièrement, la meilleure façon de ne pas développer la leishmaniose consiste à éviter l'exposition aux piqûres de la phlébotome. Par exemple, l'utilisation

d'un filet de nuit imprégné d'insecticide, qui empêche la mouche des sables de prendre un repas sanguin, se révèle une méthode efficace (Bern *et al.*, 2000, Davies *et al.*, 2003). En plus, l'OMS recommande d'autres méthodes telles que l'épandage d'insecticides ainsi que l'établissement d'une séparation claire entre le bétail et la population (OMS, TDR).

### 1.1.2.2 Méthodes curatives

La leishmaniose est généralement traitée avec l'administration parentérale de produits antimoniaux découverts en 1930 (sodium stibogluconate, meglumine antimonate). Malheureusement, ce traitement nécessite une hospitalisation de plusieurs semaines, ce qui entraîne un coût prohibitif, et s'accompagne de nombreux effets secondaires toxiques (Herwaldt, 1999). Depuis quelques années, on observe l'apparition de résistance. Par exemple, dans la province de Bihar en Inde, jusqu'à 65% des nouveaux cas de leishmaniose viscérale ne répondent pas au traitement avec les antimoniaux pentavalents. La situation au Soudan laisse aussi présager l'apparition de résistances très prochainement (Guerin *et al.*, 2002). Heureusement, quelques alternatives existent telles que l'administration d'amphotéricine B, qui traite avec succès 97% des cas de leishmaniose viscérale. Cependant cette forme de traitement cause aussi différents effets toxiques. Ceux-ci peuvent être renversés par l'administration à l'aide de liposomes mais cette formulation est très dispendieuse (dix fois plus chère que la forme classique). Ainsi, même si ces liposomes réduisent significativement la durée de l'hospitalisation, ils restent inaccessibles dans de nombreux pays (Sundar et Chatterjee, 2006).

Le miltefosine (un inhibiteur de la biosynthèse des phospholipides et des stérols chez les trypanosomes (Urbina, 1997)) est un nouveau médicament fort prometteur. De nombreuses études cliniques ont démontré l'efficacité de cette drogue pour le traitement de la leishmaniose tant viscérale (Sundar *et al.*, 2002, Bhattacharya *et al.*, 2004) que cutanée (Soto *et al.*, 2004). En plus, l'avantage majeur de ce produit est qu'il est administré oralement.

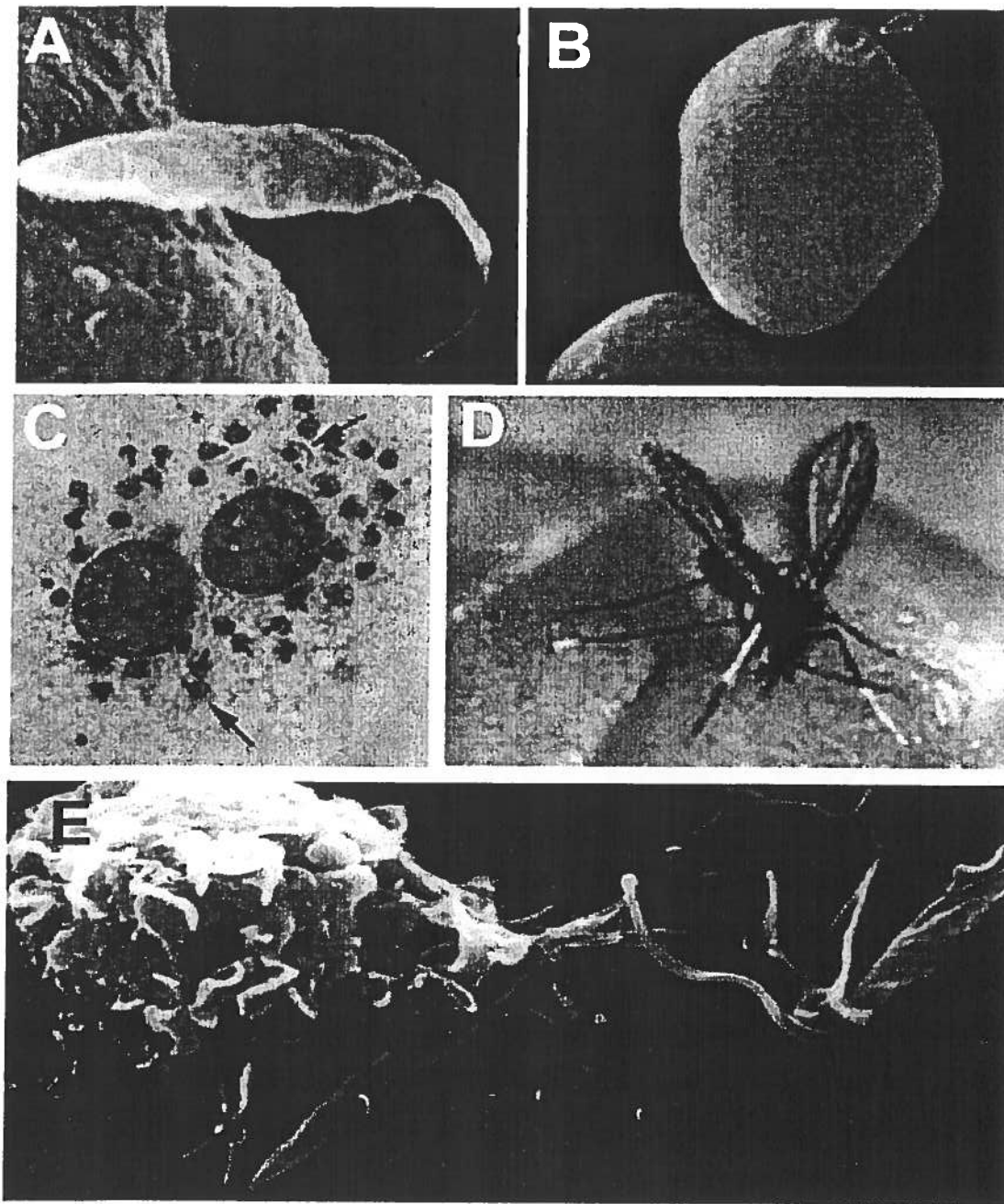
### 1.1.2.3 Les vaccins

Jusqu'à présent, et malgré de nombreuses tentatives, aucun vaccin intéressant n'a été développé envers la leishmaniose. La première génération de vaccins contre *Leishmania* utilisant des parasites tués semble sécuritaire et immunogène en laboratoire mais leur efficacité reste à démontrer sur le terrain (Daneshvar *et al.*, 2003). Présentement, quelques vaccins de seconde génération utilisant différents antigènes des leishmanies avec ou sans adjuvants sont présentement à l'essai (Khamesipour *et al.*, 2006, rapport annuel, TDR 2005). Il y a quelques années, la leishmanisation (infection par *L. major* vivants produisant une résistance naturelle) donnait de bons résultats pour prévenir la leishmaniose cutanée mais cette forme de traitement a dû être arrêtée car certaines personnes développaient de graves lésions (Murray *et al.*, 2005). Récemment, le génome de *L. major* a été complètement séquencé, ce qui permet d'espérer de meilleurs médicaments dans les années futures (El-Sayed *et al.*, 2005, Ivens *et al.*, 2005).

## 1.2 Les *Leishmania*

En 1900, Sir William Leishman remarqua, sur un frottis réalisé sur la rate d'un soldat supposément décédé de la fièvre Dum-dum en Inde, la présence de nombreux corps ovales ou ronds de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre dans les cellules de la rate (Figure 3C) (Leishman, 1903). Quelques mois après la publication de ces observations dans le *British medical journal*, le capitaine Charles Donovan déclara qu'il avait réalisé les mêmes observations sur des biopsies d'indiens supposément décédés de la malaria (Donovan, 1903). Ce parasite fut ensuite nommé *Leishmania donovani* en leur honneur.

Membres de la famille des *Trypanosomatidae*, les *Leishmania* sont des organismes unicellulaires caractérisés par la présence d'un flagelle et d'un kinétoplaste, un organelle riche en ADN. Phylogénétiquement, les leishmanies sont séparés en deux sous-genres : *Leishmania* et *Viannia*, selon la position du parasite dans l'intestin du



Sources: A) et B) Roberts *et al.* (2000) ; C) Murray *et al.* (2005) ; D) OMS ; E) Holm *et al.* (2001)

**FIGURE 3 : LE PARASITE *LEISHMANIA*** A) Promastigote et B) amastigote de *Leishmania* par microscopie électronique à balayage C) Amastigotes dans un macrophage D) Phlébotome prenant un repas sanguin E) Promastigote de *Leishmania* attaché à un macrophage.

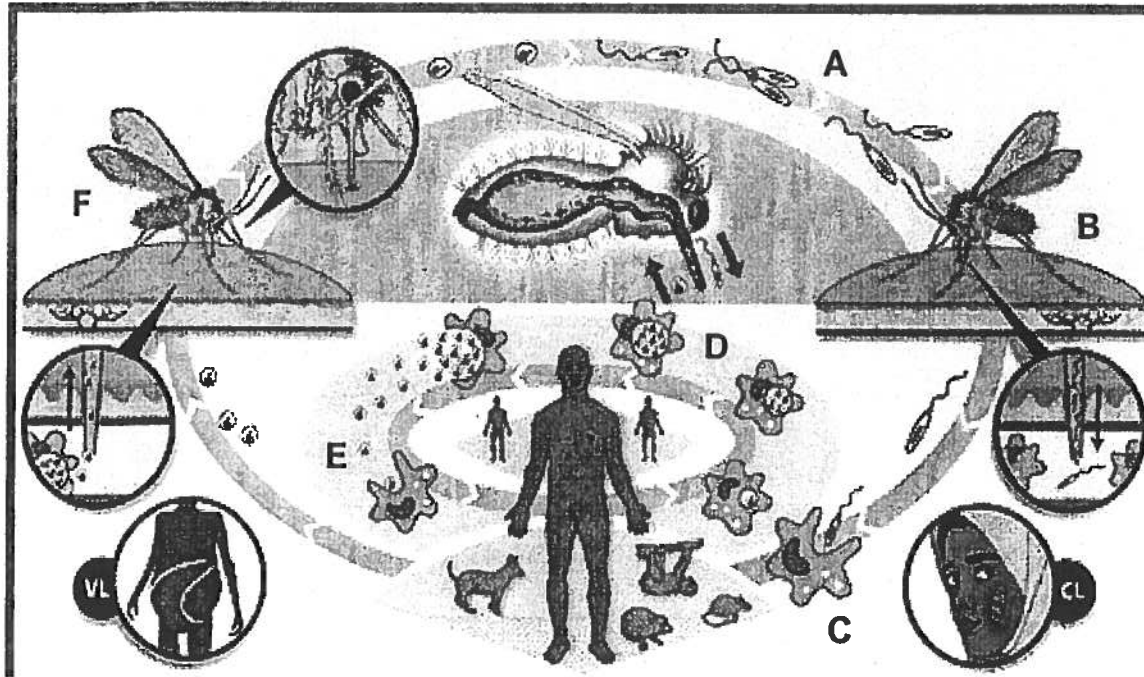
vecteur (respectivement centrale ou postérieure). Comme plusieurs parasites, les leishmanies sont biphasiques, alternant entre les stades promastigotes et amastigotes.

### 1.2.1 Cycle de vie de *Leishmania*

Au niveau morphologique, la forme promastigote (Figure 3A) est caractérisée par un corps long d'environ 10  $\mu\text{m}$  et étroit d'environ 3  $\mu\text{m}$ . De plus, on observe la présence d'un flagelle et un dense glycocalyx composé principalement de lipophosphoglycan (LPG) qui sera discuté prochainement (voir section 1.2.4.1). Quant à elle, la forme amastigote (Figure 3B et 3C) est plutôt arrondie (3 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre), non flagellée, et possède peu de LPG à sa surface.

Le cycle de vie de *Leishmania* est bien caractérisé (Figure 4). Premièrement, les leishmanies sous leur forme promastigote se retrouvent attachés aux cellules épithéliales du tractus alimentaire de la mouche des sables. Ces promastigotes sont dits procycliques car ils se multiplient rapidement et sont généralement peu infectieux. Environ sept jours après l'infection de la mouche et suite à un signal encore peu connu, il y a le déclenchement de la métacyclogénèse (Sacks, 1989). Lors de cette étape, plusieurs modifications, tant morphologiques que biochimiques, permettent aux promastigotes de devenir infectieux. Entre autres, il y a le doublement des unités répétées du LPG, le glycocalyx du promastigote passant d'environ 7 nm à 17 nm. En plus, des modifications dans la composition du LPG permettent le détachement du promastigote métacyclique du tractus alimentaire de la mouche et sa migration vers la partie antérieure du tube digestif. Ainsi, lors du repas sanguin suivant, les promastigotes métacycliques sont inoculés dans un hôte et rapidement phagocytés par les macrophages (Figure 3D et 3E) (Sacks, 1989, Sacks *et al.*, 2000, Kamhawi, 2006).

Une fois dans le phagosome du macrophage, les promastigotes se différencient en amastigotes, la forme pouvant survivre et proliférer dans l'environnement hostile du



Source : TDR

**FIGURE 4 : CYCLE DE VIE DE *LEISHMANIA*** A) Dans la mouche des sables, on retrouve les *Leishmania* sous leur forme promastigote. B) Lors d'un repas sanguin, la mouche des sables inocule les promastigotes dans l'hôte mammifère. C) Les promastigotes sont phagocytés par les macrophages. D) Les *Leishmania* se différencient en amastigotes et prolifèrent dans les phagolysosomes. E) Les amastigotes causent la destruction du macrophage et infectent les macrophages avoisinants. F) Lors d'un repas sanguin, la mouche des sables ingère des amastigotes, ils se différencient en promastigotes dans la mouche des sables.

phagolysosome. La multiplication des amastigotes dans le macrophage entraîne ultimement sa lyse et le relargage des parasites dans la matrice extracellulaire. Ces amastigotes sont ensuite phagocytés par les macrophages environnants. Lorsqu'une mouche des sables prend un repas sanguin sur un hôte infecté, elle ingère ainsi des macrophages contenant les amastigotes. Dans la mouche des sables, les amastigotes se différencient sous leur forme promastigote, complétant ainsi le cycle de vie des leishmanies (Figure 4).

### 1.2.2 La mouche des sables

Au début du XX<sup>ième</sup> siècle, devant l'incapacité à induire artificiellement la leishmaniose directement aux humains, le rôle primordial du vecteur dans la transmission des leishmanies fut démontré en 1942. Signe des temps et des normes éthiques différentes d'aujourd'hui, le rôle de *Phlebotomus argentipes* dans la transmission de *L. donovani* fut démontré grâce à cinq « volontaires » qui ont développés la leishmaniose viscérale après un contact avec ces mouches infectées (Swaminath *et al.*, 1942, 2006).

Les parasites du genre *Leishmania* sont transmis lors du repas sanguin de la mouche des sables femelle de genre *Phlebotomus* (Vieux monde) ou *Lutzomyia* (Nouveau monde) (Figure 3D et Tableau I). Jusqu'à présent, environ 70 des 1000 espèces différentes de mouche des sables peuvent transmettre les *Leishmania*. Lors d'un repas sanguin, il a été estimé que la mouche régurgite environ 1000 promastigotes métacycliques (Rogers *et al.*, 2004). Ainsi, selon ces conditions, on observe un ratio parasitaire assez faible d'environ 0,03 à 0,1 parasite par phagocyte. Cette faible densité permettrait aux promastigotes d'être « ignorés » par le système immunitaire de l'hôte, facilitant ainsi l'établissement de l'infection (De Almeida, 2002, De Almeida *et al.*, 2003). Comme la majorité des vecteurs des parasites, les mouches des sables ont un patron d'activité nocturne. Leur activité augmente peu après le coucher du soleil et décline progressivement jusqu'à peu après le lever du soleil, avec un pic entre 20h30 et

23h30. De plus, leur activité diminue quand la température descend sous 24°C (Morrison *et al.*, 1995).

Selon plusieurs études de terrain, il existe une forte corrélation évolutive entre l'espèce de *Leishmania* et son vecteur (Tableau I), cette spécificité est due à la structure du LPG (Killick-Kendrick, 1985). Par exemple, *P. papatasi* est une espèce de mouche présente dans plusieurs régions endémiques de leishmanioses causées par plusieurs espèces du parasite. Cependant, seulement *L. major* peut croître et se développer dans cette espèce (Pimenta *et al.*, 1994, Sacks *et al.*, 1994). En effet, il a été montré que dans *P. papatasi*, *L. major* et *L. donovani* sont présents en grand nombre aux jours deux et trois après le repas sanguin. Cependant, aux jours quatre à sept, soit peu après que le repas sanguin fut digéré et excrété, le taux d'infection reste à 90% pour *L. major* alors qu'il ne reste plus de *L. donovani* (Pimenta *et al.*, 1994, Kamhawi *et al.*, 2000). Dans la mouche des sables, le parasite doit résister aux nombreux enzymes protéolytiques présents dans le tractus alimentaire de la mouche suite à un repas sanguin. Des études ont démontré que ces enzymes de *P. papatasi* sont inhibés par une infection par *L. major* mais pas par d'autres espèces (Schlein et Romano, 1986, Borovsky et Schlein, 1987). Cette inhibition est causée par les glycoconjugués (LPG, PPG, sAP) de *Leishmania*, les mutants pour ces molécules étant tués en 24 heures après le repas sanguin (Sacks *et al.*, 2000). En plus de résister aux enzymes protéolytiques, le parasite doit s'accrocher efficacement aux cellules épithéliales du tractus alimentaire afin de ne pas être excrétés en même temps que les déchets du repas sanguin. Tel que mentionné précédemment, le LPG est responsable de cette spécificité.

Un autre point intéressant concernant la mouche des sables est sa salive. En effet, plusieurs études démontrent le rôle de la salive dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et ultimement, favorise l'établissement de l'infection. L'ajout simultané de lysat de glandes salivaires de *P. papatasi* lors d'une infection par *L. major* augmente grandement la taille et la charge parasitaire des lésions. En plus, l'ajout de lysat de glandes salivaires lors de l'infection permet d'observer une corrélation avec l'inhibition des cytokines associées à une réponse Th1 (IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-12) et



Parasite	Manifestation clinique	Distribution	Vecteur
<i>L. donovani</i>	LV; PKDL	Chine Inde	<i>P. alexandri</i> <i>P. argentipes</i>
<i>L. infantum</i>	LV; LC	Afrique de l'Est Europe Méditerranée	<i>P. martini</i> ; <i>P. orientalis</i> <i>P. ariasi</i> <i>P. langeroni</i>
<i>L. major</i>	LC	Chine Afrique; Moyen-Orient; Asie du Sud-Est	<i>P. chinensis</i> <i>P. papatasi</i>
<i>L. tropica</i>	LC	Afrique Afrique; Moyen-Orient; Asie du Sud-Est	<i>P. dubosqi</i> <i>P. sergenti</i>
<i>L. aethiopica</i>	LC; LMC	Kenya Afrique de l'Est	<i>P. saevus</i> <i>P. longipes</i> ; <i>P. pedifer</i>
<i>L. mexicana</i>	LC	Amérique centrale	<i>Lu. olmeca</i>
<i>L. chagasi</i>	LV	Brésil	<i>Lu. longipalpis</i>
<i>L. braziliensis</i>	LMC	Brésil	<i>Lu. intermedia</i> ; <i>Lu. whitmani</i>

Légende : LC : leishmaniose cutanée; LMC : leishmaniose muco-cutanée; LV : leishmaniose viscérale ; PKDL : leishmaniose cutanée post-Kala-Azar.

Adapté de Sacks (2001)

**TABLEAU I : LEISHMANIA ET SES VECTEURS** Tableau présentant différentes espèces de *Leishmania*, la forme de leishmaniose causée, sa distribution géographique et le vecteur utilisé pour sa transmission.

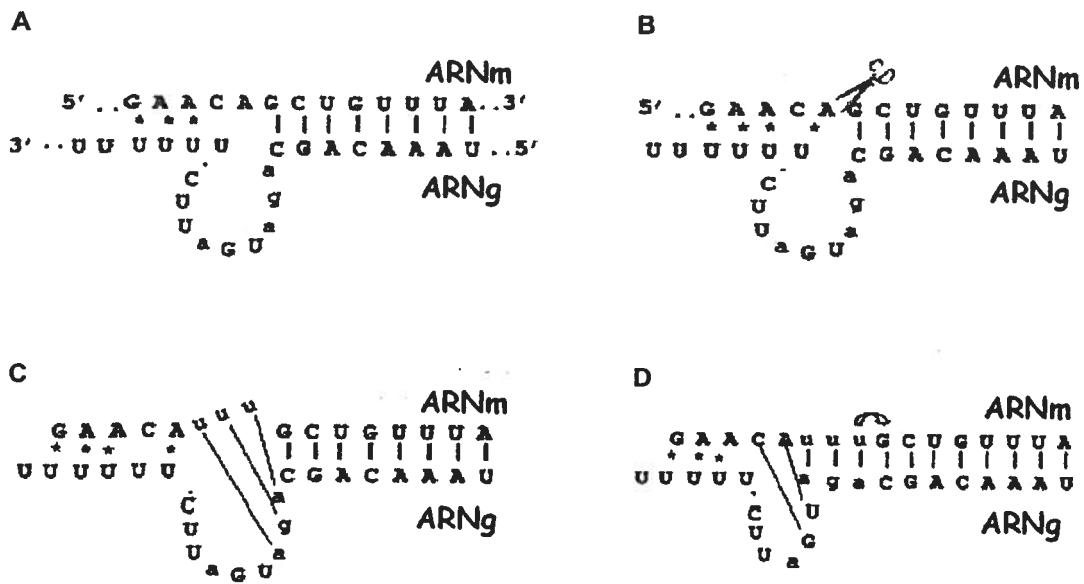
l'augmentation de la cytokine associée à une réponse Th2 (IL-4). D'ailleurs, l'ajout du lysat seul mène à la sécrétion d'IL-4 même en absence de *L. major* (Belkaid *et al.*, 1998b, Mbow *et al.*, 1998).

### 1.2.3 Le RNA editing

Le phénomène de RNA editing consiste en l'insertion et/ou la délétion posttranscriptionnelle d'uridine dans des pré-ARNm afin d'obtenir des ARNm matures prêts à être traduits. Ce phénomène est observé chez plusieurs organismes mais a été premièrement décrit dans les mitochondries des trypanosomes (Benne *et al.*, 1986).

Ce mécanisme, essentiel pour la survie des parasites, permet principalement la synthèse des différentes composantes du système de phosphorylation oxydatif du parasite. D'ailleurs, le RNA editing varie selon le stade du parasite *T. brucei* (Feagin et Stuart, 1988). Les pré-ARNm sont codés par de grands ADN mitochondriaux (maxicircles) alors que les plus petits ADN mitochondriaux (minicircles) encodent les ARN guides (ARNg).

Ce phénomène est particulièrement complexe, 26 enzymes ont été identifiés pour leur rôle dans le RNA editing (Stuart *et al.*, 2005). Premièrement, l'ARNg se lie *in trans* au pré-ARNm juste en amont du site d'édition, créant ainsi une structure ARNdb d'environ 75 nucléotides (Blum *et al.*, 1990, Blum et Simpson, 1990). Cette structure permet ensuite l'assemblage de l'éditosome (Worthey *et al.*, 2003). À ce moment, le pré-ARNm est clivé au site d'édition par l'action d'une endonucléase. Ensuite, il peut avoir ajout d'un ou plusieurs uridines en 3' du fragment 5' du pré-ARNm grâce à l'action de la terminal uridylyl transférase (TUTase) (Igo *et al.*, 2002a). A noter que le nombre d'uridine ajouté dépend de la TUTase présente dans l'éditosome. Il peut aussi avoir la délétion d'un ou plusieurs uridines grâce à l'action de l'exonucléase (exoUase) (Igo *et al.*, 2002b). La réaction se termine par l'action de la RNA ligase et la séparation des ARNg des pré-ARNm (Figure 5) (Estevez et Simpson, 1999, Simpson *et al.*, 2003, Stuart *et al.*, 2005). Un même gène peut être très fortement



Source: Simpson *et al.* (2003)

**FIGURE 5 : RNA EDITING** Modèle du mécanisme de RNA editing d'insertion. A) L'ARNg se lie spécifiquement au pré-ARNm B) L'endonucléase clive le pré-ARNm au site d'insertion C) L'ajout d'uridine est médié par l'action de la TUTase D) L'ARN ligase termine la réaction d'editing.

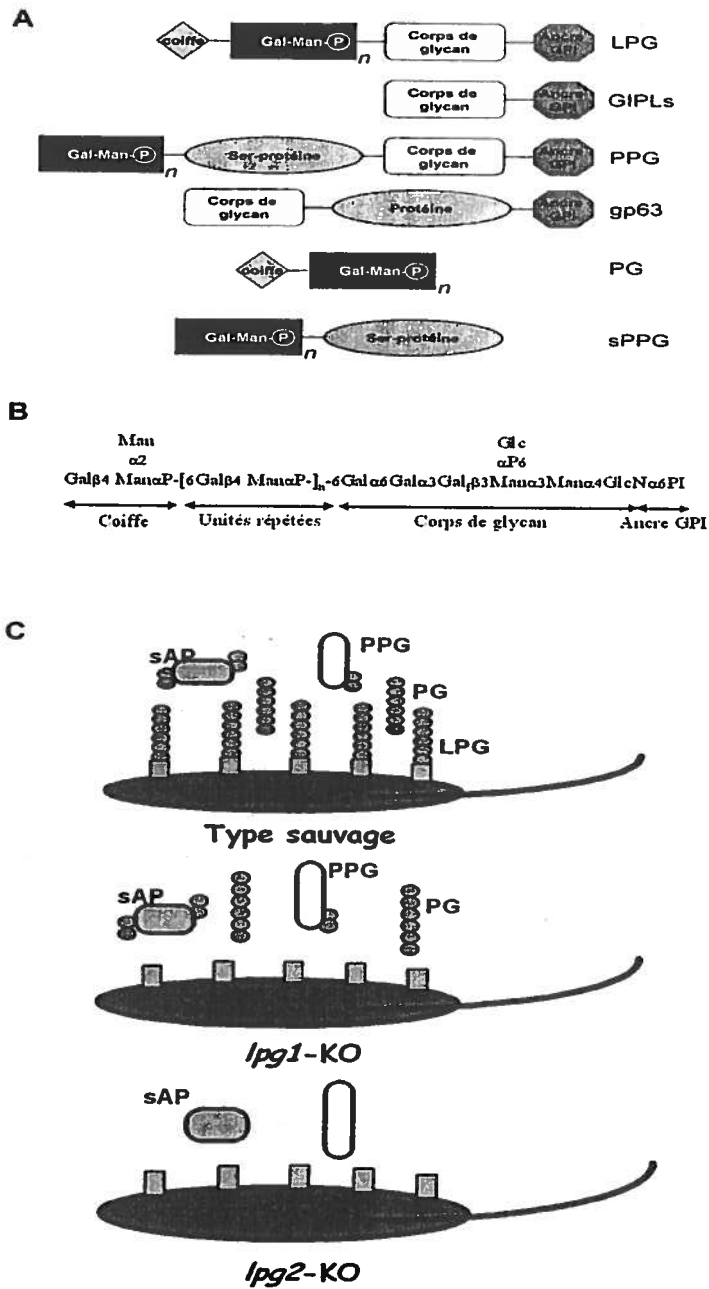
édité, par exemple, la sous-unité 6 de l'ATPase de *T. cruzi* nécessite la délétion de 28 et l'ajout 447 uridines afin d'être adéquatement traduit (Bhat *et al.*, 1990).

#### 1.2.4 Les glycoconjugués de *Leishmania*

Les *Leishmania* possèdent un grand nombre de glycoconjugués spécifiques exprimés soit à leur surface, soit sécrétés. Ces glycoconjugués jouent de nombreux rôles importants pour la survie des parasites et ce autant dans la mouche des sables que dans les macrophages. Chez les promastigotes, le glycocalyx est composé principalement des glycoconjugués LPG, gp63, GIPLs et PPG (Figure 6A). D'ailleurs, il a été montré que la surface des trypanosomes est chargée négativement et varie selon le stade du parasite. Chez *T. cruzi*, cette charge négative est due à l'acide sialique conjugué aux glycolipides et glycoprotéines des parasites (Souto-Padron, 2002). Cependant, *Leishmania* ne possède pas la machinerie enzymatique nécessaire à la biosynthèse d'acide sialique. Ainsi, il est probable que la charge négative observée à la surface des leishmanies provient des résidus phosphates des phosphoglycans.

##### 1.2.4.1 Le lipophosphoglycan (LPG)

Une des molécules les plus importantes pour les leishmanies, du moins dans le stade promastigote, est le lipophosphoglycan (LPG). Molécule de surface la plus abondante chez le promastigote avec cinq millions de copies par cellule (McConville et Blackwell, 1991), le LPG est essentiel pour la survie du parasite, autant dans la mouche des sables que dans l'hôte mammifère. Toutes les espèces de *Leishmania* possèdent des LPG avec une structure de base similaire possédant quatre domaines différents : 1) une ancre lipidique 1-*O*-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(*myo*)inositol permettant l'ancrage à la surface du parasite 2) un corps de glycan 3) des sous-unités répétées de disaccharides phosphorylés Gal( $\beta$ 1-4)Man( $\alpha$ 1-)-PO<sub>4</sub> et 4) une coiffe d'oligosaccharides (Figure 6A et 6B) (McConville *et al.*, 1990, Turco et Descoteaux, 1992). Certaines espèces de *Leishmania* possèdent des chaînes latérales glucidiques au niveau des unités répétées,



Sources : A) Kamhawi (2006) B) Privé et Descoteaux (2000)

**FIGURE 6 : LES GLYCOCONJUGUÉS DE *L. DONOVANI*** A) Représentation des différents glycoconjugués membranaires et sécrétés des leishmanies. B) Structure et domaines du LPG de *L. donovani*. C) Représentation schématique des promastigotes de type sauvage, *lpg1-KO* et *lpg2-KO* de *L. donovani*.

celles ci permettent d'assurer la spécificité du parasite pour son espèce de la mouche (Sacks *et al.*, 1994, Kamhawi *et al.*, 2004). Il est à noter que *L. donovani* possède le LPG le plus simple, i.e. il ne possède pas de chaînes latérales alors que *L. tropica* est le plus complexe avec 19 chaînes latérales (Turco *et al.*, 1987, Mcconville *et al.*, 1995).

La synthèse du LPG est particulièrement complexe, impliquant au moins 25 gènes différents (Beverley et Turco, 1998). Jusqu'à présent, seulement six gènes ont été identifiés et caractérisés, soit *lpg1*, *lpg2*, *lpg3*, *lpg4*, *sca* et *scg*. Le gène *lpg1* code pour une galactosyltransférase et les parasites mutants pour ce gène ne possèdent pas de LPG à leur surface mais peuvent sécréter des molécules contenant des phosphoglycans tels que les sAP ou les PPG (Figure 6C) (Ryan *et al.*, 1993). Le gène *lpg2* quant à lui code pour un transporteur membranaire permettant le transport du GDP-Mannose du cytosol vers l'appareil de Golgi, permettant ainsi l'ajout des unités répétées. Ces mutants n'expriment aucun phosphoglycan, ni membranaire, ni sécrété (Figure 6C) (Descoteaux *et al.*, 1995). Le gène *lpg3* code pour une chaperone probablement impliquée dans le repliement d'une glycosyltransférase et les mutants pour ce gène synthétisent une version tronquée du LPG ne contenant que le résidu Man $\alpha$ 1-PO<sub>4</sub> de la première unité répétée (Figure 6C) (Descoteaux *et al.*, 2002). Quant à *lpg4*, il permet l'addition de la seconde unité répétée au LPG (Descoteaux *et al.*, 1998). Les gènes *sca* et *scg*, identifiés chez *L. major*, codent respectivement pour une arabinosyltransférase et une galactosyltransférase qui modifient la structure des chaînes latérales du LPG (Dobson *et al.*, 2003a, Dobson *et al.*, 2003b, Dobson *et al.*, 2006).

Dans la mouche des sables, le LPG, qui constitue la molécule la plus abondante du glycocalyx à la surface du promastigote, joue un rôle primordial pour résister à l'attaque par les enzymes digestifs de la mouche. De plus, la présence du galactose du LPG permet l'attachement du promastigote de *L. major* aux galectines des cellules épithéliales du tractus de la mouche et ainsi éviter d'être excrétés avec les déchets du repas sanguin (Kamhawi *et al.*, 2004). Lors de la métacyclogenèse, la modification du résidu galactose dans la coiffe permet le relâchement des promastigotes métacycliques des cellules épithéliales et leur migration vers la bouche de la mouche afin d'être

inoculés dans un hôte lors du repas sanguin (Pimenta *et al.*, 1992, Mahoney *et al.*, 1999, Dobson *et al.*, 2003a, Dobson *et al.*, 2003b). Dans les mammifères, le LPG module l'activité de nombreuses voies de signalisation et protéines du macrophage lors de l'entrée du promastigote. Ces différents rôles primordiaux pour l'établissement de l'infection seront abordés plus en détail au chapitre 4.

En plus du LPG membranaire, les leishmanies sécrètent un polymère d'unités répétées avec une coiffe, nommé simplement phosphoglycan (PG) (Figure 6A) (Greis *et al.*, 1992). Leur rôle exact n'est pas très bien connu mais ils semblent impliqués dans l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 chez les macrophages infectés (Piedrafita *et al.*, 1999).

#### 1.2.4.2 Les GIPLs

Les Glycosyl-inositolphospholipides (GIPLs) sont une famille de glycolipides de surface de faible poids moléculaire très abondants (Figure 6A). Contrairement au LPG, les GIPLs sont présents autant au stade promastigote qu'amastigote. Leurs rôles exacts ne sont pas encore bien connus. Les GIPLs sont généralement riches en résidus mannose et l'utilisation du récepteur mannose pour l'entrée du promastigote laisse présager un rôle pour ces glycolipides dans l'invasion des macrophages. Au stade amastigote, les GIPLs représentent la majorité des constituants de la surface du parasite. En traitant les macrophages avec des GIPLs purifiés de *L. major*, Proudfoot *et al.* (1995) a suggéré un rôle pour ces molécules dans la modulation de la réponse du macrophage, principalement au niveau de NO. Cependant, l'utilisation de *L. major* déficients en phospholipides, donc en GIPLs, démontre que ces glycolipides ne jouent pas de rôles dans la virulence ou l'inhibition du NO (Zufferey *et al.*, 2003).

### 1.2.4.3 GP63

La metalloprotéase zinc-dépendant gp63 (ou leishmaniolysine ou Major Surface Protease (MSP)) est la glycoprotéine la plus abondante à la surface du parasite, tant sous sa forme promastigote qu'amastigote (Figure 6A) (Frommel *et al.*, 1990). Cependant, durant la phase stationnaire de croissance du promastigote, les gp63 présents à la surface du parasite sont plus stables. Ainsi, les leishmanies métacycliques expriment environ 15 fois plus de gp63 que les promastigotes non-infectieux (Davies *et al.*, 1990, Yao *et al.*, 2002). Il est donc prévisible que cette protéase joue un rôle important lors des étapes initiales de l'infection. En effet, gp63 permet la résistance au complément en clivant la composante C3b en sa forme inactive C3bi, empêchant ainsi la formation du complexe d'attaque du complément (Chaudhuri et Chang, 1988, Brittingham *et al.*, 1995). Afin de permettre l'entrée silencieuse du promastigote dans le macrophage via CR3, gp63 joue deux rôles. Premièrement, C3bi qui se trouve déposé à la surface promouvoit son entrée via ce récepteur. En plus, gp63 peut se lier directement au site lectine de CR3 (Mosser et Edelson, 1985, Wozencraft *et al.*, 1986, Russell et Wright, 1988). D'ailleurs, l'infection de souris BALB/c par des *L. major* déficients en gp63 forment des lésions plus tardivement que les souches naturelles (Joshi, P. B. *et al.*, 1998, Joshi, P. B. *et al.*, 2002).

Chez les amastigotes aussi, gp63 est fort important pour leur survie intracellulaire. En effet, des études *in vitro* ont montré que son activité protéase envers les enzymes lysosomaux est 20 fois plus élevée à pH 4.0 qu'à pH 7.5 et quatre fois plus forte à 37°C qu'à 25°C (Chaudhuri et Chang, 1988, Seay *et al.*, 1996). En plus, les amastigotes sécrètent une forme de gp63. Ces protéases sécrétées dégradent la fibronectine de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi la dissémination du parasite dans les différents tissus (McGwire *et al.*, 2003, Yao *et al.*, 2003).



#### 1.2.4.4 Le proteophosphoglycan

Trois différents types de protéophosphoglycan sont retrouvés chez *Leishmania* : la forme filamenteuse (fPPG) et membranaire (mPPG) chez les promastigotes alors que les amastigotes possèdent leur propre forme (aPPG) (Figure 6A). Le fPPG sécrété par le promastigote forme une matrice visqueuse, permettant ainsi aux promastigotes de rester prisonniers du tractus alimentaire de la mouche (Stierhof *et al.*, 1999). En plus, cette matrice forme une sorte de bouchon qui empêche la mouche de prendre un repas sanguin satisfaisant en une seule tentative. Ainsi, elle doit s'y reprendre à plusieurs fois, et sur plusieurs mammifères différents, avant d'être entièrement rassasiée (Killick-Kendrick *et al.*, 1988, Rogers *et al.*, 2004). Étant donné que chacune de ces tentatives est infectieuse, cela favorise la transmission du parasite (Warburg et Schlein, 1986, Killick-Kendrick *et al.*, 1988). La forme membranaire du PPG pourrait être impliquée dans l'adhésion au macrophage mais son rôle reste à préciser (Ilg *et al.*, 1999, Ilg, 2000). Chez l'amastigote, aPPG joue un rôle dans la formation de la vacuole parasitaire (Peters *et al.*, 1997).

#### 1.2.4.5 La phosphatase alcaline sécrétée

La phosphatase alcaline (sAP) est une protéine contenant les unités répétées Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$  liées en *O* à un résidu phosphosérine et la plus abondante des protéines sécrétées par les leishmanies (Figure 6A) (Ilg *et al.*, 1994). Au stade promastigote, la sAP permet au parasite de résister à l'activité protéolytique des protéases du tractus alimentaire de la mouche (Joshi, M. B. *et al.*, 2004). Chez les amastigotes, la sAP est importante pour sa survie intracellulaire (Ellis *et al.*, 1998). En plus, les *Leishmania* possèdent une forme membranaire de phosphatase alcaline mais son rôle exact n'est pas encore défini (Shakarian *et al.*, 2002).

## 2 *L'immunité innée*

Historiquement, l'immunologie des vertébrés se limitait à l'immunité humorale avec très peu d'emphase sur les leukocytes. Même si la présence de ces cellules aux sites d'inflammation avait été décrit en 1774 par Hunter, leur contribution semblait assez faible (Silverstein, 1979). Le point tournant pour l'immunité innée a été l'observation par Elie Metchnikov de l'engouffrement de spores de champignons par des cellules blanches vagabondes chez les invertébrés en 1882 et la formulation de la théorie de l'immunité cellulaire en 1884 (Metchnikov, 1884, Silverstein, 1979, Cooper *et al.*, 2002, Beutler, 2004). Pour environ 100 ans, les revues de littérature considéraient l'immunité innée comme étant primitive et « stupide » (Mitchison, 1993, Smith, 2002). Cependant, la découverte des Toll-like receptors il y a presque dix ans a ouvert un nouveau champ de recherche stimulant et a permis de redonner ses lettres de noblesse à l'immunité innée (voir section 3).

Une particularité de l'immunité innée est son universalité. Alors que l'immunité adaptative est une particularité des vertébrés, l'immunité innée permet à tous les organismes vivants de se protéger d'une grande variété de pathogènes potentiels. Par définition, l'immunité innée consiste en une forme de réponse non antigène-spécifique envers n'importe quels pathogènes potentiellement dangereux en utilisant des mécanismes présents depuis la naissance. De plus, cette forme d'immunité n'est pas plus efficace lors de rencontres subséquentes de ce pathogène, il n'y a donc pas de « mémoire » contrairement à l'immunité acquise. Déclenchée très rapidement en réponse à un microorganisme pathogène, l'immunité innée forme une barrière envers ceux-ci. De plus, l'immunité innée permet de discriminer entre le soi et le non-soi en reconnaissant divers microorganismes pathogènes et mène à une réponse adaptative spécifique (Janeway *et al.*, 2001). En général, l'immunité innée utilise principalement deux mécanismes : 1) une ligne fixe de défense constituée bien sûr de l'épithélium et de différentes cellules phagocytaires et 2) les protéines de plasma formant le système de complément.

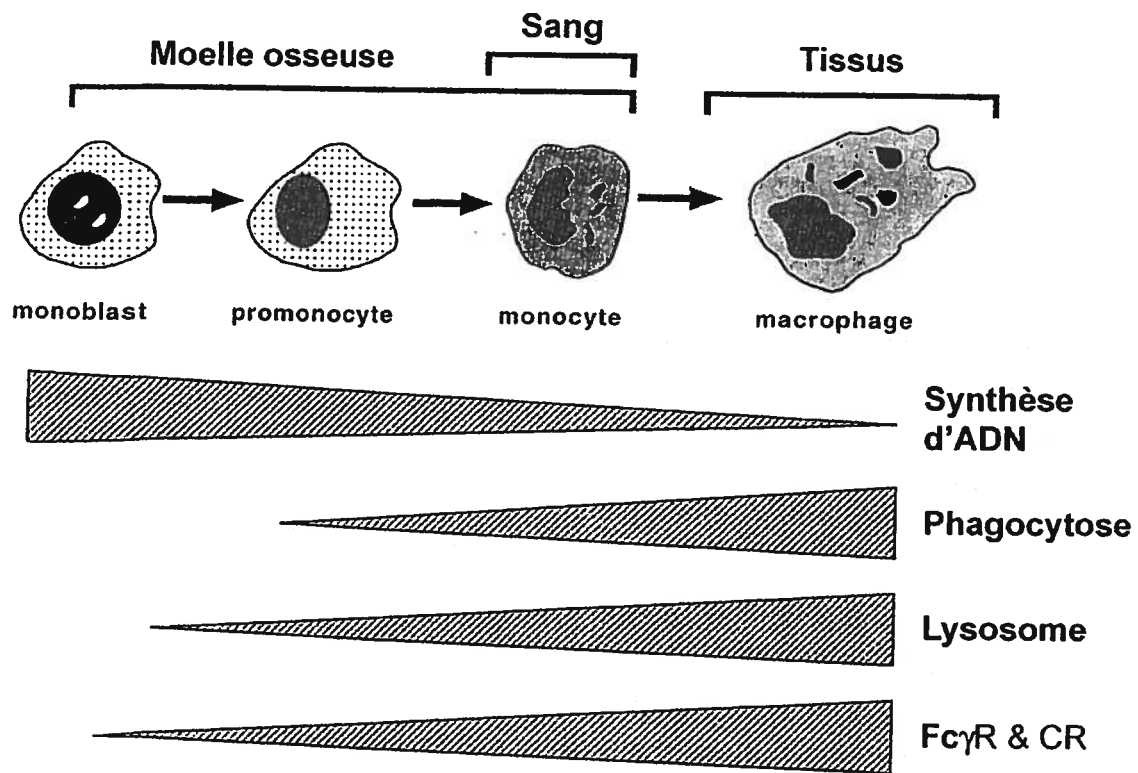
## **2.1 Le macrophage**

Les macrophages sont d'importantes cellules effectrices du système de défense de l'hôte en participant à l'immunité innée et acquise. Cette cellule mononucléaire est phylogénétiquement primitive, des cellules apparentées aux macrophages se retrouvent chez différentes formes de vie primitives (Ross et Auger, 2002). Le macrophage est une cellule assez grande (25 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre), à forme irrégulière et avec une membrane gondolée.

Les macrophages originent de la moelle osseuse selon le schéma suivant : dans la moelle osseuse (Figure 7), le progéniteur commun des neutrophiles et des monocytes se nomme CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte, macrophage). Ces cellules primaires forment successivement des monoblastes, des promonocytes et des monocytes dans la moelle osseuse. Les monocytes nouvellement formés restent dans la moelle osseuse moins de 24 h avant d'entrer dans le système sanguin où ils représentent entre un et six pour cent des leukocytes. La demi-vie moyenne des monocytes circulants est estimée à environ 70 h chez les humains (Whitelaw, 1966). Suite à un stimulus, ces monocytes migrent vers les tissus où ils deviennent des macrophages matures résidents. Cette maturation vers le macrophage s'accompagne du développement des activités phagocytiques, de l'expression des différents récepteurs à IgG et C3 et de la formation des lysosomes (Figure 7). L'importance des macrophages est soutenue par le fait que, chez la souris, il y a production d'environ  $1,5 \times 10^6$  monocytes par 24 h (Ross & Auger, 2002).

### **2.1.1 La phagocytose**

Une des fonctions primordiales du macrophage est la phagocytose. Ce phénomène consiste en l'internalisation de particules plus grandes que 0,5  $\mu\text{m}$  et est entièrement dépendant de l'actine. Via l'ingestion de particules microbiennes, les

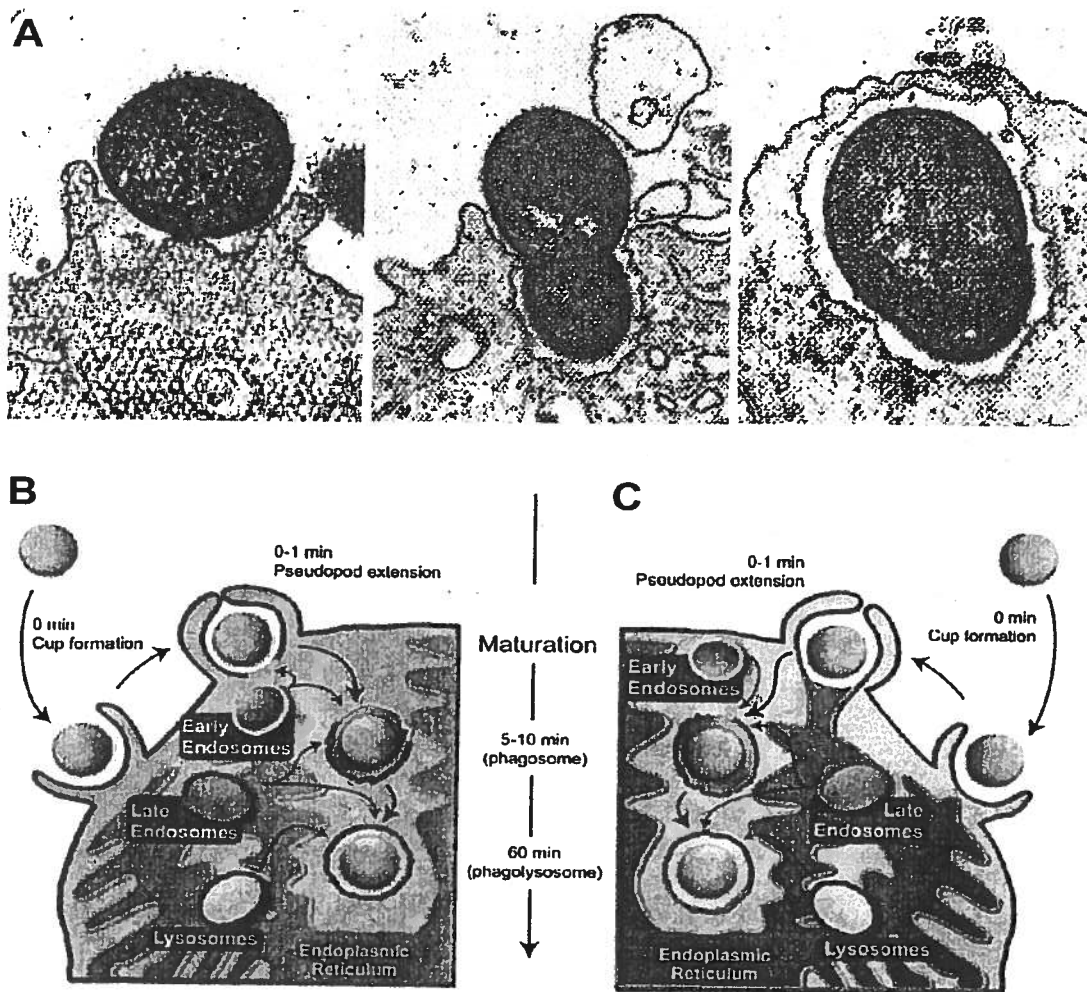


Source : Ross et Auger (2002).

**FIGURE 7 : LA DIFFERENCIATION EN MACROPHAGE** Les monoblastes présents dans la moelle osseuse se différencient successivement en promonocytes et ensuite en monocytes qui pénètrent dans le système sanguin. Suite à un stimulus, ceux ci pénètrent dans les tissus et se différencient en macrophages matures. Tout au long de cette différenciation, les cellules acquièrent une activité phagocytaire, tel que démontré par l'augmentation des lysosomes et des récepteurs opsoniques (Fc $\gamma$ R et CR).

leukocytes accomplissent deux fonctions importantes dans l'immunité : 1) le déclenchement d'une voie mortelle pour les microbes ingérés en les dirigeant vers les lysosomes et 2) la présentation des antigènes aux lymphocytes, permettant ainsi le déclenchement de la réponse adaptative (Greenberg et Grinstein, 2002, Desjardins *et al.*, 2005). La phagocytose est déclenchée suite à la reconnaissance d'un ligand par un récepteur phagocytaire. L'activation de ces récepteurs mène à de nombreuses vagues de transduction du signal résultant ultimement en un important remodelage de la membrane au site d'internalisation (Desjardins, 2003). Premièrement, il y a une forte synthèse de PIP2 à la coupe phagocytaire. Ces lipides jouent plusieurs rôles dans la phagocytose, entre autre en modifiant le cytosquelette (Yeung *et al.*, 2006). Ensuite, l'extension des pseudopodes autour de la particule à ingérer grâce à l'action de la PI3k permet l'engouffrement de celle-ci (Cox *et al.*, 1999, Castellano *et al.*, 2001). La particule ingérée se retrouve alors dans un organelle nommé phagosome. Celui-ci mature en phagolysosome suite à une série de fusion-fission (kiss-and-run) avec différents endosomes (successivement les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes) grâce à l'action de Rab5, Rab7 et PKC- $\alpha$ . Lors de cette maturation, le phagosome acquiert des hydrolases et des cathepsines jusqu'à la formation du phagolysosome mature. Dans ce compartiment acide (~pH 4.5), l'intrus est digéré en courts peptides qui seront ensuite présentés aux lymphocytes par les molécules du CMH (Figure 8) (Desjardins *et al.*, 1994, Desjardins, 1995, Duclos *et al.*, 2000, Ng Yan Hing *et al.*, 2004).

Après avoir emprisonné la particule dans le phagosome, le macrophage envoie une pléthore d'intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène (ROI) générés par le complexe NADPH oxidase afin de tuer l'intrus. Ce complexe enzymatique multimérique est composé des protéines membranaires gp91*phox* et p22*phox* ainsi que de quatre protéines cytosoliques (p47*phox*, p67*phox*, p40*phox* et Rac1/Rac2). Suite à la phagocytose, les protéines cytosoliques transloquent à la membrane pour créer un complexe *phox* actif. Ce complexe permet la réduction de l'oxygène en ion superoxyde ( $O_2^-$ ), qui donne naissance au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), aux radicaux hydroxyles (OH) et à l'oxygène singulet ( $O^{\cdot}$ ) (Babior, 1999, DeLeo *et al.*, 1999).



Source: A) Horwitz (1984) B) et C) Touret *et al.* (2005a)

**FIGURE 8 : LA PHAGOCYTOSE** A) Phagocytose de *Streptococcus pneumoniae* par un monocyte humain. Par microscopie électronique, on voit bien l'extension des pseudopodes autour de la bactérie. B) et C) Les deux hypothèses concernant l'origine des membranes lors de la phagocytose. Selon le modèle « classique » (B), le phagosome est formé par l'invagination de la membrane plasmique. Dans ce cas, la perte de membrane plasmique est compensée par l'exocytose de membrane provenant des endosomes. Selon le modèle de phagocytose médiée par le ER (C), la fusion du ER avec la membrane plasmique au site de contact crée une ouverture permettant à la particule de glisser à l'intérieur du phagosome.

### 2.1.1.1 La dynamique membranaire durant la phagocytose

Présentement, un débat fait rage dans le cercle de la phagocytose : l'origine de la membrane du phagosome (Figure 8B et 8C) (Gagnon *et al.*, 2005, Touret *et al.*, 2005a). Depuis de nombreuses années, la communauté scientifique estimait que le phagosome était formé par une invagination de la membrane plasmique tel que décrit par Werb et Cohn (1972). Cependant, l'observation que dans certains cas extrêmes, le macrophage peut internaliser l'équivalent de plus de 100% de sa surface en 30 minutes (Cox *et al.*, 2000) sans aucune réduction de sa taille soulève la question du trafic membranaire. L'hypothèse principale consiste en l'exocytose d'endomembranes à la surface de la cellule pour compenser la perte de membrane plasmique (Hackam *et al.*, 1998, Bajno *et al.*, 2000, Cox *et al.*, 2000, Greenberg et Grinstein, 2002).

Cette hypothèse est présentement remise en question par le groupe du Dr Michel Desjardins (Figure 8C). Premièrement, une étude d'électrophorèse en deux dimensions du protéome complet d'un phagosome de billes de latex a révélé la présence de nombreuses protéines impliquées dans la destruction de pathogènes tels que des hydrolases, ou ATPase. Cependant, la présence de quelques protéines du réticulum endoplasmique (ER) telles que la calnexine et la calreticuline était plutôt inattendue (Garin *et al.*, 2001). Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse que le ER pourrait représenter une source importante de membrane lors de la formation des phagosomes (Desjardins, 2003). Selon ce modèle, les particules reconnues sont prises dans les pseudopodes des macrophages. Cette reconnaissance mène au recrutement du ER près de la surface de la cellule afin de fusionner avec la membrane plasmique près du site de contact. Cette fusion fournit la membrane nécessaire à l'élongation des pseudopodes et crée une ouverture permettant à la particule de glisser à l'intérieur de cette vacuole. La phagocytose se termine suite à la fermeture du phagosome. L'avantage majeur de ce modèle permet à la cellule d'économiser la membrane plasmique qui est une membrane assez spécialisée (Gagnon *et al.*, 2002, Desjardins, 2003). En plus, ce modèle permet d'expliquer le phénomène de « cross-présentation », soit la présentation de peptides de protéines exogènes par le CMHI et non le CMHII).

En effet, selon ce modèle, le CMH de classe I, qui est normalement situé au niveau du ER, peut ainsi être présent au phagosome (Guermontprez *et al.*, 2003, Houde *et al.*, 2003).

Même si de nombreux travaux semblent accréditer la théorie de phagocytose médiée par le ER (Guermontprez *et al.*, 2003, Fajardo *et al.*, 2004, Kima et Dunn, 2005, Wan *et al.*, 2005, Hatsuzawa *et al.*, 2006), quelques groupes acceptent difficilement ce modèle et croient plutôt que la membrane du phagosome provient des endosomes. En utilisant plusieurs techniques, le groupe de Grinstein (Touret *et al.*, 2005a, 2005b), ne détecte pas ces protéines du ER aux membranes des phagosomes contenant des billes de latex. Cette absence de protéines du ER aux phagosomes contenant des érythrocytes opsonisés aux IgG a été remarquée par un autre groupe (Henry *et al.*, 2004). Selon eux, les expériences de Gagnon *et al.* (2002) ne sont pas suffisamment concluantes et seraient dues à la contamination. En effet, la technique de purification des phagosomes par flottaison n'est pas parfaite, et vu que le ER représente, et de loin, l'organelle le plus abondant de la cellule, il est difficile d'obtenir une préparation pure (Gotthardt *et al.*, 2002). En ce qui concerne les images de microscopie, Touret *et al.* (2005a), a démontré, en utilisant exactement la même technique que Gagnon *et al.* (2002), la présence de membranes étrangères à la surface des phagosomes. Récemment, Becker *et al.* (2005) a démontré que, dépendamment de la grosseur de la particule internalisée, ces deux types de phagocytose peuvent survenir dans les macrophages J774.

### **2.1.1.2 Les récepteurs phagocytiques**

La phagocytose étant un phénomène clé pour efficacement combattre les différents microorganismes pathogènes, plusieurs récepteurs peuvent déclencher ce mécanisme. Les récepteurs du macrophage menant à l'internalisation de pathogènes peuvent être séparés en deux groupes : 1) les récepteurs opsoniques (FcR, CR) et 2) les récepteurs non-opsoniques (MR,SR,TLR) (Heale et Speert, 2002).



Les macrophages expriment trois récepteurs du complément (CR1, CR3 et CR4) pouvant déclencher la phagocytose suite à la reconnaissance de différentes constituantes du complément. Le récepteur CR3 (CD11b-CD18) reconnaît la constituante C3bi de la cascade du complément. Étant donné que C3bi est généralement déposé à la surface de cellules apoptotiques, l'engagement de CR3 mène à la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, ce qui empêche la flambée inflammatoire (Yoshida *et al.*, 1998). Le récepteur CR1 (CD35) reconnaît plutôt la composante C3 alors que le ligand de CR4 (CD11c-CD18) n'est pas bien connu. Contrairement à CR3, l'engagement de ces récepteurs seul ne stimule pas la phagocytose. La présence d'autres médiateurs immunitaires, tel que C5a, doivent activer le macrophage afin de déclencher l'ingestion des particules (Janeway *et al.*, 2001).

Les récepteurs FcR reconnaissent la partie Fc des immunoglobulines. Alors que FcεR reconnaît les IgE et FcαR les IgA, les récepteurs FcγR reconnaissent spécifiquement les IgG. Il existe trois différents types de ces récepteurs à IgG, soit FcγRI (CD64), FcγRII (CDw32) et FcγRIII (CD16). Cependant, seul le premier lie les IgG monomériques avec une très grande affinité. Ainsi, l'engagement de FcγRI mène à une forte réponse immunitaire (Garcia-Garcia et Rosales, 2002).

Le récepteur mannose (MR) est exprimé chez les macrophages et certaines sous-populations de cellules dendritiques (Underhill et Ozinsky, 2002). Le MR reconnaît les résidus mannose et fucose exprimés à la surface de plusieurs pathogènes. Ce récepteur possède un spectre de reconnaissance assez large, des virus aux levures, en passant par les promastigotes de *L. donovani* (Allavena *et al.*, 2004). Les récepteurs de type scavengers (SR) reconnaissent généralement les cellules apoptotiques qui expriment la phosphatidylsérine (PS) à leur surface, ce qui constitue un signal « mange-moi » pour les macrophages (Fadok *et al.*, 2000). En plus de la PS, les SR peuvent aussi reconnaître directement des microorganismes via l'acide lipotéique (LTA) de la paroi des bactéries Gram-positives ou la PS des leishmanies (Savill *et al.*, 1993, Platt *et al.*, 1996, Tripathi et Gupta, 2003, Wanderley *et al.*, 2005). Certaines évidences

pointent vers un rôle pour les TLRs dans la phagocytose. Sans être des récepteurs phagocytiques en eux-mêmes, leur activation cause une augmentation de l'activité phagocytaire du macrophage (Doyle, S. E. *et al.*, 2004, Underhill et Gantner, 2004).

## **2.2 Le système du complément**

Un autre mécanisme de défense envers les microorganismes est le système du complément. Celui-ci est constitué de plusieurs protéines du plasma qui réagissent ensemble afin d'opsoniser les microorganismes et induire une série de réponses inflammatoires afin de tuer ceux-ci. Le système du complément étant composé de plusieurs protéines clivées par la composante précédente, le signal est amplifié tout le long de la cascade. Ce système peut être initié de trois façons différentes : 1- la voie classique, 2- la voie alternative et 3- la voie mannose-lectine (Janeway *et al.*, 2001).

La voie classique du complément est principalement un phénomène lié à l'immunité acquise. En effet, cette voie est déclenchée par la liaison de C1q aux complexes antigène-anticorps. La voie mannose-lectine est initiée par la reconnaissance de résidus mannose à la surface des microorganismes par la protéine du sérum MBL (mannan-binding lectin). La voie alternative survient suite à la déposition de composantes activées du complément directement à la surface d'un microorganisme (Fearon, 1998). Ces trois voies d'activation résultent en la formation du complexe enzymatique C3 convertase lié d'une façon covalente à la surface du microorganisme. Ce complexe enzymatique permet le clivage de C3 en C3b, la principale molécule effectrice du système du complément. C3b peut agir comme une opsonine, facilitant la reconnaissance du microorganisme pathogène par le macrophage via CR1 (CD35). De plus, C3b peut se lier au complexe C3 convertase pour former le complexe C5 convertase. Ce complexe forme C5a, un petit peptide médiateur de l'inflammation et C5b, responsable d'initier la phase tardive du système du complément. Cette phase tardive consiste en une série de réactions de polymérisation afin de former le complexe d'attaque membranaire. Ce complexe cause un pore à la surface du pathogène,

détruisant ainsi l'intégrité de la membrane lipidique et tuant le microorganisme (Rus *et al.*, 2005).

Depuis quelques années, plusieurs études démontrent que le système du complément joue aussi un rôle pour relier l'immunité innée avec l'immunité acquise. Ceci est causé par la reconnaissance de C3d par le récepteur CR2 présent sur les cellules B. En effet, il a été remarqué qu'un anticorps bloquant contre CR2 supprime la réponse en anticorps (Heyman *et al.*, 1990, Thyphronitis *et al.*, 1991).

### **2.3 La réponse aux microorganismes pathogènes**

La modification du transcriptome de la cellule-hôte lors d'une stimulation par un microorganisme pathogène est une des étapes importantes de la réponse immunitaire. En augmentant l'expression des différents gènes nécessaires à efficacement résoudre une infection, l'hôte acquiert les outils pour combattre ces microorganismes pathogènes (Janssens et Beyaert, 2003b, Jenner et Young, 2005, Hossain *et al.*, 2006).

L'étude par microarray du profil transcriptionnel de différentes cellules en réponse à plusieurs stimuli a révélé une réponse commune ainsi qu'une réponse spécifique envers les microorganismes pathogènes (Jenner et Young, 2005). La réponse commune est retrouvée chez de nombreux types cellulaires (macrophages, cellules dendritiques, cellules épithéliales...) et ce en réponse à de nombreux microorganismes pathogènes différents (virus, bactéries, protozoaires...). Induits très rapidement suite une stimulation, ces gènes, qui pourraient constituer un signal d'alarme, préparent la cellule à reconnaître et déclencher la réponse immunitaire appropriée. Les gènes induits lors de cette réponse peuvent être regroupés en quatre groupes fonctionnels : 1) les médiateurs de l'inflammation (principalement des cytokines), 2) les gènes stimulés par l'IFN (ISGs), 3) les activateurs de la réponse immunitaires (facteurs de transcription, protéines des voies de signalisation) et 4) les terminateurs de la réponse immunitaire (Jenner et Young, 2005). En plus de cette réponse commune, on observe l'induction de certains gènes suite à la reconnaissance spécifique de la nature du microorganisme

pathogène (O'Neill *et al.*, 2003, Jenner et Young, 2005). L'étude de ces gènes permet d'identifier l'arsenal nécessaire à la cellule-hôte pour efficacement combattre une infection.

En plus de ces modifications transcriptionnelles, de nombreux autres changements ont lieu suite à la reconnaissance d'un microorganisme pathogène. Entre autre, on observe un réarrangement spatio-temporel important des différentes composantes des voies de signalisation. Ceci permet de regrouper à proximité les différentes protéines impliquées dans la transduction du signal afin de maximiser l'interaction entre les différentes composantes de la cascade de signalisation (Batada *et al.*, 2004). En plus, de nombreuses protéines subissent des modifications post-transcriptionnelles (phosphorylation, ubiquitination, etc ...), modifiant ainsi leur fonction ou leur état d'activation (Janeway *et al.*, 2001, Heale et Speert, 2002, Ross et Auger, 2002).

### 3 Les Toll-like receptors

Tel que mentionné au chapitre 2, la découverte des Toll-like receptors (TLR) il y a à peine 10 ans a révolutionné le monde de l'immunité innée. Déjà à la fin des années 1980, Charles Janeway émit l'hypothèse que l'immunité innée tournait autour de récepteurs pouvant discriminer entre le soi et le non-soi et déclencher une forme d'immunité « spécifique » (Janeway, 1989). Ces récepteurs furent nommés « Pattern Recognition Receptors » ou PRRs. La découverte et la caractérisation des TLRs permirent d'accréditer cette théorie.

#### 3.1 Historique

Comme pour plusieurs autres mécanismes, l'histoire des TLRs débute par les études chez la drosophile. Comme le suggère leurs noms, les TLRs possèdent une homologie avec la protéine TOLL de *Drosophila melanogaster*. Au début des années 1980, TOLL a été décrit comme une composante essentielle dans l'établissement de l'axe dorso-ventral lors de l'embryogénèse de *Drosophila* (Anderson *et al.*, 1985, Stein *et al.*, 1991). Quelques années plus tard, il a été démontré que TOLL est impliqué dans le système immunitaire antifongique de la drosophile (Lemaitre *et al.*, 1996). Chez ces insectes, le système immunitaire tourne autour de la synthèse de petits peptides antimicrobiens (défensines, metchnikowines, drosomycines) qui attaquent directement les pathogènes (Tanji et Ip, 2005). Suite à la reconnaissance de pathogènes, s'enclenche alors une cascade de signalisation assez semblable à celle de NF- $\kappa$ B chez les mammifères, menant à la synthèse de courts peptides antimicrobiens (Brennan et Anderson, 2004). Suite à cette découverte initiale, le système Imd fut découvert (Georgel *et al.*, 2001). Ainsi, le système Toll permet de reconnaître les pathogènes fongiques et les bactéries Gram-positives alors que Imd reconnaît les bactéries Gram-négatives (Tanji et Ip, 2005). L'analyse du génome de *D. melanogaster* a montré la présence de 9 homologues à TOLL mais leur fonction dans l'immunité n'a pas encore été démontrée (Tauszig *et al.*, 2000).

Structuralement parlant, ces récepteurs transmembranaires de type I sont caractérisés par un domaine intracellulaire similaire au récepteur de l'IL-1 (IL-1R) des mammifères (TIR), ainsi qu'un domaine extracellulaire possédant de 19 à 25 copies répétées en tandem de régions riches en leucines (LRR). Au milieu des années 1990, l'identification de protéines humaines possédant un domaine extracellulaire LRR et un domaine intracellulaire TIR laissa présager une grande conservation du système immunitaire innée entre les mammifères et les invertébrés (Taguchi *et al.*, 1996, Medzhitov *et al.*, 1997, Rock *et al.*, 1998). Ces récepteurs furent nommés Toll-like receptors (TLRs), pavant la voie à un nouveau champ d'étude intéressant.

L'importance des TLRs dans l'immunité innée fut démontrée grâce au LPS et aux souris tolérantes C3H/HeJ. En 1998, presque simultanément, deux groupes démontrèrent que l'absence de réponse de ces souris envers le LPS était due à une mutation dans le domaine TIR du gène *Tlr4* (Poltorak *et al.*, 1998, Qureshi *et al.*, 1999). Depuis cette découverte, une quantité phénoménale de recherches sur les TLRs et leur rôle dans l'immunité innée sont en cours. Chez les mammifères, 13 TLRs ont été identifiés jusqu'à présent. En plus de leurs similarités structurelles, tous ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires associés aux microorganismes pathogènes (PAMPs) (Akira *et al.*, 2006).

### **3.2 Les motifs moléculaires associés aux microorganismes pathogènes**

Afin de déclencher une réponse immunitaire spécifique aux microorganismes, les TLRs reconnaissent des motifs moléculaires associés aux microorganismes pathogènes (PAMPs). Ces motifs moléculaires sont généralement présents seulement chez les microorganismes, exprimés constitutivement et représentent généralement des molécules essentielles pour la survie de ces organismes. Le PAMP le plus connu et le plus étudié est le LPS des bactéries Gram-négatives. Cependant, les PAMPs, soit des protéines, lipides ou acides nucléiques, proviennent de diverses origines, les TLRs étant

impliqués dans la reconnaissance de bactéries, de virus, de champignons et de parasites (Tableau II) (Akira *et al.*, 2006).

Les TLRs sont exprimés chez un large spectre de cellules immunitaires. Les cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages et les cellules dendritiques expriment presque tous les TLRs. Cependant, certains TLRs sont exprimés sur d'autres cellules. Par exemple, les cellules épithéliales de l'intestin expriment TLR5 et reconnaissent la flagelline des bactéries qui ont franchi la barrière mucoale (Gewirtz *et al.*, 2001, Hayashi *et al.*, 2001, Rhee *et al.*, 2005). En ce qui concerne TLR3, son expression semble plus restreinte. En effet, à l'état normal, il est seulement détecté chez les cellules dendritiques (Muzio *et al.*, 2000). Cependant, l'activation des macrophages par l'IFN- $\gamma$  permet aussi à ces cellules d'exprimer TLR3 (Flandin *et al.*, 2006).

La localisation cellulaire des TLRs permet aussi d'en apprendre sur leur importance dans la reconnaissance des PAMPs. Alors que TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont exprimés à la surface des cellules, TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont principalement exprimés dans des organelles intracellulaires (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002, Matsumoto *et al.*, 2003, Nishiya et Defranco, 2004, Nishiya *et al.*, 2005). Cette localisation intracellulaire s'explique par le fait que ces TLRs reconnaissent les acides nucléiques, principalement d'origine virale. Étant donné que ces PAMPs sont détectables seulement suite à l'infection de la cellule par un virus, la localisation intracellulaire de ces TLRs est logique. En plus, la localisation intracellulaire de TLR9 est essentielle pour empêcher la reconnaissance de l'ADN du soi (Barton *et al.*, 2006). Le cas de TLR5 est aussi intéressant. Tel que mentionné précédemment, ce récepteur est situé sur les cellules épithéliales de l'intestin. Cependant, afin de ne pas développer une réponse inflammatoire envers les bactéries de la flore normale, des études ont démontré sa localisation du côté basolatéral et non apical de ces cellules (Gewirtz *et al.*, 2001, Hayashi *et al.*, 2001, Rhee *et al.*, 2005).

PAMP	Pathogène	TLR
<b>ORIGINE BACTÉRIENNE</b>		
LPS	Bactéries Gram-négatives	TLR4
Lipopeptides diacyliques	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Lipopeptides triacyliques	Bactéries et mycobactéries	TLR1/TLR2
LTA	<i>Streptococcus</i> de groupe B	TLR6/TLR2
Peptidoglycan	Bactéries Gram-positives	TLR2
Porines	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobactéries	TLR2
Flagelline	Bactéries flagellées	TLR5
ADN CpG	Bactéries et Mycobactéries	TLR9
ND	Bactéries uropathogènes	TLR11
<b>ORIGINE FONGIQUE</b>		
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 et TLR4
<b>ORIGINE PARASITAIRE</b>		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipides	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Phosphoglycans	<i>Leishmania</i>	TLR2
ND	<i>Leishmania</i>	TLR4
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
<b>ORIGINE VIRALE</b>		
ADN	Virus	TLR9
ARNdb	Virus	TLR3
ARNsb	Virus à ARN	TLR7 et TLR8
Protéines de l'enveloppe	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinine	Measles virus	TLR2

Source : adapté de Akira *et al.* (2006)

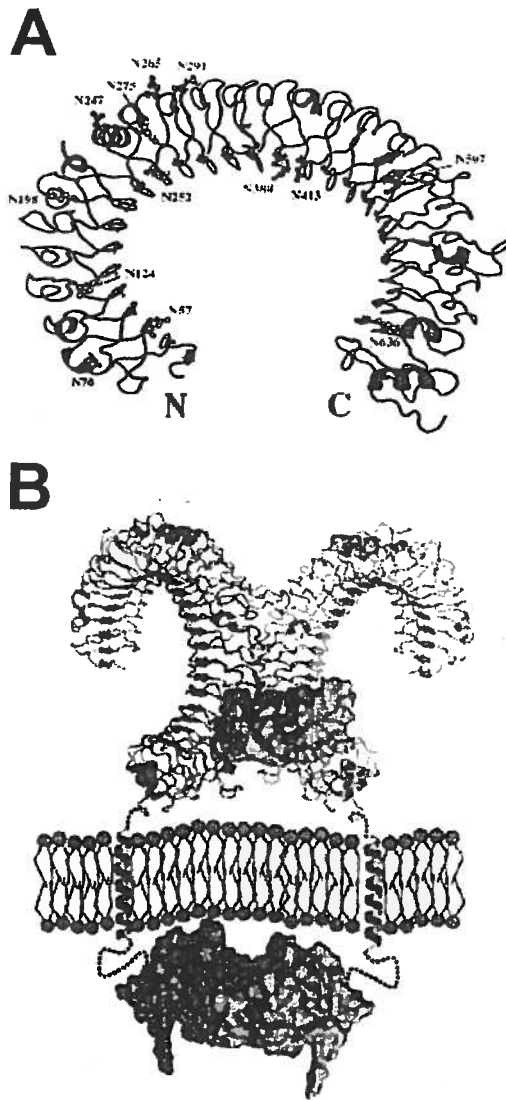
**TABLEAU II : LES TLRs RECONNAISSENT DES PAMPs** Tableau présentant quelques exemples de PAMPs d'origines diverses et le TLR impliqué dans sa reconnaissance. ND signifie non-déterminé.



À priori, il peut sembler surprenant que seulement 13 récepteurs sont suffisants pour se protéger d'un très grand nombre de microorganismes pathogènes différents. Ainsi, il est intéressant de noter qu'un TLR peut reconnaître plusieurs PAMPs différents. D'ailleurs, l'analyse de la structure des TLRs le démontre bien. Jusqu'à présent, seulement TLR3 a été cristallisé (Bell *et al.*, 2005, Choe *et al.*, 2005, Bell *et al.*, 2006). La cristallisation de l'ectodomaine a révélé une forme générale en fer à cheval avec les résidus hydrophobiques portant vers l'intérieur de la structure (Figure 9). En plus, l'absence de site de glycolysation à la face extérieure de TLR3 démontre un site permettant son homodimérisation (Bell *et al.*, 2005). En ce qui concerne le site de liaison, l'ARNdb chargé négativement peut s'insérer dans une poche légèrement chargée positivement. De plus, on observe plusieurs sites de liaison potentiels pour d'autres PAMPs (Bell *et al.*, 2003, Bell *et al.*, 2005, Choe *et al.*, 2005, Bell *et al.*, 2006, Sun *et al.*, 2006).

Afin de reconnaître différents PAMPs, les TLRs peuvent agir en coopération. Les cas les plus connus étant ceux de TLR1 et TLR6. En effet, ces deux TLRs se lient fortement à TLR2 et permet ainsi de discriminer les acides gras des bactéries. Alors que le dimère TLR1/TLR2 permet la reconnaissance des lipoprotéines triacyliques, les lipoprotéines diacyliques sont reconnues par le complexe TLR2/TLR6 (Ozinsky *et al.*, 2000, Takeuchi *et al.*, 2001, Takeuchi *et al.*, 2002). En plus de la coopération entre les TLRs, d'autres protéines peuvent aussi permettre de reconnaître certains PAMPs. Par exemple, la reconnaissance du LPS nécessite, bien sûr, TLR4, ainsi que LBP, MD-2 et CD14 (Da Silva Correia *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2005, Miyake, 2006). Il a récemment été démontré que CD14 augmente l'affinité de TLR3 pour l'ARNdb (Lee *et al.*, 2006).

Finalement, non seulement un seul TLR peut reconnaître plusieurs PAMPs, un pathogène peut être reconnu par plusieurs TLRs. Par exemple, des études *in vivo* ont démontré qu'afin de monter une réponse appropriée envers *C. albicans* ou *A. fumigatus*, la contribution de TLR2, TLR4 et TLR9 est essentielle (Bellocchio *et al.*, 2004). En plus, la stimulation de cellules THP-1 par des bactéries entières (Gram+ et Gram-) mène à l'induction de l'ARNm de plusieurs TLRs, probablement tous importants afin de déclencher une réponse immunitaire appropriée (Zarembek et Godowski, 2002). En



Source: A) Sun *et al.* (2006) B) Bell *et al.* (2006)

**FIGURE 9 : STRUCTURE DE TLR3** A) Représentation du domaine extracellulaire de TLR3 humain. Les sites potentiels de glycolysation sont indiqués. B) L'ARNdb est reconnu par un dimère de TLR3. L'interaction entre les deux domaines TIR permet ainsi le recrutement de(s) protéine(s) adaptatrice(s).

plus, la cinétique d'activation des TLRs peut varier selon les pathogènes. Par exemple, pour la reconnaissance de *Salmonella*, TLR4 est impliqué dans la réponse précoce (moins de 6 h) alors que TLR2 est important dans la réponse tardive (Weiss *et al.*, 2004). Jusqu'à maintenant, trois TLRs différents ont été impliqués dans la reconnaissance de *Leishmania* (TLR2, TLR3 et TLR4) (Becker, I. *et al.*, 2003, De Veer *et al.*, 2003, Kropf *et al.*, 2004a, Kropf *et al.*, 2004b, Flandin *et al.*, 2006). Leurs rôles respectifs seront décrits plus en détail à la section 4.5.

### **3.3 Signalisation**

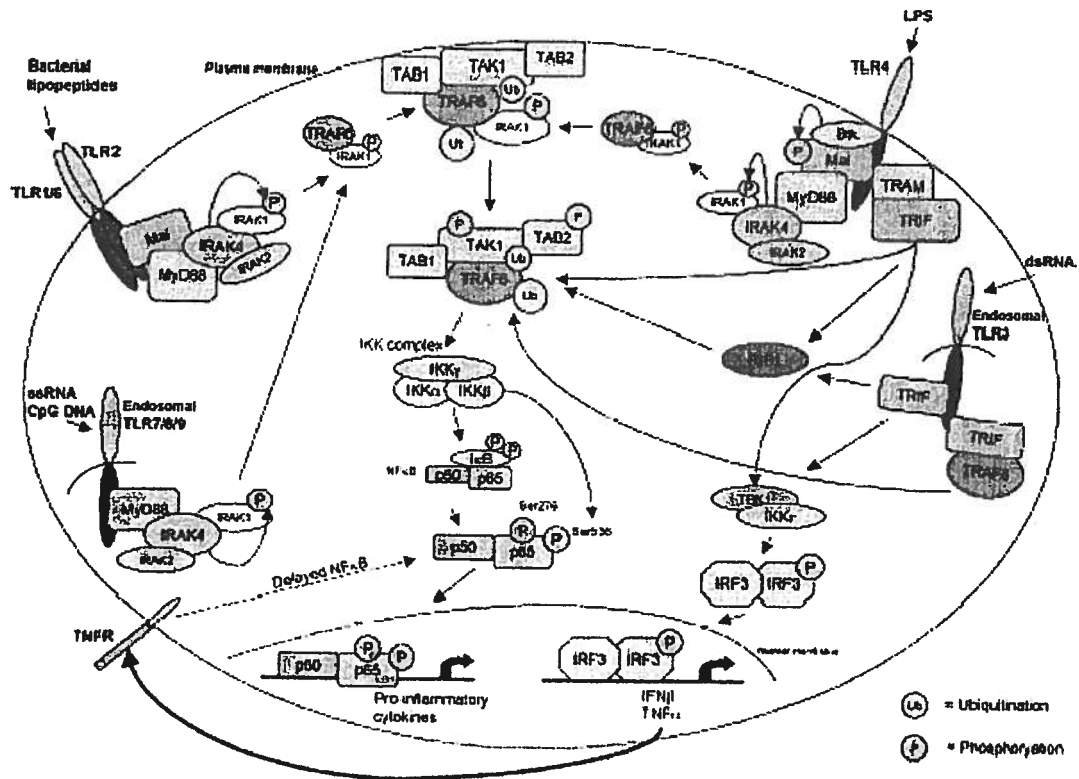
L'activation d'un TLR déclenche plusieurs voies de signalisation dépendamment du PAMP reconnu (voie apoptotique, voie PI3k-Akt, voies des IRF...). En général, la reconnaissance d'un PAMP par un TLR mène à l'activation d'une cascade de signalisation menant à l'expression de nombreuses cytokines importantes dans la réponse immunitaire. L'activation des TLRs est un événement séquentiel. Premièrement, la liaison d'un PAMP induit un changement conformationnel dans le domaine extracellulaire du TLR, permettant l'interaction stable entre les TLRs. Cela permet ensuite la dimérisation des domaines intracellulaires, ce qui permet le recrutement de protéines adaptatrices et ainsi la transduction du signal (Figure 9B) (Gay *et al.*, 2006). Jusqu'à présent, cinq protéines adaptatrices ont été caractérisées : MyD88 (Wesche *et al.*, 1997), TRIF/TICAM-1 (Yamamoto *et al.*, 2002b, Oshiumi *et al.*, 2003a), TIRAP/MAL (Fitzgerald *et al.*, 2001, Horng *et al.*, 2001), TRAM/TICAM-2 (Fitzgerald *et al.*, 2003b, Oshiumi *et al.*, 2003b) et SARM (O'Neill *et al.*, 2003). L'utilisation sélective de ces protéines adaptatrices expliquerait les différences de la réponse immunitaire selon le PAMP reconnu (Kaisho et Akira, 2004, McGettrick et O'Neill, 2004, Yamamoto *et al.*, 2004). Les protéines adaptatrices MyD88 et TRIF activent deux voies de signalisation distinctes et représentent les deux modèles de signalisation suite à l'activation d'un TLR.

### 3.3.1 La signalisation MyD88-dépendante

Cette voie de signalisation permet la transduction du signal suite à l'engagement de tous les TLRs. Il s'agit de la première voie de signalisation découverte et caractérisée. Structuellement parlant, MyD88 possède un domaine TIR en C-terminal et un « death domain (DD) » en N-terminal (Hultmark, 1994). Suite à la reconnaissance d'un PAMP, la protéine MyD88 est rapidement recrutée au domaine intracellulaire TIR du TLR via une interaction TIR/TIR (Medzhitov *et al.*, 1998, Jiang *et al.*, 2006). Ensuite, MyD88 recrute les kinases IRAK-4 et IRAK-1 via une interaction entre les deux DD (Medzhitov *et al.*, 1998, Jiang *et al.*, 2006). Suite à cette interaction, IRAK-4 phosphoryle IRAK-1, qui ensuite s'autophosphoryle (Suzuki *et al.*, 2002). IRAK-1 hyperphosphorylé va ensuite se libérer de MyD88 pour aller interagir avec TRAF6, qui représente le point de convergence de cette voie de signalisation (Cao *et al.*, 1996, Chung *et al.*, 2002). TRAF6, avec un enzyme d'ubiquitination, catalyse l'ubiquitination de TRAF6 lui-même et du complexe IKK $\gamma$ /NEMO, IKK $\gamma$  ubiquitiné sera dégradé au protéasome, libérant ainsi NF- $\kappa$ B et permettant sa translocation au noyau et ainsi permettre l'induction de gènes pro-inflammatoires (Baeuerle et Baltimore, 1988, Doyle, S. L. et O'Neill, 2006). Parallèlement, TRAF6 recrute le complexe composé de TAK1/TAB1/TAB2, ce complexe permet ainsi l'activation des voies de signalisation p38 MAPk et JNK (Wang *et al.*, 2001). En plus, TRAF6 permet l'activation du facteur de transcription IRF5, qui transloque au noyau afin de se lier aux séquences consensus ISRE des promoteurs de certaines cytokines pro-inflammatoires (Figure 10) (Takaoka *et al.*, 2005).

### 3.3.2 La signalisation TRIF-dépendante

Une autre voie de signalisation est plutôt utilisée suite à l'activation des récepteurs TLR3 et TLR4 par leur PAMP et mène à la production d'IFN de type I en plus des cytokines pro-inflammatoires. Historiquement, cette voie de signalisation découle de l'observation que les souris MyD88-KO pouvaient tout de même répondre



Source : Doyle S.L. et O'Neill (2006)

**FIGURE 10 : VOIES DE SIGNALISATION DES TLRs** Principales voies de signalisation activées suite à l'engagement des TLRs. La voie MyD88-dépendante est utilisée par presque tous les TLRs alors que la voie TRIF-dépendante est activée suite à l'activation de TLR3 et TLR4. Voir le texte pour de plus amples détails.

au LPS (Kawai *et al.*, 1999). La protéine adaptatrice clé de cette voie de signalisation est TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- $\beta$ , aussi nommé TICAM-1) (Yamamoto *et al.*, 2002b, Oshiumi *et al.*, 2003a). Suite à l'activation de ces TLRs, c'est plutôt la protéine adaptatrice TRIF qui est recrutée au domaine TIR des TLRs. TRIF interagit avec la protéine RIP1 qui est responsable de l'activation de NF- $\kappa$ B (Meylan *et al.*, 2004). Cependant, la cinétique d'activation de NF- $\kappa$ B par cette voie est plus lente que via MyD88 (Alexopoulou *et al.*, 2001). Parallèlement, TRIF active directement TRAF6, qui active TBK1. Cette kinase, en association avec la kinase I $\kappa$ B inductible (IKK- $\tau$  ou IKK- $\epsilon$ ) peut directement phosphoryler les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Barton et Medzhitov, 2003, Fitzgerald *et al.*, 2003a, Fitzgerald *et al.*, 2003b, Jiang *et al.*, 2003, Sato *et al.*, 2003, Jiang *et al.*, 2006). Ces facteurs de transcription phosphorylés forment des dimères, transloquent au noyau pour se lier aux séquences consensus ISRE, ce qui permet la sécrétion d'une pléthore de gènes inductibles par l'IFN tels que IFN $\alpha/\beta$ , IP-10 et RANTES (Figure 10) (Hertzog *et al.*, 2003, Honda *et al.*, 2005, Honda et Taniguchi, 2006).

### 3.3.3 Autres protéines adaptatrices

Tel que mentionné précédemment, trois autres protéines adaptatrices ont été caractérisées, soit TIRAP/MAL, TRAM/TICAM-2 et SARM. TIRAP/MAL est une protéine adaptatrice utilisée seulement par les TLRs extracellulaires et non par les TLRs intracellulaires (Horng *et al.*, 2001, Yamamoto *et al.*, 2002a). TIRAP possède un domaine de liaison pour les PIP2 et est normalement associé à la membrane plasmique grâce à la  $\beta$ 2 intégrine CD11b. Suite à la reconnaissance du LPS par TLR4, CD11b stimule la production de PIP2 via l'activation d'ARF6. Cette production concentre TIRAP à la membrane plasmique, ce qui facilite les interactions TIRAP-TLR4 et ainsi permet le recrutement de MyD88 (Kagan et Medzhitov, 2006).

TRAM est une protéine adaptatrice impliquée dans la voie de signalisation TRIF-dépendante mais seulement par TLR4 et non TLR3 (Fitzgerald *et al.*, 2003b,

Yamamoto *et al.*, 2003). À l'état normal, TRAM est associé à la membrane plasmique avec TLR4 (Rowe *et al.*, 2006). Suite à une stimulation par le LPS, TRAM permet le recrutement de TRIF au domaine TIR de TLR4 (McGettrick *et al.*, 2006). Au contraire, TRIF peut directement être recruté par le domaine TIR de TLR3 (McGettrick *et al.*, 2006, O'Neill L, 2006, Rowe *et al.*, 2006).

SARM est la dernière protéine adaptatrice contenant un domaine TIR et est présente seulement chez les humains et non chez les souris (O'Neill *et al.*, 2003). Cette protéine adaptatrice agit comme régulateur négatif de la voie de signalisation TRIF-dépendante et non la voie MyD88-dépendante. Suite à la stimulation des cellules, l'expression de SARM est grandement augmentée et interagit avec TRIF, abrogeant ainsi cette voie de signalisation (Carty *et al.*, 2006, O'Neill L, 2006).

### **3.4 Régulation négative des TLRs**

En général, une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, si non contrôlée, est dommageable pour l'hôte, pouvant même causer la mort dans les cas extrêmes (Kobayashi, K. S. et Flavell, 2004). Il est donc primordial pour la cellule de posséder plusieurs mécanismes différents afin de conserver une réponse appropriée envers les microorganismes pathogènes. Pour ce faire, il est possible de modifier soit le signalosome, soit l'expression des TLRs (Han et Ulevitch, 2005).

La méthode la plus évidente pour empêcher une trop forte réponse immunitaire consiste à bloquer la reconnaissance d'un PAMP. TRIAD3A, une ubiquitine ligase permet justement d'inhiber la reconnaissance via TLR4 et TLR9. Cette protéine se lie au domaine cytoplasmique de TLR4 et TLR9, ce qui promeut ainsi leur ubiquitination et leur destruction au protéasome (Chuang et Ulevitch, 2004). Un autre mécanisme consiste en l'expression de TLR solubles. Résultantes d'un épissage alternatif des ARNm des TLRs, les formes solubles des TLRs inhibent la reconnaissance des PAMPs (Wells *et al.*, 2006). Il n'est cependant pas encore connu si ces formes solubles empêchent la reconnaissance des PAMPs ou la liaison entre le TLR et ses co-récepteurs.

Le récepteur ST2 est un récepteur orphelin structurellement similaire à IL-1R et IL-18R. Induit par le LPS, ce récepteur inhibe la transduction du signal par TLR4. À cette fin, le domaine TIR de ST2 recrute MyD88 et TIRAP, abrogeant ainsi le signal (Brint *et al.*, 2004).

La modification du signalosome des TLRs est un autre mécanisme permettant de contrôler la réponse immunitaire. Par exemple, IRAK-M inhibe la transduction du signal en bloquant la dissociation des IRAK-1 et IRAK-4 de MyD88 (Kobayashi, K. *et al.*, 2002, Nakayama *et al.*, 2004). Suite à une longue exposition au LPS, on observe l'apparition d'une forme de MyD88 alternativement épisée, MyD88s. Cette protéine adaptatrice tronquée ne contient pas les aa 110-157 (région entre TIR et DD). Celle-ci est incapable de recruter IRAK-4, IRAK-1 n'est donc pas phosphorylé, abrogeant ainsi la transduction du signal (Janssens *et al.*, 2002, Burns *et al.*, 2003).

Suite à une stimulation prolongée par plusieurs PAMPs, on observe l'induction des protéines SOCS (Stoiber *et al.*, 1999, Dalpke *et al.*, 2001, Kinjyo *et al.*, 2002, Nakagawa *et al.*, 2002) et A20 (Boone *et al.*, 2004, Gon *et al.*, 2004). Les protéines SOCS sont bien connues pour leur rôle dans l'inhibition de la transduction du signal en réponse à des cytokines. En effet, de nombreuses cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12) utilisent la voie de signalisation des JAK/STAT (Ihle et Kerr, 1995) et les protéines SOCS interfèrent avec cette voie (Naka *et al.*, 1997, Alexander, W. S. et Hilton, 2004). Afin d'inhiber la signalisation par les TLRs, SOCS1 cause l'ubiquitination et donc la dégradation de la protéine adaptatrice MAL (Mansell *et al.*, 2006). La protéine A20 quant à elle inhibe la translocation de NF- $\kappa$ B et de IRF3 en empêchant l'ubiquitination de TRAF6, ce qui abroge la suite de la signalisation (Boone *et al.*, 2004, Gon *et al.*, 2004).



### **3.5 Rôles biologiques des TLRs**

Le rôle des TLRs pour le système immunitaire est évident. Ainsi, plusieurs maladies ont été attribuées à une défaillance dans les TLRs. En plus de la susceptibilité au LPS causée par une mutation dans *Tlr4* précédemment décrit, les dernières années ont montré que plusieurs polymorphismes dans les gènes des TLRs sont associés à une susceptibilité accrue pour certains microorganismes (Agnese *et al.*, 2002, Hawn *et al.*, 2003, Cook *et al.*, 2004). Le cas le plus extrême étant cette jeune patiente atteinte de 13 infections bactériennes potentiellement mortelles en seulement 15 ans (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, etc...) (Kuhns *et al.*, 1997). Le séquençage des protéines de la voie de signalisation des TLRs a révélé la présence de deux mutations distinctes dans le gène *IRAK-4*. Ces mutations causent la production d'une protéine tronquée incapable de phosphoryler IRAK-1 (Medvedev *et al.*, 2003, Medvedev *et al.*, 2005).

Une étude récente a démontré qu'avec l'âge, les TLRs deviennent moins efficaces, augmentant ainsi la susceptibilité envers plusieurs microorganismes pathogènes et une mauvaise réponse immunitaire acquise. En effet, non seulement l'expression des TLRs est réduite chez les souris âgées, la sécrétion de TNF- $\alpha$  et IL-6 suite à une stimulation par plusieurs PAMPs est moins forte (Renshaw *et al.*, 2002, Boehmer *et al.*, 2005). En plus, certaines études laissent présager un rôle pour les TLRs dans les réactions allergiques (Lauener *et al.*, 2002, Kabesch et Lauener, 2004).

### **3.6 Les NLRs et les RLRs**

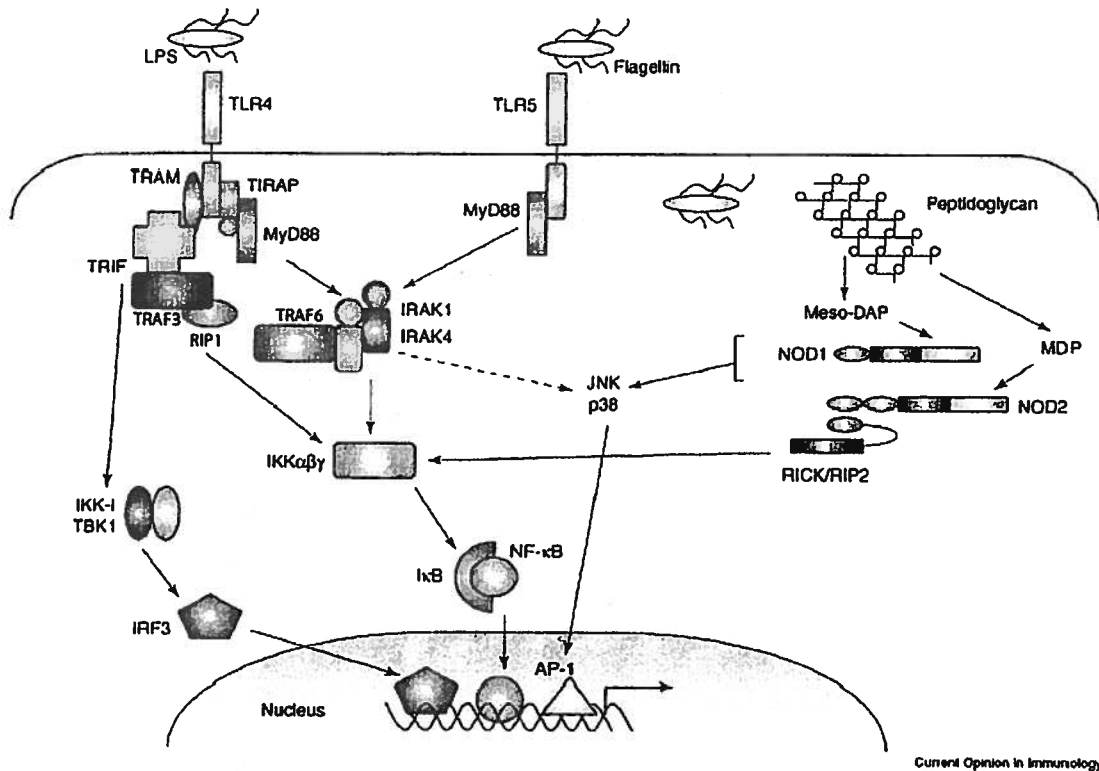
La découverte des TLRs est un des triomphes de la recherche en immunologie. Récemment, deux autres familles importantes dans la réponse immunitaire envers les microorganismes pathogènes ont été décrits, les NOD-like receptors (NLR) et les RIG-like receptors (RLR) (Creagh et O'Neill, 2006). Il est estimé que ces 3 familles coopèrent afin de développer une réponse immunitaire appropriée.

### 3.6.1 Les NOD-like receptors

Due à la localisation membranaire et endosomale des TLRs, la reconnaissance des microorganismes ayant accédé au cytosol nécessite une autre famille de récepteur: les protéines NLRs (Figure 11) (Inohara et Nunez, 2003). Les protéines cytoplasmiques NOD, fortement apparentées aux TLRs, possèdent un domaine LRR pouvant reconnaître les microorganismes et un domaine PYD ou CARD en N-terminal pour la transduction du signal. Dans le génome humain, 23 NLRs ont été identifiés (Ting et Davis, 2005). Les deux protéines les mieux caractérisées sont NOD1 et NOD2, qui reconnaissent respectivement iE-DAP et MDP, deux composantes du peptidoglycan des bactéries Gram-négatives présentes dans le cytoplasme (Chamaillard *et al.*, 2003, Girardin *et al.*, 2003a, Girardin *et al.*, 2003b, Inohara *et al.*, 2003). La liaison aux NLRs permet l'activation de NF- $\kappa$ B, résultant en la production de IL-1 $\beta$  et IL-18 (Figure 11) (Martinon et Tschopp, 2005). De plus, les NLRs NALP1, NALP3 et IPAF sont impliqués dans la formation de l'inflammasome menant à l'activation des caspases-1 et -5 et le processing d'IL-1 $\beta$  (Martinon *et al.*, 2002).

### 3.6.2 Les RIG-like receptors

Comme pour TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9, les RLRs détectent les acides nucléiques d'origine virale et mènent à l'activation des IRFs (Seth *et al.*, 2006). Même si les TLRs sont très importants dans la réponse antivirale, plusieurs virus peuvent induire une réponse immunitaire en absence de TLR (Edelmann *et al.*, 2004, Li, K. *et al.*, 2005). Les deux RLRs les plus connus sont RIG-1 et MDA-5 qui reconnaissent l'ARNdb (Kang *et al.*, 2002, Yoneyama *et al.*, 2004). Suite à cette reconnaissance, il y a activation de NF- $\kappa$ B et IRF3. Contrairement aux TLRs antiviraux qui sont principalement exprimés dans les cellules dendritiques, les RLRs sont présents chez toutes les cellules (Kato *et al.*, 2005).



Source: Delbridge et O'Riordan (2006)

**FIGURE 11 : COOPERATION ENTRE LES TLRs ET LES NLRs** Afin d'obtenir une réponse immunitaire envers un microorganisme pathogène, plusieurs PRRs sont importants. Par exemple, une bactérie Gram-négative est reconnue par TLR4 (LPS), TLR5 (flagelline), NOD1 et NOD2 (peptidoglycan). Tous ces récepteurs agissent de concert afin d'efficacement contrôler une infection par un microorganisme.

## **4 Interaction *Leishmania*-macrophage**

Plusieurs microorganismes sont aptes à s'établir dans les macrophages (tel que *Salmonella*, *Legionella*, *Toxoplasma*, *Mycobacterium* etc...) dont bien sûr *Leishmania* (Meresse *et al.*, 1999, Duclos et Desjardins, 2000). Tel que mentionné au chapitre 1, l'interaction entre le promastigote de *L. donovani* et le macrophage représente un moment clé dans l'établissement de l'infection. Comme tout bon parasite, les leishmanies modulent les fonctions normales de leur hôte afin de bien survivre dans cet environnement. La leishmaniose est principalement une maladie humaine, cependant il est particulièrement non éthique de faire des expériences directement sur les humains. Pour cette raison, la grande majorité des expériences a été réalisée dans un modèle murin (Gumy *et al.*, 2004).

Il est bien connu que le patron de cytokines est déterminant pour la suite de l'infection par *L. major*. L'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 sont les deux cytokines proinflammatoires qui empêchent la réplication du parasite et contrôlent l'infection en induisant une réponse de type Th1. A l'inverse, les cytokines IL-4 et IL-10 induisent une réponse de type Th2, qui ne peut pas contrôler l'infection par *Leishmania* (Locksley *et al.*, 1987, Scott *et al.*, 1988, Heinzel *et al.*, 1989, Padigel *et al.*, 2003, Gumy *et al.*, 2004).

### **4.1 L'internalisation des promastigotes**

Étant donné que *Leishmania* est un parasite intracellulaire, l'internalisation des promastigotes par les macrophages est une étape primordiale. Dès que les promastigotes métacycliques se retrouvent dans le système sanguin des mammifères, ils sont rapidement opsonisés par les composantes du complément. Premièrement, le promastigote métacyclique n'est pas affecté par le complexe d'attaque membranaire du complément. Cette résistance pourrait s'expliquer par le fait que le LPG de ces parasites est deux fois plus long que le LPG des promastigotes procycliques, empêchant

ainsi la formation de ce complexe (Puentes *et al.*, 1990). Cette hypothèse est confirmée par le fait qu'*in vitro*, les procycliques sont sensibles au complément alors que les métacycliques sont résistants. De plus, la métalloprotéase gp63 du parasite clive la composante C3b en la forme inactive C3bi, empêchant ainsi la formation de ce complexe d'attaque membranaire (Brittingham *et al.*, 1995, Brittingham et Mosser, 1996). Étant donné que la phagocytose découlant de la liaison à CR3 inhibe la sécrétion d'IL-12, l'utilisation de ce récepteur pour l'entrée des leishmanies dans le macrophage représente un « choix » logique (Sutterwala *et al.*, 1997, Descoteaux et Turco, 2002). Ainsi, la déposition de C3bi à la surface du parasite favorise sa reconnaissance et son internalisation via CR3. En plus, il a été démontré que gp63, le PPG et le LPG peuvent se lier directement à ce récepteur (Alexander, J. et Russell, 1992, Kedzierski *et al.*, 2004). En plus de CR3, les promastigotes peuvent être phagocytés par plusieurs autres récepteurs : CR1 (Da Silva *et al.*, 1989), le récepteur mannose (Wilson et Pearson, 1986, 1988), les récepteurs scavengers (Tripathi et Gupta, 2003), TLR2 et TLR3 (Flandin *et al.*, 2006). En plus de ces récepteurs, il a été démontré que les chaînes latérales du LPG de *L. major* sont reconnues par la galectine-3 et la galectine-9 du macrophage. Cependant, seule cette dernière est impliquée dans l'interaction entre le parasite et le macrophage (Pelletier et Sato, 2002, Pelletier *et al.*, 2003).

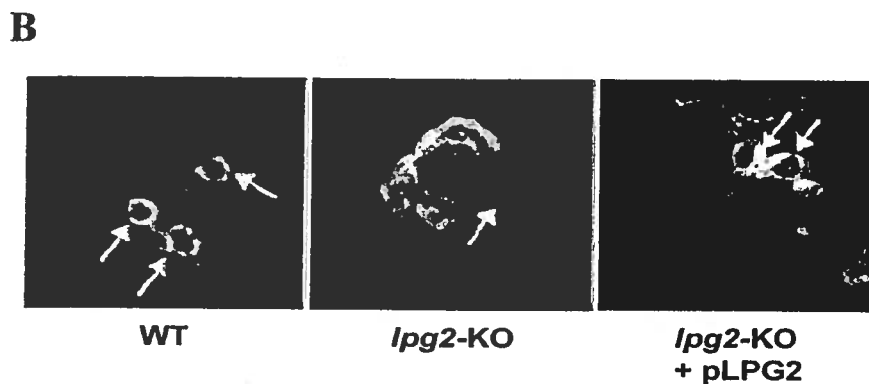
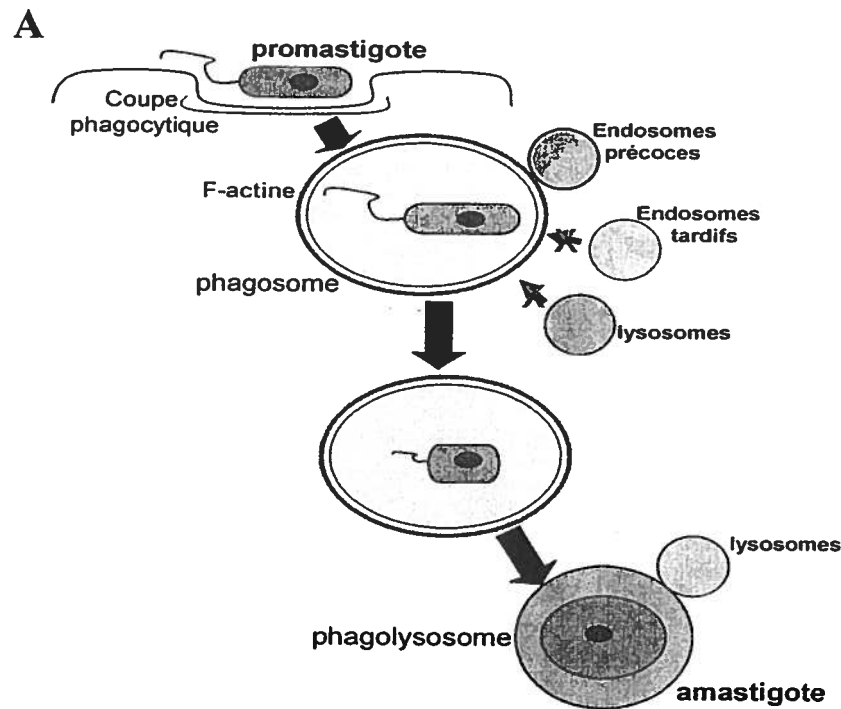
Récemment, des études *in vivo* ont permis d'émettre une hypothèse de cheval de Troie pour expliquer l'entrée silencieuse du promastigote de *L. major* dans les macrophages. Selon ce modèle, les promastigotes pénètrent premièrement dans les neutrophiles, les premières cellules à arriver au site d'infection (Woodman *et al.*, 1998). Les neutrophiles peuvent phagocyter mais pas tuer les promastigotes (Laufs *et al.*, 2002). L'internalisation des promastigotes permet d'augmenter la longévité de ces cellules (environ 42 h pour les neutrophiles infectés versus 12 h pour les non-infectés) et la sécrétion de MIP-1 $\beta$  un facteur chemoattractant des macrophages (Aga *et al.*, 2002). Ceux-ci arrivent au site d'infection environ 42 h après la piqûre, soit au moment où les neutrophiles infectés deviennent apoptotiques. Les macrophages phagocytent ainsi les neutrophiles apoptotiques infectés, un phénomène qui permet la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire TGF- $\beta$ . Il a bien été établi que les promastigotes qui

pénètrent ainsi dans les macrophages survivent et se multiplient adéquatement dans la cellule. C'est de cette façon que les leishmanies utilisent les neutrophiles comme un cheval de Troie pour leur entrée silencieuse (Van Zandbergen *et al.*, 2004).

Dernièrement, une étude a démontré qu'environ 50% des promastigotes métacycliques lors de l'infection sont apoptotiques. Ce qui pourrait sembler comme une erreur de laboratoire est plutôt un mécanisme fort bénéfique pour les parasites. En effet, un inoculum composé entièrement de parasites vivants ne peut pas survivre dans les neutrophiles. Cependant, un inoculum composé à 50% de promastigotes apoptotiques induit la sécrétion de TGF- $\beta$  tout en inhibant la production de TNF- $\alpha$  par les neutrophiles, permettant ainsi l'établissement de l'infection (Tripathi et Gupta, 2003, Van Zandbergen *et al.*, 2006).

## **4.2 Retard dans la maturation du phagosome**

Suite à la phagocytose, le promastigote doit se différencier en amastigote afin de survivre dans le phagolysosome. *In vitro*, cette différenciation dure environ 12 h (Barak *et al.*, 2005). À cette fin, les promastigotes retardent la maturation du phagosome en phagolysosome, laissant assez de temps pour leur différenciation en amastigote (Desjardins et Descoteaux, 1997). En temps normal, l'actine filamenteuse retrouvée autour du phagosome naissant se dépolymérise rapidement (Aderem et Underhill, 1999). Cependant, il a été observé que les phagosomes contenant les promastigotes conservaient l'actine périphagosomale (Figure 12). Cette absence de dépolymérisation est entièrement LPG-dépendante car la même accumulation d'actine est observée autour des phagosomes contenant des promastigotes WT ou des levures opsonisées au LPG, mais pas autour des phagosomes contenant les mutants *lpg2*-KO (Holm *et al.*, 2001). Ceci s'explique par la rétention, LPG-dépendante, au phagosome de la GTPase Cdc42 et de protéines requises pour la polymérisation de la F-actine (Arp2/3, WASP, Myosin) (Lodge et Descoteaux, 2005) ainsi que par l'inhibition de la PKC- $\alpha$  par le LPG (Holm *et al.*, 2003). Concrètement, l'actine filamenteuse forme une



Source : A) Lodge et Descoteaux (2005) B) Lodge *et al.* (2006)

**FIGURE 12 : LEISHMANIA RETARDE LA MATURATION DU PHAGOSOME** A) L'accumulation d'actine autour des phagosomes contenant les promastigotes de *Leishmania* empêche la fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes. L'actine périphagosomale cause un retard dans la maturation du phagosome, permettant aux promastigotes de se différencier en amastigotes. B) Des macrophages infectés avec *L. donovani* et marqués avec la phalloïdine permettent d'observer l'accumulation LPG-dépendante d'actine périphagosomale.

barrière physique empêchant la maturation du phagosome, tel que démontré par le retard dans le recrutement des marqueurs des endosomes tardifs (Rab7) et des lysosomes (LAMP-1) (Figure 12A) (Desjardins et Descoteaux, 1997, Scianimanico *et al.*, 1999, Holm *et al.*, 2001). Il est bien connu que le LPG s'insère dans la membrane du phagosome, ce qui détruit les radeaux lipidiques, altérant ainsi les propriétés biochimiques de la membrane, la rendant moins fusogénique (Miao *et al.*, 1995, Dermine *et al.*, 2000, Dermine *et al.*, 2001, Dermine *et al.*, 2005). Finalement, 48 h après l'infection, le pH intraphagosomal se situe entre pH 4.7 et pH 5.2 et on observe la présence des marqueurs lysosomaux et des cathepsines B, D, H et L (Antoine *et al.*, 1990, Lang *et al.*, 1994).

### **4.3 Altération des voies de signalisation**

Une fois dans le macrophage, *Leishmania* modifie plusieurs voies de signalisation du macrophage afin de favoriser sa survie. D'ailleurs, *Leishmania* est bien reconnu pour causer une suppression générale de la signalisation du macrophage. En utilisant un microarray composé de 588 gènes du macrophage, il a été démontré que des 245 gènes exprimés dans les macrophages non-infectés, 37% sont modulés négativement d'au moins deux fois suite à une stimulation par les amastigotes de *L. donovani* (Buates et Matlashewski, 2001).

#### **4.3.1 Inhibition de la production de NO et ROI**

Le NO et les intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène (ROI) sont les armes chimiques ultimes pour la destruction des *Leishmania* (Lemesre *et al.*, 1997). Ces deux classes de molécules agissent de concert pour contrôler une infection par *Leishmania*. Des études *in vivo* avec *L. major* ont démontré qu'iNOS est primordial pour le contrôle de l'infection au niveau de la peau et des ganglions mais assez marginal dans la rate. Au contraire, le système phox est primordial pour le contrôle de la charge parasitaire



dans la rate alors qu'à la peau et aux ganglions, il agit de concert avec iNOS (mais sans pouvoir le remplacer) afin de prévenir la résurgence de lésions (Blos *et al.*, 2003).

Le NO est probablement l'agent le plus leishmanicide de l'arsenal du macrophage. D'ailleurs, les souris NOS2<sup>-/-</sup> sont incapables de contrôler une infection par *Leishmania* (Diefenbach *et al.*, 1998). L'inhibition d'iNOS est causée par le LPG et les GIPLs. En effet, la stimulation d'un macrophage par du LPG ou des GIPLs purifiés est suffisante pour inhiber la sécrétion de NO (Proudfoot *et al.*, 1995, Proudfoot *et al.*, 1996).

La production de ROI par le complexe NADPH oxydase (phox, voir section 2.1.1), des phagocytes est un mécanisme iNOS-indépendant permettant de contrôler une infection par *Leishmania*. Ainsi, même si les promastigotes sont susceptibles aux ROI (Murray, 1981), les promastigotes résistent à leur action afin de survivre dans les macrophages. Tel que mentionné précédemment, le complexe NADPH oxydase est composé de sous-unités membranaires et cytosoliques. Une étude de notre laboratoire a démontré que l'assemblage du complexe phox est déficient aux phagosomes contenant les promastigotes de *L. donovani* (Lodge *et al.*, 2006). Par immunofluorescence, il a été établi que gp91*phox* est présent aux phagosomes contenant les promastigotes de *L. donovani* WT ou LPG-déficients. Cependant, les composantes cytosoliques p47*phox* et p67*phox* ne sont pas recrutées aux phagosomes de leishmanies WT contrairement aux LPG-déficients (Lodge *et al.*, 2006). En plus de ce mécanisme chez les promastigotes, la phagocytose des amastigotes ne s'accompagne pas de la formation de ce complexe. Contrairement aux promastigotes, l'absence de complexe phox par les amastigotes est causée par la non activation de la composante p47*phox* (Lodge et Descoteaux, 2006). Il est important de noter que cette déficience dans l'assemblage du complexe phox est locale, les autres phagosomes de la cellule peuvent bien créer un complexe actif (Lodge et Descoteaux, 2006, Lodge *et al.*, 2006).

### 4.3.2 Inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

Afin de contrôler les pathogènes, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par le macrophage est une étape primordiale. Inversement, *Leishmania* inhibe la production de plusieurs de ces cytokines afin de faciliter sa survie. Les cas les plus connus sont IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-12. En effet, il a été démontré que le LPG de *Leishmania* inhibe la production d'IL-1 $\beta$  en supprimant sa transcription. À cette fin, le LPG agit via une séquence unique inhibitrice dans le promoteur du gène de l'IL-1 $\beta$  (nt -310 à -57) (Reiner, 1987, Hatzigeorgiou *et al.*, 1996). TNF- $\alpha$  augmente grandement l'activité leishmanicide des macrophages. Comme pour IL-1 $\beta$ , les macrophages infectés par *Leishmania* sécrètent peu de TNF- $\alpha$  en réponse au LPS (Descoteaux et Matlashewski, 1989).

L'IL-12 est une puissante cytokine pro-inflammatoire favorisant une réponse de type Th1 qui confère la protection envers *Leishmania* (Heinzel *et al.*, 1993, Sypek *et al.*, 1993, Scharon-Kersten *et al.*, 1995). Ainsi, il est fort compréhensible que *Leishmania* inhibe la production d'IL-12 (Carrera *et al.*, 1996, Belkaid *et al.*, 1998a, Piedrafita *et al.*, 1999). D'ailleurs, *in vivo*, l'IL-12 est sécrété par les cellules dendritiques et non par les macrophages en réponse à *L. donovani* (Gorak *et al.*, 1998).

### 4.3.3 Activation de la production de cytokines anti-inflammatoires

En plus d'inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, *Leishmania* induit la production de cytokines anti-inflammatoires augmentant ainsi ses chances de survie. Les trois cytokines les mieux connues sont IL-10, IL-4 et TGF- $\beta$ . Cette dernière diminue grandement l'expression d'iNOS et TNF- $\alpha$  chez les macrophages et inhibe la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (Gorelik *et al.*, 2002, Li, M. O. *et al.*, 2006). Ainsi, son rôle dans l'établissement de l'infection par *Leishmania* est bien

accepté (Rodrigues *et al.*, 1998). En effet, les souris BALB/c sont susceptibles à *L. major* cependant, l'inactivation du récepteur au TGF- $\beta$  de ces souris est suffisant pour leur conférer la résistance à ces parasites (Laouar *et al.*, 2005). Le TGF- $\beta$  pourrait être sécrété suite à la reconnaissance des promastigotes apoptotiques par les neutrophiles (section 4.1). Suite à une infection par les amastigotes cependant, TGF- $\beta$  n'est pas induit via une augmentation de la transcription du gène mais plutôt par le clivage de la pro-TGF- $\beta$  par la cystéine protéase du parasite (Gantt *et al.*, 2003).

L'IL-4 est une importante cytokine qui permet la polarisation vers une réponse de type Th2. Le rôle de l'IL-4 dans le déclenchement de l'infection par *L. major* est très clair. En effet, une mutation dans le récepteur à l'IL-4 est suffisante pour conférer la résistance aux souris susceptibles. Inversement, l'ajout d'IL-4 aux souris résistantes les rend susceptibles (Chatelain *et al.*, 1992, Leal *et al.*, 1993, Kopf *et al.*, 1996). L'IL-10, comme IL-4, polarise vers une réponse de type Th2. Le rôle de cette cytokine dans le développement de l'infection a été prouvé avec des expériences similaires à celles concernant IL-4 (Kane et Mosser, 2001, Viana Da Costa *et al.*, 2002, Noben-Trauth *et al.*, 2003).

#### 4.3.4 Inhibition des PKC

Les PKC sont une famille de sérine/thréonine kinase importantes dans la signalisation et sont associées à plusieurs mécanismes tels que l'induction de la flambée oxidative ou la mobilité des endosomes (Blobe *et al.*, 1996). Ainsi, l'inhibition de PKC représente une stratégie efficace pour la survie de *Leishmania* (Olivier *et al.*, 1992). D'ailleurs, les leishmanies survivent mieux dans les macrophages exprimant un dominant-négatif (DN) de PKC- $\alpha$  (St-Denis *et al.*, 1999). À cette fin, le LPG et les GPIs sont reconnus comme de puissants inhibiteurs des PKC (McNeely et Turco, 1987, McNeely *et al.*, 1989). En ce qui concerne le LPG, son activité inhibitrice de la PKC se produit au travers de la double couche lipidique du phagosome. En effet, son insertion dans la membrane cause la destruction des microdomaines lipidiques,

empêchant ainsi la formation du signalosome (Miao *et al.*, 1995, Giorgione *et al.*, 1996, Dermine *et al.*, 2005).

#### 4.3.5 Les MAP kinases

Les cascades de signalisation p38 MAPk, ERK1/2 et JNK sont importantes pour la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. D'ailleurs l'ajout d'un activateur de p38 MAPk est suffisant pour activer iNOS et conférer la résistance envers *Leishmania* (Awasthi *et al.*, 2003). Chez les macrophages naïfs, les voies p38 MAPk, ERK1/2 et JNK ne sont pas activées suite à l'attachement et l'internalisation des promastigotes de *L. donovani* (Prive et Descoteaux, 2000). Cependant, la stimulation de macrophages naïfs par les promastigotes *lpg1-KO* et *lpg2-KO* cause l'activation rapide de ERK1 et ERK2, ce qui laisse présager un rôle pour le LPG dans l'évasion de cette voie de signalisation. En ce qui concerne JNK et p38 MAPk, ces voies ne sont pas activées dans les macrophages naïfs en réponse à *L. donovani* (Prive et Descoteaux, 2000).

#### 4.3.6 Inhibition de la voie des JAK/STAT

La voie de signalisation des JAK/STAT est activée en réponse à plusieurs cytokines. Étant donné l'importance de cette voie pour la résistance à *Leishmania*, il est attendu que ces parasites inhibent cette voie (Rosas *et al.*, 2003). À cette fin, *Leishmania* peut interférer de deux façons : via l'induction soit des protéines SOCS, soit de la phosphotyrosine phosphatase SHP-1.

##### 4.3.6.1 Induction des SOCS

Les protéines SOCS sont bien connues pour leur activité inhibitrice des cytokines et sont normalement utilisées par le macrophage afin de limiter la réponse inflammatoire (voir section 3.3.3). Cependant, l'effet de *Leishmania* sur l'expression

des SOCS n'est pas encore bien établi. Selon de Veer *et al.*(2003), le LPG de *L. major* induit l'expression de SOCS1 et SOCS3. Cependant, un autre groupe a démontré que SOCS3, mais pas SOCS1, est induit par *L. donovani*, vivants ou tués à la chaleur, mais pas par le LPG purifié (Bertholet *et al.*, 2003). En plus, Olivier *et al.* (2005) ne voit pas d'induction de SOCS par *L. donovani*. Philosophiquement parlant, l'induction de ces protéines représenterait une excellente façon pour *Leishmania* de favoriser sa survie. Alors que les macrophages dérivés de souris *Socs1*<sup>-/-</sup> tuent plus efficacement les parasites (Alexander, W. S. *et al.*, 1999), les souris exprimant constitutivement SOCS3 montrent un fort biais vers une réponse immunitaire de type Th2 (Seki *et al.*, 2003).

#### **4.3.6.2 Activation de SHP-1**

Cette phosphatase est un régulateur négatif de plusieurs cytokines et agit de plusieurs façons, notamment en inhibant la voie des JAK/STAT (Rakesh et Agrawal, 2005). Le facteur d'élongation EF-1 $\alpha$  de *L. donovani* active la phosphotyrosine phosphatase SHP-1 (Olivier *et al.*, 1998, Blanchette *et al.*, 1999, Nandan *et al.*, 2002). En réponse à *L. donovani*, les macrophages déficients en SHP-1 produisent plus de NO et réussissent à contrôler les *Leishmania* plus efficacement que les macrophages WT (Forget *et al.*, 2001). En plus, les souris déficientes en SHP-1 montrent une plus forte activité inflammatoire et une sécrétion plus abondante d'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  et de chimiokines (Forget *et al.*, 2005b). Un autre mécanisme pour inhiber cette voie de signalisation est la dégradation de STAT-1 $\alpha$  par un mécanisme SHP-1-indépendant (Forget *et al.*, 2005a, Olivier *et al.*, 2005, Forget *et al.*, 2006).

### **4.4 Le macrophage activé à l'IFN- $\gamma$ contrôle *Leishmania***

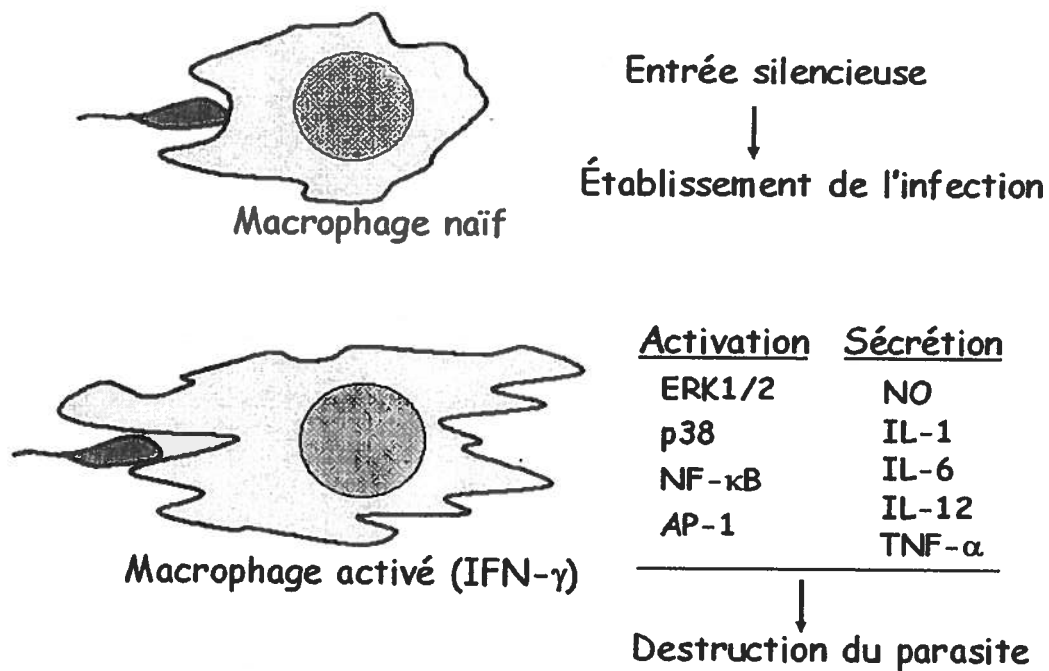
Tel que décrit précédemment, une réponse de type Th1 permet de bien contrôler l'infection par *Leishmania*. En ce sens, une infection *in vitro* de macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  résulte en la mort du parasite. En effet, il est connu depuis longtemps

que l'activation du macrophage par l'IFN- $\gamma$ , ou l'ajout simultané d'IFN- $\gamma$  et LPS, induit l'expression d'iNOS, ce qui mène à la destruction de *Leishmania* (Murray *et al.*, 1985, Nacy *et al.*, 1985, Roach *et al.*, 1991).

Alors que l'entrée du promastigote de *L. donovani* dans les macrophages naïfs est une étape silencieuse afin de permettre l'établissement de l'infection, les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  sécrètent du NO, IL-1 et TNF- $\alpha$  afin de tuer les parasites (Reiner *et al.*, 1990, Prive et Descoteaux, 2000, Flandin *et al.*, 2006). De plus, l'internalisation dans ces macrophages s'accompagne de la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 et de l'activation des voies p38 MAPk et ERK1/2 (Figure 13) (Prive et Descoteaux, 2000) (Chano et Descoteaux, résultats non-publiés).

#### **4.5 Reconnaissance de *Leishmania* par les TLRs**

À cause de l'immense importance des TLRs dans la réponse immunitaire, la relation entre *Leishmania* et les TLRs est un récent champ d'études important. La première étude laissant présager un rôle des TLRs dans la reconnaissance des leishmanies a été publiée en 2002. Dans cette publication, ils ont montré qu'IL-1 $\alpha$  sécrété suite à la reconnaissance de *L. major* par le macrophage est MyD88-dépendant (Hawn *et al.*, 2002). Par la suite, le rôle de TLR2 dans la reconnaissance du LPG de *Leishmania* par les macrophages et les cellules NK a été bien établi pour *L. major* (Becker, I. *et al.*, 2003, De Veer *et al.*, 2003). De plus, Becker *et al.* (2003) a démontré que le LPG de *L. major* cause une augmentation de l'expression de TLR2 chez les cellules NK. À cette fin, le LPG des promastigotes métacycliques est un plus fort activateur de TLR2 que le LPG des promastigotes procycliques (Becker, I. *et al.*, 2003). En plus, il a aussi été démontré que les souris MyD88-KO sont plus susceptibles aux infections par *L. major* (De Veer *et al.*, 2003), principalement parce que celles-ci déclenchent une réponse immunitaire de type Th2 (Muraille *et al.*, 2003).



**FIGURE 13 : LA REPOSE IMMUNITAIRE ENVERS LES PROMASTIGOTES DE *L. DONOVANI***  
 L'entrée silencieuse des promastigotes dans les macrophages naïfs permet l'établissement de l'infection. Au contraire, les macrophages activés à l'IFN-γ résistent à l'infection.

En plus de TLR2, TLR4 est important dans le contrôle de l'infection par *L. major* (Kropf *et al.*, 2004a, Kropf *et al.*, 2004b). En utilisant des souris TLR4-KO, ils ont montré que *L. major* cause des lésions plus grandes chez ces souris contrairement aux souris WT. En plus, les souris TLR4-KO ne peuvent pas contrôler l'infection par *L. major*, et ce probablement à cause de l'absence d'activation d'iNOS chez celles-ci. Cependant, TLR4 n'est pas impliqué dans la sécrétion des chimiokines RANTES/CCL5, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, IP-10/CXCL10 et MCP-1/CCL2 en réponse à *L. major* (Antoniazzi *et al.*, 2004).



# **PREMIÈRE PUBLICATION**

## Résumé de la première publication

Flandin, J.-F., Chano, F. et Descoteaux A. (2006) RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- $\gamma$ -primed macrophages. *Eur J Immunol* 36 (2), 411-20.

Il est bien connu que les promastigotes de *L. donovani* entrent silencieusement dans les macrophages au repos afin d'établir l'infection. Au contraire, dans les macrophages préalablement activés à l'IFN- $\gamma$ , les parasites causent la translocation de NF- $\kappa$ B, l'activation des voies de signalisation MAPk et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, résultant en la destruction des leishmanies. Dans cette publication, nous avons émis l'hypothèse que l'IFN- $\gamma$  induise l'expression d'un récepteur de reconnaissance pour la forme promastigote de *L. donovani*. L'observation que la kinase IRAK-1, qui joue un rôle central dans la voie de signalisation des TLRs, est activée suite à une stimulation par les parasites dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  contrairement aux macrophages naïfs, laisse présager que ce PRR est un TLR. En effet, par RT-PCR, nous avons démontré que TLR3 est le seul TLR absent des macrophages au repos dont l'expression est induite par l'IFN- $\gamma$ . Afin d'étudier la contribution de ce récepteur à la réponse immunitaire des macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  envers les promastigotes de *L. donovani*, nous avons décidé d'utiliser la technique nouvellement mise au point d'interférence ARN (RNAi). Cette méthode permettant de diminuer l'expression de protéines spécifiques, nous avons démontré que TLR3 est impliqué dans la sécrétion de NO et de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  en réponse aux promastigotes de *L. donovani*. Au cours de cette recherche, deux groupes différents ont démontré le rôle de TLR2 dans la reconnaissance du LPG de *L. major*, nous avons donc inclus ce récepteur dans nos différentes expériences. En utilisant des mutants dans la biosynthèse du LPG, nous avons pu démontrer que TLR2 reconnaît les phosphoglycans contenant les unités répétées de Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$  de *L. donovani*. Étant donné que les TLRs sont les nouveaux enfants chéris de l'immunologie et que leur rôle dans une vaste quantité de phénomènes est découvert fréquemment, nous avons vérifié le rôle de TLR2

et TLR3 dans la phagocytose et l'activité leishmanicide des macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ . Nos résultats démontrent que ces deux récepteurs facilitent l'internalisation des promastigotes de *L. donovani* par les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ . En plus, et probablement à cause de son rôle dans la sécrétion de NO, TLR3 est impliqué dans l'activité leishmanicide des macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ .

#### Contribution des auteurs

Jean-Frédéric Flandin : Travaux pour les figures 2 à 7, rédaction du manuscrit

Frédéric Chano : Travaux pour la figure 1

Albert Descoteaux : Directeur de J-F Flandin et F. Chano, révision et édition du manuscrit

**RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- $\gamma$ -primed macrophages**

Jean-Frédéric Flandin, Frédéric Chano, and Albert Descoteaux\*

\*INRS- Institut Armand-Frappier and Centre for host-parasite interactions, Laval QC, Canada.

Keywords: Macrophages, Toll-like receptors, *Leishmania*, Innate immunity, Phagocytosis

\*Correspondence to: Albert Descoteaux

INRS- Institut Armand-Frappier

531 boul des Prairies

Laval, QC, Canada H7V 1B7

Fax: +1-450-686-5301

phone: +1-450-687-5010,

e-mail: [albert.descoteaux@iaf.inrs.ca](mailto:albert.descoteaux@iaf.inrs.ca)

Abbreviations used: BMM, bone marrow-derived macrophages; LPG, lipophosphoglycan; PGN, peptidoglycan; IRAK, Interleukin-1 receptor-associated kinase; MyD88, Myeloid differentiation factor 88; NO, nitric oxide; PGN, peptidoglycan; siRNA, small interfering RNA; RNAi, RNA interference.

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-57691). A.D. is a chercheur-boursier from FRSQ and a holder of a Canada Research Chair.

## Summary

*Leishmania donovani* promastigotes evade the induction of a proinflammatory response during the invasion of naive macrophages. However, their entry in IFN- $\gamma$ -primed macrophages is accompanied by the secretion of NO and proinflammatory cytokines. In the present study, we addressed the hypothesis that priming with IFN- $\gamma$  induces the expression of a receptor which enables mouse macrophages to recognize *L. donovani* promastigotes. We observed that in IFN- $\gamma$ -primed macrophages, *L. donovani* promastigotes stimulated Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) activity. We next showed that Toll-like receptor (TLR)3 expression was barely detectable in naive macrophages but expressed in IFN- $\gamma$ -treated macrophages. Silencing of TLR3, TLR2, IRAK-1, and MyD88 expression by RNA interference revealed that both TLRs are involved in the secretion of NO and TNF- $\alpha$  induced by *L. donovani* promastigotes. Using *L. donovani* mutants, we showed that TLR2-mediated responses were dependent on Gal $\beta$ 1,4Man $\alpha$ -PO $_4$ -containing phosphoglycans, whereas TLR3-mediated responses were independent of these glycoconjugates. Furthermore, our data indicated a participation of TLR2 and TLR3 in the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes and a role for TLR3 in the leishmanicidal activity of the IFN- $\gamma$ -primed macrophages. Collectively, our data are consistent with a model where recognition of *L. donovani* promastigotes depends on the macrophage activation status, and requires the expression of TLR3.

## 1. Introduction

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* infect millions of people worldwide, causing a wide spectrum of diseases collectively termed leishmaniasis that vary in their clinical manifestations. Whereas cutaneous leishmaniasis, an infection characterized by ulcerative lesions of the skin, is generally a self-healing disease, visceral leishmaniasis (Kala-azar), represents the most severe clinical manifestation of *Leishmania* infection. The causative agent, *L. donovani*, infects macrophages of the liver, the spleen, and the bone marrow. *Leishmania* is transmitted by the blood-sucking female sand fly vector, where it exists under its promastigote form. Infectious promastigotes are inoculated into the vertebrate host upon the bloodmeal of the infected sand fly. There, promastigotes resist the lytic action of complement and are phagocytosed by mononuclear phagocytes. Once inside, they differentiate into amastigotes, which proliferate within acidic and hydrolase-rich phagolysosomes.

Failure to activate macrophages during the invasion process may contribute to the successful establishment of *Leishmania* promastigotes within the mammalian host [1, 2]. In the case of *L. donovani*, entry of promastigotes in macrophages occurs in the absence of a pro-inflammatory response and nitric oxide secretion [3-5], which presumably contributes to the establishment of infection. In IFN- $\gamma$ -primed bone marrow-derived macrophages, *L. donovani* promastigotes induce the activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways, as well as the secretion of TNF- $\alpha$  and NO which is required for parasite killing by IFN- $\gamma$ -primed macrophages [5-7]. Whether IFN- $\gamma$  induces the expression of a *L. donovani* promastigote recognition receptor(s) is an hypothesis that deserves consideration.

Of the growing number of receptors involved in the recognition of pathogen-associated molecular patterns [8], TLRs are considered key players of the innate immune response [9-11]. This family of receptors comprises over 10 members which allow the recognition of a whole range of microbial pathogens, leading to the

production of inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-12, as well as the induction of iNOS expression [11-14]. All TLRs share a conserved upstream signalling pathway [15]. Following the recognition of a PAMP, the adaptor molecule MyD88 is recruited to the TIR domain of the TLR [16]. Next, the kinase IRAK-1 is recruited to the complex, is phosphorylated by IRAK-4 and by autophosphorylation, and then dissociates from MyD88 to interact with TRAF6 and activates various cascades, ultimately leading to the activation of MAP kinase pathways, the translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus as well as the secretion of proinflammatory cytokines [16-18]. Another pathway, termed “MyD88-independent”, is implicated in signalling following engagement of TLR3 and TLR4. This cascade uses TRIF as an adaptor protein and allows the translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus and the activation of MAP kinase pathways, with a slower kinetics, as well as the activation of IP-10 and IFN- $\alpha/\beta$  via the activation of IRF3 [14, 19, 20]. Furthermore, recent studies suggested that TLRs are implicated in a variety of phenomena in macrophages, including phagocytosis and phagosome maturation and microbicidal activity [21-25].

Recently, two distinct TLRs have been implicated in the recognition and immune responses against *L. major*. MyD88 is required for the secretion of IL-1 $\alpha$  by mouse peritoneal macrophages following infection by *L. major* promastigotes [26], and MyD88-deficient mice are more susceptible to infection with *L. major* [27]. LPG, a GPI-anchored polymer of repeating Gal $\beta$ 1-4Man $\alpha$ -PO $_4$  unit and a prominent promastigote surface glycoconjugate [28], activates both mouse macrophages and human NK cells through TLR2 [27, 29]. In addition, *in vivo* studies in mice revealed an important role for TLR4 in the control of *L. major* infection, possibly through the regulation of inducible NO synthase expression [30]. In the present study, we present evidence that TLR3 also contributes to the recognition of *L. donovani* promastigotes, thereby supporting the concept that orchestration of an appropriate immune response against a pathogen involves cooperation between multiple receptors [31].

## 2. Results

### 2.1 *L. donovani* promastigotes activate IRAK-1 in IFN- $\gamma$ -primed macrophages.

We sought to determine whether the induction of a proinflammatory response in IFN- $\gamma$ -primed macrophages exposed to *L. donovani* promastigotes was the result of a TLR activation. To this end, we performed *in vitro* kinase assays on IRAK-1 immunoprecipitated from either naive or IFN- $\gamma$ -primed macrophages following stimulation with *L. donovani* promastigotes. As shown in Figure 1A, *L. donovani* promastigotes had no effect on IRAK-1 activity in naive BMM (Fig. 1A, lanes 2-4). In contrast, *L. donovani* promastigotes increased IRAK-1 activity by 1.9-fold at 30 min in IFN- $\gamma$ -primed BMM (Fig. 1C, lane 4). Similar results were obtained with RAW 264.7 cells (Fig. 1B and 1D). These data suggest that *L. donovani* promastigotes are recognized by a TLR in IFN- $\gamma$ -primed macrophages. Alternatively, IRAK-1 activation could be the consequence of a recognition by IL-1 receptors.

### 2.2 TLR3 is upregulated in IFN- $\gamma$ -primed macrophages

TLR expression can be modified by various cytokines and depends on factors such as cell type and localization [32-35]. Since IRAK-1 is rapidly activated by *L. donovani* promastigotes in IFN- $\gamma$ -primed macrophages, we speculated that IFN- $\gamma$  might induce the expression of a TLR in macrophages that would be responsible for the recognition of *L. donovani* promastigotes. We thus compared by RT-PCR the expression of various TLRs in naive and IFN- $\gamma$ -primed BMM. As shown in Figure 2A, TLR1 (lanes 1-2), TLR2 (lanes 3-4), TLR4 (lanes 7-8), TLR6 (lanes 11-12), TLR7 (lanes 13-14) and TLR8 (lanes 15-16) were expressed at similar levels in naive and IFN- $\gamma$ -primed BMM, whereas TLR5 (lanes 9-10) and TLR9 (lanes 17-18) were not expressed in these cells. Similarly, we noticed no difference in the expression of the housekeeping gene HPRT (lanes 19-20) in naive and IFN- $\gamma$ -primed BMM. TLR3 was the only TLR whose expression was undetectable in naive macrophage (lane 5) and induced by IFN- $\gamma$  treatment (lane 6). Using an antibody against TLR3, we confirmed by immunofluorescence that TLR3 expression was induced by IFN- $\gamma$  but not PGN in RAW



264.7 macrophages (Fig. 2B). Stimulation of RAW 264.7 cells with the TLR2 ligand PGN did not induce TLR3 expression. PGN-stimulated RAW 264.7 cells were therefore used as a negative control for immunofluorescence (Fig. 2B). This observation is consistent with a previous study showing that IFN- $\gamma$  up-regulates TLR3 expression in mouse macrophages [36].

### **2.3 Silencing of either IRAK-1, MyD88, TLR2 and TLR3 impairs the secretion of NO and TNF- $\alpha$ following infection of IFN- $\gamma$ -primed macrophages by *L. donovani* promastigotes.**

To assess the possible role(s) of TLR3 in the recognition of *L. donovani* promastigotes by IFN- $\gamma$ -primed macrophages, we used RNAi to inhibit its expression. We also inhibited IRAK-1 and MyD88 expression as they represent key TLR downstream signaling intermediates. Given the recent evidence that LPG signals via TLR2 [27, 29], we included this TLR in our silencing experiments. BMM being not suitable for siRNA transfection (not shown), we used the murine macrophage line RAW 264.7 for these experiments, since the expression pattern of TLR3 (as well as for the other TLRs) observed in naive and IFN- $\gamma$ -primed RAW 264.7 cells was similar to that observed in BMM (Fig. 2B and data not shown). As shown in Figure 3, transfection of RAW 264.7 cells with the various siRNAs reduced the expression of IRAK-1, MyD88, TLR2 and TLR3. Following treatment with the siRNAs, cells were incubated with 100 U/ml IFN- $\gamma$  for 18 h prior to stimulation with either *L. donovani* promastigotes, LPS, poly(I):poly(C) or PGN. Cell supernatants were collected 18 h later and the levels of nitrite and TNF- $\alpha$  were determined. As a control, we used an siRNA specific for GFP [37]. As previously shown in BMM [5], *L. donovani* promastigotes stimulated NO secretion only in IFN- $\gamma$ -primed RAW 264.7 cells (Fig. 4A). Silencing of either IRAK-1, MyD88, TLR2 or TLR3 led to a significant inhibition of NO secretion induced by WT *L. donovani* promastigotes in IFN- $\gamma$ -primed macrophages (respectively 6.2-, 2.2-, 4.1- and 36-fold reduction, with respect to siRNA for GFP) (Fig. 4B). Similar results were obtained with the LPG-deficient mutant *lpg1*-KO (3.9-, 2.0-, 2.2- and 57-fold reduction, respectively, with respect to siRNA for GFP). In the absence of LPG and other

Gal $\beta$ 1,4Man-PO<sub>4</sub>-containing phosphoglycans, secretion of NO induced by the *lpg2*-KO mutant was inhibited by siRNAs for IRAK-1, MyD88 and TLR3 (2.2-, 4.5-, and 100-fold reduction, respectively) but not for TLR2 (Fig. 4B).

TNF- $\alpha$  is secreted following the engagement of TLRs [38] and by IFN- $\gamma$ -primed macrophages exposed to *L. donovani* promastigotes [5]. Similar to the results obtained for NO, secretion of TNF- $\alpha$  induced by *L. donovani* promastigotes was significantly inhibited by silencing IRAK-1, MyD88, TLR2, and TLR3 (40-, 1.6-, 47- and 40-fold reduction, respectively, with respect to siRNA for GFP) (Fig. 5A). As was the case for NO, phosphoglycan-deficient *lpg2*-KO mutants stimulated TNF- $\alpha$  secretion independently of TLR2 (Fig. 5A). To demonstrate the specificity of the siRNAs used for these experiments, we performed various controls. Figures 4C and 5B show that siRNA for TLR3 inhibited the secretion of NO and TNF- $\alpha$  stimulated by poly(I):poly(C) (2.5- and 4.7-fold reduction, respectively) but not by PGN or by LPS. Similarly, siRNA for TLR2 inhibited the secretion of NO and TNF- $\alpha$  induced by PGN (2.5- and 1.9-fold reduction, respectively) but not by poly(I):poly(C) or LPS. These observations indicate that the recognition of *L. donovani* promastigotes and the downstream secretion of NO and TNF- $\alpha$  by IFN- $\gamma$ -primed macrophages requires TLR2, TLR3, MyD88 and IRAK-1.

#### **2.4 TLR2 and TLR3 contribute to the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes.**

Recently, Doyle and colleagues [23] proposed a role for TLRs in the phagocytosis of bacteria. We thus investigated the possible roles of TLR2 and TLR3 in the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes by RAW 264.7 macrophages. Following treatment with siRNA for TLR2 or TLR3, macrophages were primed with IFN- $\gamma$  and infected with either WT or *lpg2*-KO promastigotes. The number of promastigotes internalized per 100 cells was determined by confocal microscopy. Silencing of TLR3 resulted in decreased internalization of both WT and *lpg2*-KO promastigotes (25% and 20% reduction, respectively) (Fig. 6). In contrast, the internalization of WT but not *lpg2*-KO promastigotes was reduced by 25% in the absence of TLR2 (Fig. 6). This is in

agreement with the role of TLR2 in the recognition of Gal $\beta$ 1,4Man-PO<sub>4</sub>-containing phosphoglycans. Furthermore, as noticed by Blander and Medzhitov [22], in cells where TLR2 or TLR3 expression was silenced, we observed a greater number of parasites that were attached but not internalized (data not shown).

### **2.5 TLR3 is required for the leishmanicidal activity of IFN- $\gamma$ -primed macrophages.**

Since TLRs are implicated in the microbicidal activity of macrophages [22], we measured the survival of *L. donovani* promastigotes following their phagocytosis by IFN- $\gamma$ -primed macrophages treated with siRNAs specific for GFP, IRAK-1 and TLR3. As a control, we infected naive macrophages with promastigotes. As shown in Fig. 7, *L. donovani* survived and started to replicate 36 h post-infection in naive macrophages (diamond), whereas they were killed by IFN- $\gamma$ -primed macrophages treated with siRNA for GFP (square). Silencing of either IRAK-1 (triangle) or TLR3 (circle) impaired the ability of IFN- $\gamma$ -primed macrophages to kill *L. donovani* (Fig. 7). In contrast, WT promastigotes were killed in IFN- $\gamma$ -primed macrophages treated with siRNA against TLR2 (data not shown).

### 3. Discussion

Whereas *L. donovani* promastigotes enter naive macrophages in a relatively silent way, they elicit the secretion of NO and pro-inflammatory cytokines in IFN- $\gamma$ -primed macrophages [5]. One explanation for this phenomenon is that *L. donovani* promastigotes are not recognized by naive macrophages, and that IFN- $\gamma$  induces the expression of a recognition receptor. Our observation that *L. donovani* promastigotes rapidly stimulated IRAK-1 activity in IFN- $\gamma$ -primed macrophages supported the hypothesis that IFN- $\gamma$  enables macrophages to recognize *L. donovani* promastigotes by inducing the expression of a TLR. TLR3 was the only member of the TLR family whose expression was up-regulated by IFN- $\gamma$  in murine macrophages and its silencing by RNAi in IFN- $\gamma$ -primed macrophages led to a significant reduction of TNF- $\alpha$  and NO secretion in response to *L. donovani* promastigotes. The use of *L. donovani* mutants allowed us to rule out that Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$ -containing glycoconjugates were the parasite molecules recognized by TLR3 in IFN- $\gamma$ -primed macrophages. Since dsRNA is the only known ligand for TLR3 [14, 39], we verified the possibility that our *Leishmania* strains contain one of the previously described *Leishmania* dsRNA viruses [40, 41], but we were unable to detect RNA-dependent RNA polymerase activity using an *in vitro* assay [42] in our strains (data not shown). We also failed to detect in our *Leishmania* strains dsRNA structures which could activate TLR3 (not shown), as recently shown for *Schistosoma* eggs [39]. It is thus possible that structures other than dsRNA present in *L. donovani* promastigotes can be recognized by TLR3. Clearly, additional studies will be required to identify the *Leishmania* promastigote molecule(s) recognized by TLR3 in IFN- $\gamma$ -primed macrophages. Of interest, a recent study revealed that TLR9, which was originally described as a receptor for unmethylated CpG DNA [43], was responsible for the recognition of hemozoin, a metabolite produced by *Plasmodium falciparum* [44].

Recent studies revealed that TLR2 contributes to the recognition of *L. major* and to the subsequent immune response. Becker and colleagues showed that in human NK

cells, *L. major* LPG binds directly to TLR2 and upregulates both mRNA and the membrane expression of TLR2. Moreover, binding of LPG to TLR2 enhances IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B [29]. LPG from *L. major* also stimulates macrophages to secrete IL-12 and TNF- $\alpha$  via a MyD88-dependent pathway and requires TLR2 to activate an NF- $\kappa$ B-driven reporter construct in 293T cells [27]. Our data provide additional support for the role of TLR2 in the recognition of *Leishmania* glycoconjugates. Similar to WT promastigotes, the *lpg1*-KO mutant, which lacks LPG but synthesizes normally the other Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$ -containing molecules [45], induced NO secretion in IFN- $\gamma$ -primed macrophages but not in cells treated with siRNA for TLR2. Moreover, silencing of TLR2 had no effect on either NO or TNF- $\alpha$  secretion induced by the *lpg2*-KO mutant, which is unable to synthesize the repeating Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$  units [46], in IFN- $\gamma$ -primed macrophages (Fig. 4B and 5A). Together, these data suggest that TLR2 recognizes the repeating Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$  units present not only on LPG, but also on the secreted acid phosphatase, the secreted phosphoglycan, and the proteophosphoglycan [47]. In support of this conclusion, Becker and colleagues [29] reported that LPG purified from infectious metacyclic parasites was a more potent activator of NK cells than LPG purified from non-infectious procyclic parasites, most likely due to the doubling in the number of repeating units [29]. However, *L. donovani* promastigotes evade the induction of a pro-inflammatory response in naive macrophages [1, 2, 48], despite the presence of TLR2. This raises the possibility that other molecules are required for the recognition of *L. donovani* promastigotes. Our data suggest that in IFN- $\gamma$ -primed macrophages, TLR2 might act in concert with TLR3 for the recognition of *L. donovani* promastigote and their Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$ -containing molecules, since silencing of TLR3 completely inhibited NO and TNF- $\alpha$  secretion. Conversely, TLR3 might not require TLR2 to recognize yet unidentified *L. donovani* promastigotes molecules, since silencing of TLR2 had no effect on the induction of NO secretion by the *lpg2*-KO mutant in IFN- $\gamma$ -primed macrophages. In addition to IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  and LPS up-regulate TLR3 expression in mouse macrophages [36]. Our data raise the possibility that priming with either IFN- $\beta$

or LPS would enable macrophages to recognize *L. donovani* promastigotes and secrete NO. Such a scenario is supported by the finding that priming of human mononuclear phagocytes with IFN- $\beta$  increased their ability to kill *L. major* promastigotes [49]. However, another group reported that addition of IFN $\alpha/\beta$  2 h prior to *L. major* promastigotes abolished NO production and killing [50]. Additional studies will be necessary to clarify this issue.

Recent evidences indicate that in addition to proinflammatory responses, TLR signaling modulates phagocytosis [22, 23, 25]. Our data showing that silencing of either TLR2 or TLR3 reduced internalization of *L. donovani* promastigotes by IFN- $\gamma$ -primed macrophages thus provides additional support to the role of TLRs in modulating phagocytosis. On the other hand, silencing of TLR2 had no effect on the internalization of the phosphoglycan-deficient *lpg2*-KO mutant. This may be related to the observation that this mutant is not recognized by TLR2. It should be noted that although statistically significant, the contribution of TLR2 and TLR3 to the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes remains minor. This is consistent with the fact that recognition and internalization of *Leishmania* promastigotes involve multiple receptors (such as the mannose receptor, CR1, CR3 and p150,95) [46]. Activation of TLRs also leads to the secretion of NO, which plays an essential role in the control of *Leishmania* infection [51-53]. The inhibition of NO secretion by IFN- $\gamma$ -primed macrophages treated with siRNAs for either TLR3 or IRAK-1 may thus account for the inhibition of *L. donovani* promastigote killing by these cells. Interestingly, it was recently shown *in vivo* that TLR4 controls *L. major* replication via the induction of iNOS [30, 54].

In summary, our results suggest that both TLR2 and TLR3 contribute to the response induced by *L. donovani* promastigotes in IFN- $\gamma$ -primed macrophages. Further studies addressing the fate of *L. donovani* infection in TLR3 knock-out mice will be required to address the importance of this receptor *in vivo*.

## 4. Materials and Methods

**4.1 Parasites.** *L. donovani* promastigotes (Sudanese strain 1S) were grown at 26°C in RPMI 1640 medium (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) supplemented with 20% heat inactivated FBS, 100 µM adenine, 20 mM MES (pH5.5), 5 µM hemin, 3 µM biopterin, 1 µM biotin and antibiotics (*Leishmania* medium). The isogenic LPG-defective mutants *lpg1*-KO and *lpg2*-KO were described previously [5, 55]. Luciferase-expressing promastigotes [56] were grown in *Leishmania* medium supplemented with 50 µg/ml G418 (Life Technologies Inc.). For infections, promastigotes were used in stationary phase of growth at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1.

**4.2 Macrophages.** The murine macrophage cell line RAW 264.7 was grown in Dulbecco Modified Eagle Medium with glutamine (Life Technologies Inc.) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Hyclone, Logan, UT), 10 mM HEPES (pH 7.4) and antibiotics (complete medium), in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub>. BMM were obtained from female Balb/c mice as previously described [5] and cultured in complete medium. When indicated, IFN-γ (R&D Systems, Minneapolis, MN) was used for the activation of macrophages at a concentration of 100 U/ml (for RAW 264.7) 18 h prior to infection with *L. donovani* promastigotes.

**4.3 RT-PCR.** Total RNA was extracted using RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Crawley, TX), treated with DNaseI (BD biosciences Clontech, Mississauga, ON), and reverse transcribed with AMV reverse transcriptase (USB Corporation, Cleveland, OH) as described [57]. cDNA was used for PCR using various primers for the different TLRs. TLR1F: 5'-TCTTGTGCCACCCAACAGTCAG-3' (AD-183), TLR1R: 5'-CCCATAAGCATCTCCTAACACCAG-3' (AD-184), TLR2F: 5'-ATYGAYTCCATYGAAAAGAGCCACAA-3', TLR2R: 5'-CTTTATYGCAGYTCTCAGATTTACCCA-3', TLR3F: 5'-TCATTCACATCGAGGGCTGGAG-3' (AD-155), TLR3R: 5'-CGCAAACAGAGTGCATGGTTTAG-3' (AD-156); TLR4F: 5'-

GGAAGCTTGAATCCCTGCATAG-3',		TLR4R:	5'-
AATCCAGCCACTGAAGTTCTGAA-3';		TLR5F:	5'-
ATCGCCTTTCGTCATGCAAGGCAG-3',		TLR5R:	5'-
AAATATCCCAGGTGGAAGGAAATT-3';		TLR6F:	5'-
AAGGCGGGGAAACAGAAAGTC-3'	(AD-185),	TLR6R:	5'-
TGCTGGAGGGTCACATTCAATAAG-3'	(AD-186);	TLR7F:	5'-
CAGAAGTCTAAGTTTCTTCAGC-3',		TLR7R:	5'-
GGGAAATATTTAACTGAGCATGG-3';		TLR8F:	5'-
GTGCTTTTGTCTGCTGTCCTCTG-3'	(AD-187),	TLR8R:	5'-
TTTGGGTGCTGTTGTTTGGC-3'	(AD-188);	TLR9F:	5'-
TGGAGGACCGAGATTGGCTGC-3',		TLR9R:	5'-
TGAGCTATTCTGCTGTAGGTCC-3';		HPRTF:	5'-
GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3'	(AD-55),	HPRTR:	5'-

GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3' (AD-56). PCR products were migrated on 1.5% (w/v) agarose gel and the pictures were taken with a AlphaImager 3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

**4.4 Determination of nitrite and quantitation of TNF- $\alpha$ .** Nitrite levels in cell supernatants were determined with the Griess reagent as described [6]. The amounts of TNF- $\alpha$  in cell supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assays, as described [58].

**4.5 *In vitro* kinase assays.** *In vitro* kinase assays were performed essentially as described elsewhere [59]. The gels were exposed to a phosphor screen which was scanned on a PhosphoImager (Molecular Dynamics) and levels were subsequently corrected to uninfected cells.

**4.6 RNA interference.** For the silencing of either IRAK-1, MyD88, TLR2 or TLR3 by RNA interference, we selected siRNA using the guidelines described by Tuschl and colleagues (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>). Briefly, adherent



RAW 264.7 macrophages ( $10^5$  cells per 24 wells plates) were transfected with specific siRNA duplexes (GFP: AAGAACGGCAUCAAGGUGAACdTdT; IRAK-1: AAAGAGCCCAUCCCUCCTCCGUdTdT; MyD88: AAGGAGAUGGGCUUCGAGUACdTdT; TLR2: AAGCAGGCGACAACCACUUUGdTdT; TLR3: AAGGAUGUUUUCGGGCCGCCUdTdT) (Dharmacon, Lafayette, CO) at a final concentration of 240 nM using OligoFectamine (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) in serum-free DMEM for 4 h. siRNA and OligoFectamine were in contact for 20 min in 50  $\mu$ l of Opti-MEM medium (Life Technologies Inc.) and used for transfecting adherent macrophages in 200  $\mu$ l of serum-free DMEM. After 4 h at 37°C, 125  $\mu$ l of fresh DMEM supplemented with 30% FBS was added for 3 h and IFN- $\gamma$  was then added at 100 U/ml for 18 h prior to the infection. The siRNA specific for GFP was used as a negative control. A BLAST search against the mouse genome sequence database was performed to ensure that the chosen siRNA sequences targeted only the mRNAs of interest.

**4.7 Immunofluorescence and confocal microscopy.** To assess the efficiency of the silencing, cells were stained for either IRAK-1, MyD88, TLR2 or TLR3. Briefly, cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma), permeabilized with 0.1% Triton X-100, and blocked with 1% BSA and 20% normal goat serum for IRAK-1 and MyD88 or 20% normal rabbit serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) for TLR2 and TLR3. Cells were then marked with a first antibody specific for either IRAK-1 (Upstate), MyD88 (HFL-296), TLR2 (S-16) or TLR3 (N-15) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and stained with a secondary antibody coupled to Alexa-568 (Molecular Probes, Eugene, OR), coverslips were then mounted on slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology associates Inc., Birmingham, AL). They were then visualised on a Nikon Eclipse TE2000-U microscope (Nikon, Melville, NY) and pictures were taken using a Sensys camera (Photometrics, Tucson, AZ). For the phagocytosis assay, *Leishmania* promastigotes were phagocytosed for 2 h. Coverslips were then permeabilized with Triton X-100 0.1% and stained using Draq5 (Biostatus

Limited, Shepshed, UK) and phalloidin coupled to Alexa-488 (Molecular Probes) and mounted using Fluoromount-G. The number of internalized promastigotes per 100 cells were calculated with a Nikon Eclipse E800 equipped with a BioRad Radiance 2000 confocal microscope. Data were analyzed with LaserSharp 2000.

**4.8 Measurement of luciferase activity.** Promastigotes stably expressing the luciferase gene were used to infect macrophages for 1 h, cells were then washed 4 times with serum-free medium and the absence of nonphagocytosed promastigote was ensured by microscopic visualization and then cells were incubated with fresh complete medium. Luciferase activity was measured using the Dual-luciferase reporter assay system as described (Promega, Madison, WI). Briefly, at 1 h, 12 h, 24 h and 36 h post-infection, cells were lysed with 100  $\mu$ l of 1X Cell Lysis Buffer, then 20  $\mu$ l of cell extract was mixed with 50  $\mu$ l of LARII buffer and the luciferase was quantified using a Lumat LB 9507 luminometer (EG&G Berthold, Nashua, NH).

**4.9 Reagents.** Lipopolysaccharide of *Escherichia coli* Serotype O127:B8 was purchased at Sigma and used at a final concentration of 100 ng/ml. Poly(I):Poly(C) was purchased from Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ) and used at a final concentration of 20  $\mu$ g/ml. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* was purchased from BioChemika (Buchs, Switzerland) and used at a final concentration of 10  $\mu$ g/ml.

**4.10 Statistical analysis.** Statistical analyses were performed by unpaired Student's *t* test using Microsoft Excel. Data of siRNA for IRAK-1, MyD88, TLR3 or TLR2 were compared to siRNA for GFP and a  $p \leq 0.05$  was considered to be significant.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Jean Patterson (Southwest Foundation for Biomedical Research) for providing a protocol to detect RNA-dependent RNA polymerase activity, Dr. Danielle Malo (McGill University) for the PCR primer pairs specific to TLR2, TLR5, TLR7 and TLR9, Dr. François Shareck (INRS- Institut Armand-Frappier) for the synthesis of siRNA for GFP, Marcel Desrosiers and Dr. Robert Lodge for their help with immunofluorescence.

## REFERENCES

- 1 **Alexander, J., Satoskar, A. R. and Russell, D. G.,** Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 1999. **112 Pt 18:** 2993-3002.
- 2 **Reiner, S. L., Zheng, S., Wang, Z. E., Stowring, L. and Locksley, R. M.,** Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 1994. **179:** 447-456.
- 3 **Reiner, N. E.,** Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*. *J Immunol* 1987. **138:** 1919-1925.
- 4 **Bersudsky, M., Apte, R. N. and El-On, J.,** Interleukin 1alpha activity of peritoneal and bone marrow macrophages infected with *Leishmania major* and *Leishmania donovani* in vitro. *Exp Parasitol* 2000. **94:** 150-157.
- 5 **Prive, C. and Descoteaux, A.,** *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* 2000. **30:** 2235-2244.
- 6 **Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs, J. B., Jr. and Nacy, C. A.,** Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990. **144:** 278-283.
- 7 **Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. and Moncada, S.,** Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990. **144:** 4794-4797.
- 8 **Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr.,** Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000. **173:** 89-97.
- 9 **Medzhitov, R.,** Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001. **1:** 135-145.
- 10 **Underhill, D. M. and Ozinsky, A.,** Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002. **20:** 825-852.

- 11 **Netea, M. G., van der Graaf, C., Van der Meer, J. W. and Kullberg, B. J.,** Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* 2004. **75:** 749-755.
- 12 **Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B.,** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998. **282:** 2085-2088.
- 13 **Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P. and Malo, D.,** Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999. **189:** 615-625.
- 14 **Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A.,** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001. **413:** 732-738.
- 15 **Yamamoto, M., Takeda, K. and Akira, S.,** TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 2004. **40:** 861-868.
- 16 **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. and Janeway, C. A., Jr.,** MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998. **2:** 253-258.
- 17 **Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z.,** MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997. **7:** 837-847.
- 18 **Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J. M., Wesche, H., Ohashi, P. S., Mak, T. W. and Yeh, W. C.,** Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002. **416:** 750-756.
- 19 **Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M. and Golenbock, D. T.,** LPS-TLR4 signaling

- to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003. **198**: 1043-1055.
- 20 **Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S.,** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003. **301**: 640-643.
- 21 **Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Weiss, D. S., Godowski, P. and Zychlinsky, A.,** The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J* 2000. **19**: 3325-3336.
- 22 **Blander, J. M. and Medzhitov, R.,** Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 2004. **304**: 1014-1018.
- 23 **Doyle, S. E., O'Connell, R. M., Miranda, G. A., Vaidya, S. A., Chow, E. K., Liu, P. T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R. L., Yeh, W. C., Lane, T. F. and Cheng, G.,** Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* 2004. **199**: 81-90.
- 24 **Ruckdeschel, K., Mannel, O. and Schrottner, P.,** Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members. *J Immunol* 2002. **168**: 4601-4611.
- 25 **Underhill, D. M. and Gantner, B.,** Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect* 2004. **6**: 1368-1373.
- 26 **Hawn, T. R., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Buckner, F. S., Akira, S. and Aderem, A.,** Leishmania major activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes Infect* 2002. **4**: 763-771.
- 27 **de Veer, M. J., Curtis, J. M., Baldwin, T. M., DiDonato, J. A., Sexton, A., McConville, M. J., Handman, E. and Schofield, L.,** MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 2003. **33**: 2822-2831.
- 28 **Turco, S. J. and Descoteaux, A.,** The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol* 1992. **46**: 65-94.

- 29 **Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A. P., Cabrera, N., Gonzalez, A., Maldonado, C. and Isibasi, A.,** Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003. **130:** 65-74.
- 30 **Kropf, P., Freudenberg, M. A., Modolell, M., Price, H. P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D. F. and Muller, I.,** Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 2004. **72:** 1920-1928.
- 31 **Underhill, D. M.,** Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 2003. **33:** 1767-1775.
- 32 **Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. and Mantovani, A.,** Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000. **164:** 5998-6004.
- 33 **Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I. and Matikainen, S.,** IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun* 2001. **2:** 349-355.
- 34 **Applequist, S. E., Wallin, R. P. and Ljunggren, H. G.,** Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 2002. **14:** 1065-1074.
- 35 **Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K. and Segal, D. M.,** Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001. **166:** 249-255.
- 36 **Heinz, S., Haehnel, V., Karaghiosoff, M., Schwarzfischer, L., Muller, M., Krause, S. W. and Rehli, M.,** Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem* 2003. **278:** 21502-21509.

- 37 **Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. and Tuschl, T.**, Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002. **26**: 199-213.
- 38 **Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D. and Aderem, A.**, Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96**: 14459-14463.
- 39 **Aksoy, E., Zouain, C. S., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M., Capron, M., Ryffel, B. and Trottein, F.**, Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J Biol Chem* 2005. **280**: 277-283.
- 40 **Scheffter, S. M., Ro, Y. T., Chung, I. K. and Patterson, J. L.**, The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology* 1995. **212**: 84-90.
- 41 **Widmer, G., Comeau, A. M., Furlong, D. B., Wirth, D. F. and Patterson, J. L.**, Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989. **86**: 5979-5982.
- 42 **Widmer, G., Keenan, M. C. and Patterson, J. L.**, RNA polymerase activity is associated with viral particles isolated from *Leishmania braziliensis* subsp. *guyanensis*. *J Virol* 1990. **64**: 3712-3715.
- 43 **Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S.**, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000. **408**: 740-745.
- 44 **Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T. and Akira, S.**, Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005. **201**: 19-25.
- 45 **Ryan, K. A., Garraway, L. A., Descoteaux, A., Turco, S. J. and Beverley, S. M.**, Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol



- synthesis by functional complementation of Leishmania. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 8609-8613.
- 46 **Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S. J. and Beverley, S. M.**, A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of Leishmania. *Science* 1995. **269**: 1869-1872.
- 47 **Descoteaux, A. and Turco, S. J.**, Glycoconjugates in Leishmania infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1999. **1455**: 341-352.
- 48 **Descoteaux, A., Turco, S. J., Sacks, D. L. and Matlashewski, G.**, Leishmania donovani lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol* 1991. **146**: 2747-2753.
- 49 **Passwell, J. H., Shor, R. and Shoham, J.**, The enhancing effect of interferon-beta and -gamma on the killing of Leishmania tropica major in human mononuclear phagocytes in vitro. *J Immunol* 1986. **136**: 3062-3066.
- 50 **Mattner, J., Schindler, H., Diefenbach, A., Rollinghoff, M., Gresser, I. and Bogdan, C.**, Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with Leishmania major. *Eur J Immunol* 2000. **30**: 2257-2267.
- 51 **Proudfoot, L., Nikolaev, A. V., Feng, G. J., Wei, W. Q., Ferguson, M. A., Brimacombe, J. S. and Liew, F. Y.**, Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 10984-10989.
- 52 **Chakour, R., Guler, R., Bugnon, M., Allenbach, C., Garcia, I., Mauel, J., Louis, J. and Tacchini-Cottier, F.**, Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with Leishmania major whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. *Infect Immun* 2003. **71**: 5287-5295.
- 53 **Ismail, N., Olano, J. P., Feng, H. M. and Walker, D. H.**, Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 2002. **207**: 111-120.

- 54 **Kropf, P., Freudenberg, N., Kalis, C., Modolell, M., Herath, S., Galanos, C., Freudenberg, M. and Muller, I.,** Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNcr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J Leukoc Biol* 2004. **76:** 48-57.
- 55 **Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J. F., Meresse, S., Descoteaux, A. and Desjardins, M.,** Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* 1999. **1:** 19-32.
- 56 **St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F. and Descoteaux, A.,** Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J Immunol* 1999. **163:** 5505-5511.
- 57 **Giroux, M., Schmidt, M. and Descoteaux, A.,** IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha. *J Immunol* 2003. **171:** 4187-4194.
- 58 **St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y. and Descoteaux, A.,** Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 1998. **273:** 32787-32792.
- 59 **Swantek, J. L., Tsen, M. F., Cobb, M. H. and Thomas, J. A.,** IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 2000. **164:** 4301-4306.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** IRAK-1 is activated during an infection by *L. donovani* promastigotes in IFN- $\gamma$ -primed macrophages. Adherent BMM (A and C) or RAW 264.7 macrophages (B and D) were either IFN- $\gamma$ -primed (100 U/ml) (C and D) or not (A and B) and incubated in the presence of WT promastigotes for the indicated time points. IRAK-1 was immuno-precipitated and incubated with  $^{32}$ P-ATP and MBP, and phosphorylation of MBP was measured as described under Materials and Methods. Similar results were obtained in three separate experiments. N, naive macrophages.

**Figure 2.** TLR3 is upregulated in IFN- $\gamma$ -primed macrophages. **A.** BMM were untreated or primed with IFN- $\gamma$  (100 U/ml) for 18 h. Total RNA was extracted, DNaseI-treated, reverse transcribed, and used as a template for PCR for different TLRs. The resulting PCR fragments were migrated on an agarose gel. M, molecular weight marker pUC18/HaeIII **B.** RAW 264.7 macrophages grown on coverslips were untreated or incubated with IFN- $\gamma$  (100 U/ml) or peptidoglycan (10  $\mu$ g/ml) for 18 h. Cells were fixed, stained with or without an antibody against TLR3 and a secondary antibody coupled to Alexa-568, mounted on a glass coverslip, and visualised under a microscope. Data are representative of three separate experiments.

**Figure 3.** RNAi inhibits the expression of IRAK-1, MyD88, TLR2 and TLR3. Adherent RAW 264.7 macrophages were transfected with siRNA against GFP (siRNA GFP column) or siRNA specific for IRAK-1 (A), MyD88 (B), TLR3 (C) and TLR2 (D) respectively (siRNA specific column). Cells were then IFN- $\gamma$ -primed (100 U/ml) for 18 h and stained using specific antibody and a secondary antibody coupled to Alexa-568 to assess the efficiency of the silencing.

**Figure 4.** The silencing of IRAK-1, MyD88, TLR2 and TLR3 impairs NO secretion by IFN- $\gamma$ -primed macrophages exposed to *L. donovani* promastigotes. **A.** Adherent RAW 264.7 macrophages ( $1.5 \times 10^5$ /well) were left untreated or IFN- $\gamma$ -primed (100 U/ml) for

18 h and then incubated with WT promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1 for 18 h. Supernatants were collected and nitrite levels were measured using Griess reagents. **B** and **C**. Adherent RAW 264.7 macrophages ( $1.5 \times 10^5$ /well) were transfected with siRNA for GFP, IRAK-1, MyD88, TLR2 or TLR3, primed with IFN- $\gamma$  (100 U/ml) for 18 h and incubated with either WT, *lpg1*-KO or *lpg2*-KO promastigotes (parasite-to-macrophage ratio of 10:1), LPS (100 ng/ml), poly(I):poly(C) (20  $\mu$ g/ml) or PGN (10  $\mu$ g/ml) for 18 h. Supernatants were collected and nitrite levels were measured using Griess reagents. Basal levels of unstimulated cells were subtracted. Experiment was performed in triplicate and similar results were obtained in at least three separate experiments. \*  $\rho \leq 0.01$ , \*\*  $\rho \leq 0.05$  vs RNAi GFP.

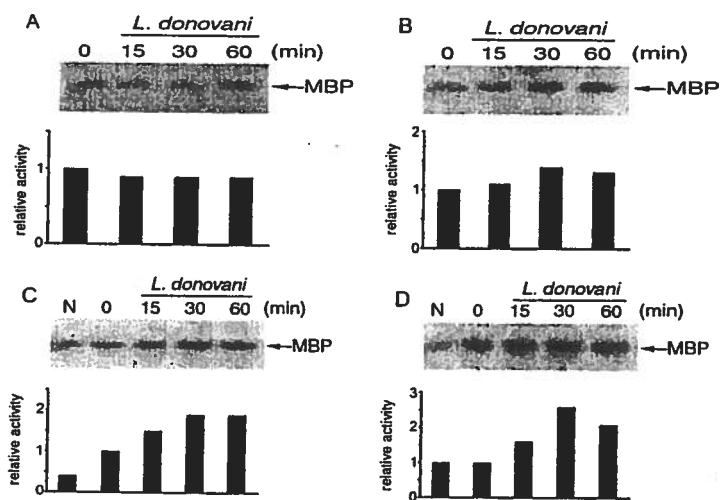
**Figure 5.** The silencing of IRAK-1, MyD88, TLR2 and TLR3 impairs TNF- $\alpha$  secretion by IFN- $\gamma$ -primed macrophages exposed to *L. donovani* promastigotes. Adherent RAW 264.7 macrophages ( $1.5 \times 10^5$ /well) were transfected with siRNA for GFP, IRAK-1, MyD88, TLR2 or TLR3, primed with 100 U/ml IFN- $\gamma$  for 18 h, and incubated with either WT or *lpg2*-KO promastigotes (parasite-to-macrophage ratio of 10:1), LPS (100 ng/ml), poly(I):poly(C) (20  $\mu$ g/ml) or PGN (10  $\mu$ g/ml) for 18 h. Supernatants were collected and the concentration of TNF- $\alpha$  secreted was determined by ELISA. Basal levels of unstimulated cells were subtracted. Experiments were performed in triplicate and similar results were obtained in at least three separate experiments. \*  $\rho \leq 0.01$ , \*\*  $\rho \leq 0.05$  vs RNAi GFP.

**Figure 6.** TLR2 and TLR3 participate in the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. RAW 264.7 macrophages ( $1.5 \times 10^5$ /well) were adhered to glass coverslips, transfected with siRNA for GFP, TLR2 or TLR3, primed with 100 U/ml IFN- $\gamma$  for 18 h and infected with either WT or *lpg2*-KO promastigotes (parasite-to-macrophage ratio of 10:1) for 2 h. Cells were fixed, permeabilized and stained by Draq5 and phalloidin coupled to Alexa-488. Coverslips were visualized by confocal microscopy and results are expressed as the number of *Leishmania* internalized per 100

cells. Experiments were done in triplicate and the results are representative of three separate experiments. \*  $\rho \leq 0.05$  vs RNAi GFP.

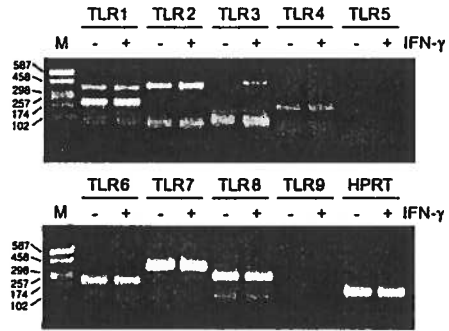
**Figure 7.** TLR3 plays a role in the leishmanicidal activity of IFN- $\gamma$ -primed macrophages. Adherent RAW 264.7 macrophages ( $1.5 \times 10^5$ /well) were either untransfected or transfected with siRNA for GFP (square), IRAK-1 (triangle) or TLR3 (circle), primed with 100 U/ml IFN- $\gamma$  for 18 h, or not (diamond) and infected with luciferase-expressing WT promastigotes (parasite-to-macrophage ratio of 10:1) for 1 h. Macrophages were then thoroughly washed to eliminate excess parasites and incubated for the indicated time points. They were then harvested and luciferase activity was measured. Survival rate is calculated by dividing the luciferase activity at the indicated time-point by the luciferase activity at 1h. Experiments were done in triplicate and the results are representative of three separate experiments. \*  $\rho \leq 0.01$ , \*\*  $\rho \leq 0.05$  vs RNAi GFP.

FLANDIN-Fig. 1

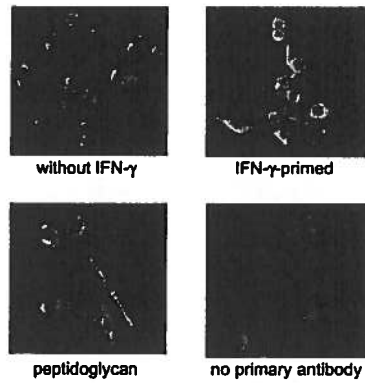


FLANDIN-FIG 2

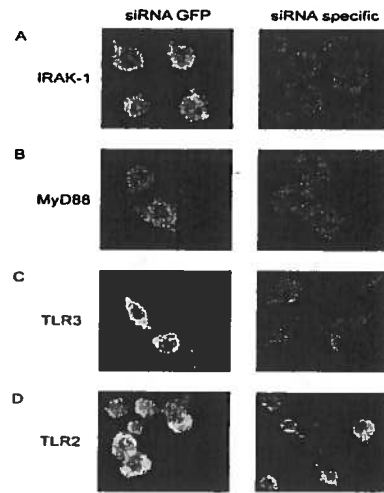
A



B

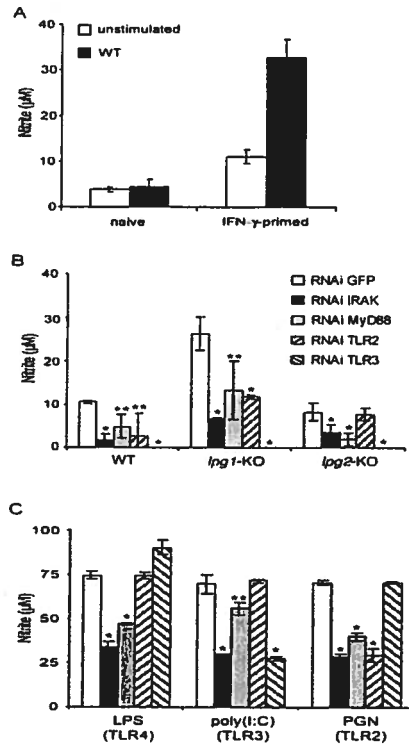


FLANDIN-Fig. 3

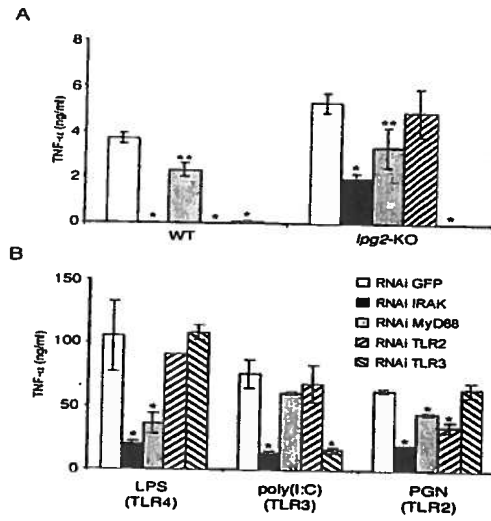




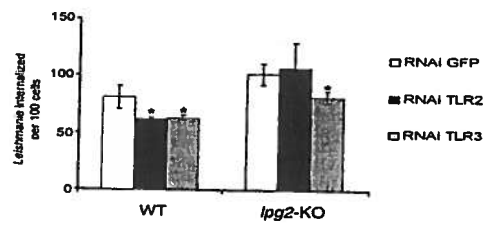
FLANDIN-Fig. 4



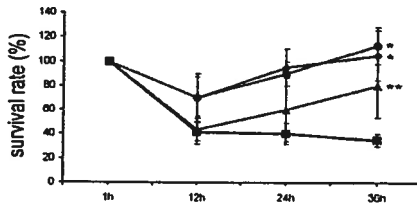
FLANDIN-FIG 5



FLANDIN-Fig. 6



FLANDIN-Fig. 7



## **DEUXIÈME PUBLICATION**

## Résumé de la deuxième publication

Flandin, J.-F., Richer, E., Malo, D. & Descoteaux, A. (2007) TLR3 is induced after the internalisation of particles in order to sense the identity of the pathogen. *J Immunol*, en préparation

En réponse à un microorganisme pathogène, les macrophages entreprennent un remodelage important de leur transcriptome afin de déclencher une réponse immunitaire adéquate envers l'intrus. Étant donné que les gènes régulés positivement suite à une stimulation par un microorganisme fournissent un bon indice sur les outils nécessaires à combattre efficacement l'infection, nous avons étudié l'effet des promastigotes de *L. donovani* sur l'expression des différents TLR dans les macrophages au repos. Par RT-PCR et immunofluorescence, nous avons démontré l'induction de l'ARNm et du récepteur TLR3 suite à une stimulation par les leishmanies WT mais pas pour les promastigotes *lpg2*-KO. Grâce à des expériences de PCR quantitatif, nous avons de plus démontré l'absence de régulation des ARNm de TLR2 et TLR4 en réponse aux promastigotes de *L. donovani*. En utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques, nous montrons que l'induction de TLR3 survient suite à l'internalisation des promastigotes par un mécanisme p38 MAPk-indépendant. Nous montrons que cette induction est un mécanisme généralisé découlant de l'activation de certains récepteurs phagocytiques. En effet, la stimulation de macrophages naïfs par différentes particules telles que le zymosan, les billes de latex ou les promastigotes de *L. donovani* opsonisés au complément cause l'induction de l'ARNm de TLR3. Par microscopie confocale, nous observons que TLR3 est présent à la membrane des phagosomes contenant les particules internalisées. Ainsi, ce récepteur pourrait servir de sentinelle afin d'identifier la nature de la particule internalisée et, ultimement, déclencher la réponse immunitaire appropriée envers celle-ci.

### Contribution des auteurs

Jean-Frédéric Flandin : Tous les travaux, rédaction du manuscrit

Étienne Richer : Réalisation des Q-PCR et aide dans l'interprétation des données

Danielle Malo : Directrice de E. Richer

Albert Descoteaux : Directeur de J-F Flandin, révision et édition du manuscrit

**TLR3 is induced after the internalisation of particles in  
order to sense the identity of the pathogen**

Jean-Frédéric Flandin\*, Étienne Richer<sup>§</sup>, Danielle Malo<sup>§</sup> and Albert Descoteaux\*<sup>¶</sup>

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

<sup>§</sup>Department of Human Genetics, McGill University Health Center, Montréal, Qc,  
H3G 1A4, Canada

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



## ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) are the long sought receptors that confer specificity to the innate immune system. As such, they represent the first line of defense against a wide variety of invading pathogens. Typically, cell surface expression of TLRs is quite low, suggesting that their expression can be modulated by various stimuli. Lately, our group and others have shown the roles of TLR2, TLR3 and TLR4 in the recognition of the protozoan parasite *Leishmania* and the subsequent appropriate immune response. In this study, we sought to identify the genes necessary to control an infection by studying the modulation of TLR expression after *L. donovani* promastigote stimulation. Here, we show by quantitative PCR and immunofluorescence that *L. donovani* promastigotes induce the expression of TLR3 in naive mouse macrophages. Using pharmacological inhibitors, we show this induction is p38 MAPk-independent and occurs after the phagocytosis of the whole parasite. Furthermore, TLR3 expression is also induced by others phagocytic signals such as zymosan and latex beads. Finally, we show by confocal microscopy that induced TLR3 is localised at the surface of promastigote-containing phagosomes. Collectively, our results identify TLR3 as a sensor of phagocytosed particles and thus is an important player in the response of macrophages toward *L. donovani* promastigotes.

## INTRODUCTION

The innate immune system represents the first line of defense against a variety of pathogens. For a long time considered as non-specific, the discovery of the Toll-like receptors (TLR) almost 10 years ago (1, 2) prove the innate immunity is more complex than we thought. The TLRs are germline encoded type I glycoproteins characterized by an extracellular domain containing varying numbers of leucine-rich repeats (LRR) motifs and a characteristic Toll-Interleukin receptor (TIR) intracellular domain. Via the recognition of a pathogen-associated molecular pattern (PAMP), they are able to sense the identity of a pathogen and bridge innate and adaptive immunity (3). Following the engagement of a TLR by a PAMP, different adaptor proteins are recruited to the TIR domain of TLR and, depending on the adaptor protein recruited, results in a specific immune response (4-7). Each TLR signaling has an overlapping but distinct function, which largely depends on intracellular adaptor molecules (4).

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* cause a variety of diseases termed leishmaniases. Depending on the species inoculated, the clinical manifestations vary from self-healing skin ulcerative lesions (cutaneous leishmaniasis caused principally by *L. major*) to life-threatening visceral leishmaniasis (Kala-Azar) caused by the infection of the liver, spleen and bone marrow macrophages by *L. donovani* or *L. infantum*. Infectious promastigotes are inoculated inside mammals during the bloodmeal of an infected female sandfly (genus *Phlebotomus* or *Lutzomyia*). There, the promastigotes resist the attack by complement and are rapidly phagocytosed by mononuclear phagocytes. Inside these cells, promastigotes differentiate into amastigotes, the form that resides and proliferates in the acidic and hydrolase-rich phagolysosomes.

*L. donovani* promastigote entry into naive macrophages occurs in the absence of a proinflammatory response and nitric oxide secretion, thereby allowing the successful establishment of an infection (8-12). However, in IFN- $\gamma$ -primed macrophages, *L. donovani* promastigotes induce the activation of p38 MAPk and ERK1/2 pathways and

the secretion of TNF- $\alpha$  and NO (10, 13). In order to explain this difference in the immune response, we previously showed the presence of TLR3 in IFN- $\gamma$ -primed but not in naive macrophages. Using RNA interference, we also demonstrated that TLR3, via the recognition of an unidentified molecule of the promastigote, was responsible for the secretion of NO and TNF- $\alpha$  by stimulated IFN- $\gamma$ -primed macrophages, resulting in successful killing of these promastigotes. In addition to TLR3, the secretion of NO and TNF- $\alpha$  by IFN- $\gamma$ -primed macrophages is also dependent of the recognition of Gal $\beta$ 1,4Man $\alpha$ -PO $_4$ -containing phosphoglycans by TLR2 (13).

Immune cells respond to a broad range of stimuli through a common transcriptional activation programme but also regulate gene expression in a pathogen-specific manner, which might tailor the immune response to the pathogen (14, 15). Even though the preponderant roles of TLR2, TLR3 and TLR4 in the immune response of macrophages towards *Leishmania* promastigotes, the regulation of TLR expression by *L. donovani* promastigotes is still unknown (13, 16-18). In this paper, we sought to study the modulation of Toll-like receptor expression by promastigotes of *Leishmania donovani*. Using quantitative PCR and immunofluorescence, we show that WT *L. donovani* promastigotes induce TLR3 expression in naive macrophages. Furthermore, using pharmacological inhibitors, we show that induction occurs following the phagocytosis of the promastigote by a p38 MAPk-independent process. Furthermore, using various phagocytic signals, we show that the upregulation of TLR3 expression occurs following the phagocytosis of any particle, as evidenced by the fact that neither *L. donovani* total DNA, total RNA nor total proteins induce the expression of TLR3 mRNA. We also show that induced TLR3 is present at the membrane of the promastigote-containing phagosomes. Collectively, our results suggest that TLR3 is a sensor of phagocytosed particles and, thus is an important player in the response of macrophages toward *L. donovani* promastigotes.

## MATERIALS AND METHODS

*Parasites.* *Leishmania donovani* promastigotes (Sudanese strain 1S) were grown at 26°C in RPMI 1640 medium (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) supplemented with 20% heat inactivated FBS (Hyclone, Logan, UT), 100 µM adenine, 20 mM MES (pH5.5), 5 µM hemin, 3 µM bipterine, 1 µM biotin and antibiotics (*Leishmania* medium). The isogenic LPG-defective mutants *lpg1*-KO and *lpg2*-KO were described previously (10, 45). Promastigotes expressing GFP were grown in medium supplemented with 50 µg/ml G418 (Life Technologies Inc.), as previously described (45-47). Infections with WT, *lpg1*-KO and *lpg2*-KO promastigotes in late stationary phase of growth were used at a parasite-to-macrophage ratio of 10 :1. *Leishmania* DNA was obtained by lysing promastigotes with TELT buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 62,5 mM EDTA pH9.0, 2,5 M LiCl, 4% (v/v) Triton X-100), phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation (48). *Leishmania* RNA was obtained by RNazol B (Tel-Test Inc., Friendswood, TX) extraction as suggested by manufacturer's instruction. *Leishmania* proteins were obtained by lysing stationary phase promastigotes with lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, complete protease inhibitors cocktail (Boehringer Mannheim)).

*Macrophages.* The murine macrophage cell line RAW 264.7 and bone-marrow derived macrophages (BMM) were grown in Dulbecco Modified Eagle Medium with L-glutamine (Life Technologies Inc.) supplemented with 10% heat inactivated FBS, 10 mM Hepes (pH7.4) and antibiotics (complete medium) in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub>. BMM were obtained from female BALB/c mice (Charles River, St-Constant, QC, Canada) as previously described (10). When indicated, IFN-γ (R&D Systems, Minneapolis, MN) was used for the activation of macrophages at a concentration of 100 U/ml 18 h prior to infection with *L. donovani* promastigotes. Complement opsonisation was carried out by incubating *Leishmania* promastigotes or zymosan A with the serum of C5-deficient mice (DBA/2) for 30 minutes prior to phagocytosis (49).

*RT-PCR reactions.* Total RNA was extracted using RNazol B (Tel-Test Inc.) and reverse transcribed with AMV reverse transcriptase (Roche) according to manufacturer's instructions. cDNA was used for PCR using the following forward (F) and reverse (R) primers : MyD88F : 5'-GTCTGCGGGAGACCCCCGCGTG-3' (AD-272) and MyD88R : 5'-CACGGTTCGGACACACAACACT-3' (AD-273); IRAKF : 5'-TGACCTCGTTCACATCCTCACG-3' (AD-270) and IRAKR : 5'-GCCTCATCTTCAATCAGGTCTT-3' (AD-271); TRIFF : 5'-CGGAAGATGATTTCTACTGCC-3' (AD-343) and TRIFR : 5'-GTTTCACTCCTATTACTGCTCC-3' (AD-344); MonarchF : 5'-AACTGCGGACTCACCTCCAAAG-3' (AD-349) and MonarchR : 5'-CGGCTTCATTCTGGTTCTCCTTAG-3' (AD-350). Primers for TLR1 to TLR9 and HPRT were described previously (13). PCR products were separated on 1.5% (w/v) agarose gels and the pictures were taken with an AlphaImager 3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

*Quantitative PCR.* Quantitative PCR was performed with Brilliant SYBR green QPCR master mix (Stratagene, LaJolla, CA) according to manufacturer's instruction. The relative expression of TLR3 was normalised to the amount of housekeeping genes TBP and HPRT and compared to a calibrator by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (50). Data were performed in triplicate and analysed with REST MCS software (Corbett Life Science, San Francisco, CA) (51, 52).

*Immunofluorescence and confocal microscopy.* Cells grown on coverslips were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma, St-Louis, MO), permeabilized with 0,1% Triton X-100 and blocked with 1% BSA and 20% normal rabbit serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA). Cells were marked with a primary antibody for TLR3 (N-15) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and stained with a secondary antibody coupled to Alexa-568 (Molecular Probes, Eugene, OR). Coverslips were then mounted on slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL). The slides were visualized on a

Nikon Eclipse TE2000-U microscope (Nikon, Melville, NY) and pictures were taken using a Sensys camera (Photometrics, Tucson, AZ).

For confocal microscopy experiments, cells were visualized on a Nikon Eclipse E800 equipped with a BioRad Radiance 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Data were analyzed with LaserSharp 2000 software (Bio-Rad Laboratories).

*Reagents.* Lipopolysaccharide of *Escherichia coli* Serotype O127:B8 was purchased from Sigma and used at a final concentration of 100 ng/ml. Poly(I):Poly(C) was purchased from Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ) and used at a final concentration of 20 µg/mL. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* was purchased from BioChemika (Buchs, Switzerland) and used at a final concentration of 10 µg/mL. Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* was purchased from Sigma and used at a final concentration of 500 ng/ml. Zymosan A coupled to Alexa-488 was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR) and used at a zymosan-to-macrophage ratio of 5 :1. Dyed red latex beads of 3 µm diameter were purchased from Polysciences, Inc. (Warrington, PA) and used at a bead-to-macrophage ratio of 5:1. Ly294002 was purchased from Sigma and used at a final concentration of 100 µM. Cytochalasin B was purchased from Sigma and used at a final concentration of 20 µM. SB203580 was purchased from Calbiochem (San Diego, CA) and used at a final concentration of 5 µM.

## RESULTS

### *TLR3 mRNA is induced by L. donovani promastigotes*

Toll-like receptor expression is modulated by various stimuli and cytokines (14). In order to verify the role of *L. donovani* promastigotes in the modulation of TLR expression, we verified by RT-PCR the level of mRNA of TLR1 to TLR9 in naive BMM either stimulated or not by WT *L. donovani* promastigotes. As shown in figure 1, *L. donovani* promastigotes do not modulate the expression of the majority of the TLRs, the only noticeable exception being TLR3, that is not expressed in naive unstimulated macrophages (13), but is induced following *L. donovani* promastigote stimulation. Following the engagement of a TLR, adaptor proteins are rapidly recruited to the TIR domain to transduce the signal to IRAK-1, the central kinase of the signaling cascade (5, 7, 19, 20). The two most important adaptor proteins are MyD88 and TRIF; since both can be modulated by various stimuli, we also verified if *L. donovani* caused a difference in their expression (20, 21). As shown in figure 1, WT promastigotes have no effect on the expression of either IRAK-1, MyD88 or TRIF. Recently, Williams *et al.* (22) showed that Monarch-1 is an important negative regulator of TLR signaling pathways and its expression is reduced after an infection with *Mycobacterium tuberculosis* (22). As shown in figure 1, *L. donovani* promastigotes do not modify Monarch-1 mRNA expression. An amplification of the housekeeping gene HPRT was used as a control.

### *TLR3 mRNA is not induced by Gal $\beta$ 1,4Man-PO<sub>4</sub>-deficient promastigotes*

We previously reported that TLR3 plays a role in the secretion of NO and TNF- $\alpha$  following an infection of IFN- $\gamma$ -primed macrophages by *L. donovani* promastigotes WT or *lpg* mutants (13). By quantitative PCR, we verified the effect of these LPG-deficient promastigotes on the induction of TLR3 mRNA in naive macrophages. In figure 2A, the expression ratio of TLR3 mRNA in stimulated versus unstimulated cells is measured and the results are normalized against the housekeeping gene HPRT. An infection by either WT or *lpg1*-KO *L. donovani* promastigotes significantly up-regulates

the expression of TLR3 (respectively 3,7- and 3,0-expression ratio over unstimulated macrophages). Surprisingly, Gal $\beta$ 1,4Man-PO<sub>4</sub>-deficient *lpg2*-KO promastigotes do not induce TLR3 mRNA (Figure 2A). As expected, the ligand of TLR3 poly(I):poly(C) (23) and LPS (24) caused a strong upregulation of TLR3 mRNA (respectively 7,4- and 5,7-expression ratio over unstimulated cells) while TLR2 ligand peptidoglycan did not induce the expression of TLR3. Also, quantitative PCR showed that *L. donovani* promastigotes, WT or LPG-deficient mutants, do not modulate the expression levels of TLR2 or TLR4 mRNAs (data not shown). Because TLR3 is expressed in IFN- $\gamma$ -primed macrophages, we then verified the effects of *L. donovani* promastigotes on the expression of TLR3 mRNA. As shown in figure 2B, a stimulation with either *L. donovani* promastigotes (WT or LPG-deficient) or poly(I):poly(C) do not modulate TLR3 mRNA expression.

#### *TLR3 expression is induced by L. donovani promastigotes*

In order to explain the different immune responses toward *L. donovani* promastigotes between naive and IFN- $\gamma$ -primed macrophages, we previously proposed that it could be explained by the presence of TLR3 in IFN- $\gamma$ -primed macrophages (13). We therefore wanted to verify if the observed induction of TLR3 mRNA is reflected by an induction of receptor expression. To this end, TLR3 expression was assessed by immunofluorescence in naive macrophages stimulated with *L. donovani*. In these experiments, we used promastigotes constitutively expressing GFP in order to monitor the efficiency of the infection. As shown in figure 3, TLR3 expression in naive macrophages is quite low (figure 3A). When macrophages were stimulated with either *L. donovani* promastigotes WT (figure 3B) or *lpg1*-KO (figure 3C) promastigotes or poly(I):poly(C) (figure 3E), we observed a strong induction of TLR3 expression. As expected from RT-PCR experiments, the stimulation of naive macrophages with *lpg2*-KO mutants, did not increase TLR3 expression (figure 3D). The utilisation of GFP-expressing *lpg2*-KO proves that lack of induction by the parasite is not due to deficient infection.



*TLR3 mRNA induction is not caused by L. donovani DNA, RNA or proteins*

Depending on the PAMP recognized by a TLR, PAMPs can be categorized into three groups: lipids recognized by TLR1, TLR2 and TLR6; nucleic acids recognized by TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9; proteins recognized by TLR4 and TLR5 (3). Because TLR3 recognizes dsRNA of viruses and a secondary structure of *S. mansoni*, we checked the effects of *L. donovani* nucleic acids on the induction of TLR3 mRNA. To this end, we isolated *L. donovani* promastigote total DNA, RNA or proteins and these extracts were used to stimulate naive macrophages. As shown in figure 4, we did not observe an induction of TLR3 after stimulation. This observation suggests that TLR3 mRNA induction occurs after the recognition of the whole parasite.

*TLR3 mRNA induction happens after the phagocytosis of promastigotes*

In order to identify the possible mechanisms of TLR3 induction, macrophages were incubated with pharmacological inhibitors against phosphoinositide 3-kinases (PI3-k) (Ly294002), actin rearrangement (cytochalasin B) or p38 MAPk (SB203580) for 1h prior to exposure to WT *L. donovani* promastigotes or poly(I):poly(C) stimulation. As shown in figure 5, the inhibition of PI3-k (lane Ly) or actin rearrangement (lane Cyt B) blocks the induction of TLR3 mRNA observed following *L. donovani* promastigote stimulation. This result suggests that TLR3 induction occurs after phagocytosis of the promastigote. It was recently reported that some pathogens cause the up-regulation of TLR expression by a p38 MAPk-dependent mechanism (25, 26). However, TLR3 mRNA induction by *L. donovani* promastigotes happens even if p38 MAPk is inhibited (Figure 5, lane SB). As a control, macrophages were stimulated with poly(I):poly(C), oligonucleotides that are not phagocytosed by the macrophages in order to cause an effect. As expected, TLR3 mRNA induction caused by poly(I):poly(C) is still observed even with the inhibition of PI3-k, actin rearrangement or p38 MAPk (figure 5). Of interest, the inhibition of ERK1/2 (PD98059), JAK2 (AG-490) or protein tyrosine kinase (herbimycin A) did not block TLR3 mRNA induction by *L. donovani* promastigotes (data not shown).

### *TLR3 mRNA is induced by a phagocytic signal*

In order to test the hypothesis that TLR3 is up-regulated following a phagocytic signal, TLR3 mRNA expression was measured by quantitative PCR after a stimulation with other particles. Interestingly, a stimulation with zymosan, complement opsonised zymosan or latex beads induced the expression of TLR3 mRNA (respectively 5.9-, 9.1- and 4.1-expression ratio versus unstimulated cells) (figure 6). These results suggest that the induction of TLR3 is part of a natural process of macrophages that occurs after the phagocytosis of a particle. As shown in figure 2A, Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$ -deficient promastigotes do not cause an induction of TLR3. However, *lpg2*-KO promastigotes opsonised with C5-deficient serum induce TLR3 mRNA in naive macrophages (figure 6). *Leishmania* promastigotes were opsonised with the serum of C5-deficient mice in order to avoid the killing of the *lpg2*-KO mutants by the complement complex.

### *TLR3 is localised at the membrane of Leishmania-containing phagosomes*

Underhill *et al.* (27) proposed that TLR2 is generally recruited at phagosome membranes in order to sense the identity of the phagocytosed particle. It is also accepted that TLR3 is located intra-cellularly (28). Following our observation that TLR3 expression is induced after the phagocytosis of a particle, we then verified the localisation of TLR3 after the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Naive macrophages were infected with WT, *lpg1*-KO or *lpg2*-KO *L. donovani* promastigotes stably expressing GFP for 6h and TLR3 localisation was assessed by confocal microscopy. As shown in figure 7, TLR3 is detected at the membrane of phagosomes containing *L. donovani* promastigotes, either WT (figure 7B) or *lpg1*-KO (figure 7C). Because TLR3 isn't induced by *lpg2*-KO (figure 2A and 3D), we did not see TLR3 at the phagosomes containing these promastigotes (Figure 7D). Interestingly, in IFN- $\gamma$ -primed macrophages, TLR3 is detected at the membrane of the phagosomes containing *L. donovani* promastigotes (data not shown). Furthermore, TLR2 was detected at the membrane of phagosomes containing either WT or LPG-deficient *L. donovani* promastigotes (data not shown).

## DISCUSSION

During an infection, a central component of the host defense is the marked reprogramming of the transcriptome of immune cells (15). Given their preponderant role in innate immunity and that cell surface expression of TLRs is typically quite low, varying in human monocytes from a few hundred to a few thousand molecules per cell (29), the modulation of TLR expression has been under considerable investigation (15). Studying the modulation of TLR expression by *L. donovani* promastigotes may lead to identification of the genes necessary to control that infection. As yet, three different TLRs have been shown to play a role in the immune response toward *Leishmania*: TLR2, TLR3, and TLR4 (13, 16-18). Following *L. donovani* promastigote stimulation, we expected to find the up-regulation of these three TLRs. However, we observed that only TLR3 is up-regulated, whereas other TLRs and adaptor proteins are not modulated, in infected versus unstimulated cells (Figure 1). In general, a PAMP up-regulates the expression of its TLR, but the selective modulation of the TLRs have already been observed with other pathogens. For example, *E. coli* stimulation of THP-1 macrophages caused the up-regulation of TLR2, TLR5, TLR7 and TLR8 but not TLR4 even though the importance of TLR4 for the immune response against that pathogen was previously demonstrated (30). Interestingly, Becker *et al.* (16) reported the up-regulation of TLR2 mRNA in human NK cells stimulated with purified *L. major* LPG, although no modulation of TLR2 after the infection of the promastigote was observed in our experiment (Figure 1). This apparent contradiction was also observed by Nau *et al* (31), who showed that whole bacteria do not induce the same TLR pattern as purified LPS.

Our observation that TLR3 is induced after the phagocytosis of *L. donovani* promastigotes or other particles was surprising. In order to explain this result, the question of TLR localization is primordial. Whereas TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6 are found at the cell surface, TLR3, TLR7 and TLR9 are mainly localized in intracellular acidic compartments (28, 32-35). As was shown by Nishiya *et al.* (33), the

intracellular localization of TLR3 and TLR7, two TLRs implicated in the recognition of viral RNAs, is achieved by distinct elements (a transmembrane region for TLR7 and a cytoplasmic linker region for TLR3) but they are both found in the same intracellular compartment adjacent to phagosomes containing apoptotic cell particles (33, 35). Also, the regulation of intra- and extracellular TLRs is different, as was recently showed with TLR4 and TLR9 (36). Furthermore, compared to other PAMP-dependent modulation of TLR expression, our observation that TLR3 mRNA upregulation is p38 MAPk-independent (Figure 5), further demonstrate the difference in the regulation of its expression. Kammanadiminti *et al.* (25) showed that TLR2 upregulation by Gal-lectin of *E. histolytica* is p38 MAPk- and NF- $\kappa$ B-dependent, suggesting an autocrine mechanism. However, TLR3 is not present in naive macrophages, thereby excluding that possibility for TLR3 regulation. The upregulation of TLR3 happens after an unidentified “phagocytic signal”, possibly in order to sample the content of the phagosome and trigger an appropriate immune response. This role for TLR3 is in accordance with the observation that treatment of THP-1 cells with whole *E. coli* or *S. aureus* bacteria led to the up-regulation of, among others, TLR3. Interestingly, TLR3 mRNA was more significantly induced by Gram-positive than Gram-negative bacteria (30). This role as a sensor was also previously shown for TLR2, which is recruited at the membrane of phagosomes (27). Our observation that TLR3, and TLR2, are located at the membrane of phagosomes containing *Leishmania* promastigotes or zymosan particles supports that possibility (Figure 7 and data not shown).

The induction of TLR3 mRNA following a stimulation by zymosan or latex bead is in accordance with its proposed role as a sensor of phagosome’s content (Figure 6). The induction of TLR3 mRNA occurs following the engagement of some, but not all, phagocytic receptors. As shown in figure 6, the engagement of complement receptors (CR) lead to TLR3 mRNA induction. It is well known that glycoconjugates of *Leishmania* promastigotes are recognized by CR (8-12). Since *lpg2*-KO mutants do not express these molecules, they are not recognized by these receptors and thus do not lead to TLR3 mRNA induction (Figure 2A). Also, our observation that the stimulation

of naive macrophages by an extract of either *Leishmania* DNA, RNA or proteins did not cause an induction of TLR3 reflects the importance of the phagocytosis of a particle in TLR3 induction (Figure 4).

We previously reported that TLR3 is implicated in the secretion of NO and TNF $\alpha$  by IFN- $\gamma$ -primed macrophages following an infection by *L. donovani* promastigotes (13). These results led us to propose that the difference of the observed immune response between naive and IFN- $\gamma$ -primed macrophage toward *L. donovani* promastigotes could be explained by the presence of TLR3 after IFN- $\gamma$  activation. As such, it was quite surprising to find that TLR3 is induced by the phagocytosis of the promastigote in naive macrophages but there is still an absence of a protective immune response toward the parasite. Many pathogens have evolved different mechanisms in order to evade the activation of a pro-inflammatory immune response. Recent evidence suggests that the modulation of TLR signalling represents a good way to evade that recognition. For example, vaccinia viruses encode the protein A52R that associates with IRAK2 and TRAF6 and abrogates the transduction of the signal to NF- $\kappa$ B by various TLRs (37). Also, *M. tuberculosis* lipoarabinomann induces IRAK-M, a negative regulator of TLR signalling (38). It is generally accepted that *Leishmania* promastigotes cause a general deactivation of host cell signalling (39, 40). This is achieved mainly by the activation of the tyrosine phosphatase SHP-1 by *Leishmania*'s elongation factor (EF)-1 $\alpha$  (41). Another mechanism of deactivation is the induction of Suppressor of cytokine secretion (SOCS)-1 and SOCS-3 mRNA by *Leishmania* promastigotes (18, 42). Interestingly, it was recently shown that SOCS-1 interacts with the TLR adaptor protein Mal and causes its degradation (43). Of interest, we previously noticed a slight decrease in the activation level of IRAK-1 following the infection of naive BMM by *L. donovani* promastigotes (13), suggesting a sabotage of TLR signalling by the parasite. Another possibility to explore is the translational efficiency of the induced TLR3 mRNA. Members of TLR family are highly alternatively spliced, producing a large number of novel proteins with a potential to functionally alter the immune response. Following a 7 hour treatment of murine macrophages by LPS, Wells

*et al.* (44) observed the induction of many TLR3 transcripts with variable 5'-UTR, suggesting the use of different transcription start sites. This implies a differential promoter usage and this presumably alters the stability and translational efficiency of mRNA (44). Collectively, our results show that TLR3 is rapidly induced following the phagocytosis process and acts as a sensor of phagosome content. At the same time, *Leishmania* promastigotes may use complex mechanisms to evade the immune response of macrophages.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to Marcel Desrosiers for his technical expertise in confocal microscopy. We would also like to thank Dr François Shareck (INRS-Institut Armand-Frappier) for the synthesis of siRNA against GFP.

## REFERENCES

1. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394.
2. Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:588.
3. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783.
4. Kaisho, T., and S. Akira. 2004. Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* 6:1388.
5. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C. A. Janeway, Jr. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2:253.
6. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78.
7. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640.
8. Alexander, J., A. R. Satoskar, and D. G. Russell. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112 Pt 18:2993.
9. Bersudsky, M., R. N. Apte, and J. El-On. 2000. Interleukin 1alpha activity of peritoneal and bone marrow macrophages infected with *Leishmania major* and *Leishmania donovani* in vitro. *Exp Parasitol* 94:150.
10. 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.
11. Reiner, N. E. 1987. Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*. *J Immunol* 138:1919.
12. Reiner, S. L., S. Zheng, Z. E. Wang, L. Stowring, and R. M. Locksley. 1994. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 179:447.
13. Flandin, J. F., F. Chano, and A. Descoteaux. 2006. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol* 36:411.



14. Janssens, S., and R. Beyaert. 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 16:637.
15. Jenner, R. G., and R. A. Young. 2005. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol* 3:281.
16. Becker, I., N. Salaiza, M. Aguirre, J. Delgado, N. Carrillo-Carrasco, L. G. Kobeh, A. Ruiz, R. Cervantes, A. P. Torres, N. Cabrera, A. Gonzalez, C. Maldonado, and A. Isibasi. 2003. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130:65.
17. Kropf, P., M. A. Freudenberg, M. Modolell, H. P. Price, S. Herath, S. Antoniazzi, C. Galanos, D. F. Smith, and I. Muller. 2004. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 72:1920.
18. de Veer, M. J., J. M. Curtis, T. M. Baldwin, J. A. DiDonato, A. Sexton, M. J. McConville, E. Handman, and L. Schofield. 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 33:2822.
19. Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198:1043.
20. Hardy, M. P., G. A. F. Mc, and L. A. O'Neill. 2004. Transcriptional regulation of the human TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta) gene. *Biochem J* 380:83.
21. Biswas, A., P. Banerjee, G. Mukherjee, and T. Biswas. 2006. Porin of *Shigella dysenteriae* activates mouse peritoneal macrophage through Toll-like receptors 2 and 6 to induce polarized type I response. *Mol Immunol*.
22. Williams, K. L., J. D. Lich, J. A. Duncan, W. Reed, P. Rallabhandi, C. Moore, S. Kurtz, V. M. Coffield, M. A. Accavitti-Loper, L. Su, S. N. Vogel, M. Braunstein, and J. P. Ting. 2005. The CATERPILLER protein monarch-1 is an antagonist of toll-like receptor-, tumor necrosis factor alpha-, and *Mycobacterium tuberculosis*-induced pro-inflammatory signals. *J Biol Chem* 280:39914.
23. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732.
24. Heinz, S., V. Haehnel, M. Karaghiosoff, L. Schwarzfischer, M. Muller, S. W. Krause, and M. Rehli. 2003. Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem* 278:21502.
25. Kammanadiminti, S. J., B. J. Mann, L. Dutil, and K. Chadee. 2004. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *Faseb J* 18:155.
26. Chang, J. H., J. Y. Park, and S. K. Kim. 2006. Dependence on p38 MAPK signalling in the up-regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis*-treated HeLa cells. *Immunology* 118:164.

27. Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811.
28. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171:3154.
29. Visintin, A., A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, and D. M. Segal. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166:249.
30. Zarembek, K. A., and P. J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168:554.
31. Nau, G. J., A. Schlesinger, J. F. Richmond, and R. A. Young. 2003. Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria. *J Immunol* 170:5203.
32. Zhang, H., P. N. Tay, W. Cao, W. Li, and J. Lu. 2002. Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett* 532:171.
33. Nishiya, T., E. Kajita, S. Miwa, and A. L. Defranco. 2005. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem* 280:37107.
34. Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, and D. T. Golenbock. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5:190.
35. Funami, K., M. Matsumoto, H. Oshiumi, T. Akazawa, A. Yamamoto, and T. Seya. 2004. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol* 16:1143.
36. Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32:1958.
37. Harte, M. T., I. R. Haga, G. Maloney, P. Gray, P. C. Reading, N. W. Bartlett, G. L. Smith, A. Bowie, and L. A. O'Neill. 2003. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* 197:343.
38. Pathak, S. K., S. Basu, A. Bhattacharyya, S. Pathak, M. Kundu, and J. Basu. 2005. Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated IRAK-M induction negatively regulates Toll-like receptor-dependent interleukin-12 p40 production in macrophages. *J Biol Chem* 280:42794.
39. Gregory, D. J., and M. Olivier. 2005. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite Leishmania. *Parasitology* 130 Suppl:S27.
40. Olivier, M., D. J. Gregory, and G. Forget. 2005. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18:293.

41. Nandan, D., T. Yi, M. Lopez, C. Lai, and N. E. Reiner. 2002. Leishmania EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *J Biol Chem* 277:50190.
42. Bertholet, S., H. L. Dickensheets, F. Sheikh, A. A. Gam, R. P. Donnelly, and R. T. Kenney. 2003. Leishmania donovani-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect Immun* 71:2095.
43. Mansell, A., R. Smith, S. L. Doyle, P. Gray, J. E. Fenner, P. J. Crack, S. E. Nicholson, D. J. Hilton, L. A. O'Neill, and P. J. Hertzog. 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 7:148.
44. Wells, C. A., A. M. Chalk, A. Forrest, D. Taylor, N. Waddell, K. Schroder, S. R. Himes, G. Faulkner, S. Lo, T. Kasukawa, H. Kawaji, C. Kai, J. Kawai, S. Katayama, P. Carninci, Y. Hayashizaki, D. A. Hume, and S. M. Grimmond. 2006. Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade. *Genome Biol* 7:R10.
45. 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.
46. St-Denis, A., V. Caouras, F. Gervais, and A. Descoteaux. 1999. Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J Immunol* 163:5505.
47. Ha, D. S., J. K. Schwarz, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 1996. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania. *Mol Biochem Parasitol* 77:57.
48. Medina-Acosta, E., and G. A. Cross. 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol* 59:327.
49. Lodge, R., and A. Descoteaux. 2005. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. *Clin Immunol* 114:256.
50. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402.
51. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
52. Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, and L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** TLR3 mRNA is induced by *L. donovani* promastigotes. Adherent naive BMM were either stimulated with WT *L. donovani* promastigotes (WT) at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1 or left unstimulated (NS) for 6 hours. Total RNA was extracted, reverse transcribed and used as the template for PCR amplification of the identified genes. The amplification of HPRT was used as internal control. Data are representative of at least three separate experiments.

**Figure 2.** TLR3 mRNA is not induced by Gal $\beta$ 1,4Man-PO<sub>4</sub>-deficient *L. donovani* promastigotes. A) Adherent naive BMM were stimulated with WT, *lpg1*-KO, or *lpg2*-KO *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1, LPS (100 ng/ml), poly(I):poly(C) (20  $\mu$ g/ml) or PGN (10  $\mu$ g/ml) for 6 hours. Total RNA was extracted, reverse transcribed and used as template for quantitative PCR of TLR3. Results are shown as the mean expression ratio of stimulated versus unstimulated cells as calculated by REST MCS software. The dashed line represents TLR3 expression in naive unstimulated cells. HPRT was used as the reference gene. Data are representative of at least three separate experiments. \*  $p < 0.05$  vs unstimulated cells. B) Adherent BMM were primed with IFN- $\gamma$  for 18 hours (100 U/ml) and stimulated with WT, *lpg1*-KO, or *lpg2*-KO *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1 or poly(I):poly(C) (20  $\mu$ g/ml) for 6 hours. Total RNA was extracted, reverse transcribed and used as a template for PCR of TLR3. The amplification of HPRT was used as the internal control. Data are representative of at least three separate experiments.

**Figure 3.** TLR3 expression is induced by *L. donovani* promastigotes. Naive BMM grown on coverslips were infected with GFP-expressing WT (B), *lpg1*-KO (C) or *lpg2*-KO (D) *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1 or poly(I):poly(C) (20  $\mu$ g/ml) (E) for 6 hours. Cells were fixed, permeabilized and stained for detection of TLR3 expression (TLR3 column). The presence of intracellular

*Leishmania* was confirmed by GFP (Stimuli column). Data are representative of at least three separate experiments.

**Figure 4.** TLR3 mRNA induction is not caused by *L. donovani* DNA, RNA or proteins. Adherent naive BMM were stimulated with WT *L. donovani* promastigotes (WT), total DNA (DNA) at 20 µg/ml, total RNA (RNA) at 20 µg/ml or total proteins (proteins) at 20 µg/ml for 6 hours. Total RNA was extracted, reverse transcribed and used as a template for PCR of TLR3. The amplification of HPRT was used as the internal control. Data are representative of at least three separate experiments.

**Figure 5.** TLR3 mRNA induction occurs following phagocytosis of *L. donovani* promastigotes. Adherent naive BMM were preincubated for 1 hour with DMSO, 100 µM Ly294002 (Ly), 20 µM cytochalasin B (Cyt B) or 5 µM SB203580 (SB) and then stimulated with WT *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1 or poly(I)poly(C) (20 µg/ml) for 6 hours. Total RNA was extracted, reverse transcribed and used as the template for PCR of TLR3. The amplification of HPRT was used as the internal control. Data are representative of at least three separate experiments.

**Figure 6.** TLR3 mRNA is induced following a phagocytic signal. Adherent naive BMM were stimulated with C5-deficient opsonised WT or *lpg2*-KO *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1, zymosan or C5-deficient opsonised zymosan at a zymosan-to-macrophage ratio of 5:1, and latex beads at a bead-to-macrophage ratio of 5:1 for 6 hours. Total RNA was extracted, reverse transcribed and used as the template for quantitative PCR of TLR3. Results are shown as the mean expression ratio of stimulated versus unstimulated cells as calculated by REST MCS software. The dashed line represents TLR3 expression in naive unstimulated cells. HPRT and TBP were used as the reference genes. Data are representative of at least three separate experiments. \*  $p < 0.05$  vs unstimulated cells.

**Figure 7.** TLR3 is located at the membrane of *Leishmania*-containing phagosomes. Naive BMM grown on coverslips were infected with GFP-expressing WT (B), *lpg1*-KO (C) or *lpg2*-KO (D) *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1 for 6 hours. Cells were fixed, permeabilized and stained for TLR3 (red) and Draq5 (DNA, blue). Cells were visualized by confocal microscopy. Data are representative of at least three separate experiments.

figure 1

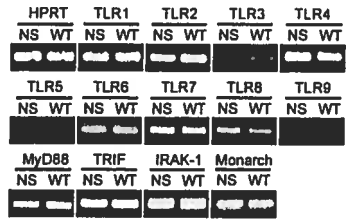


Figure 2

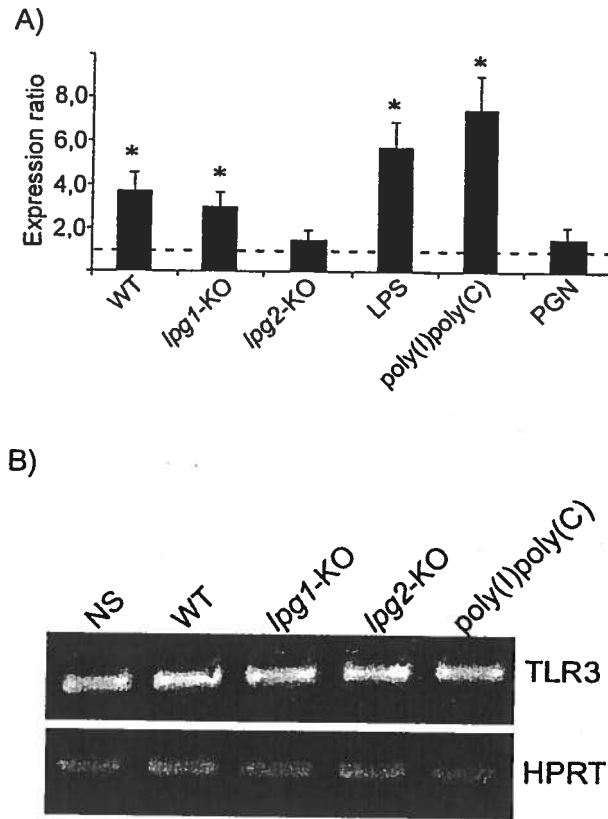




Figure 3

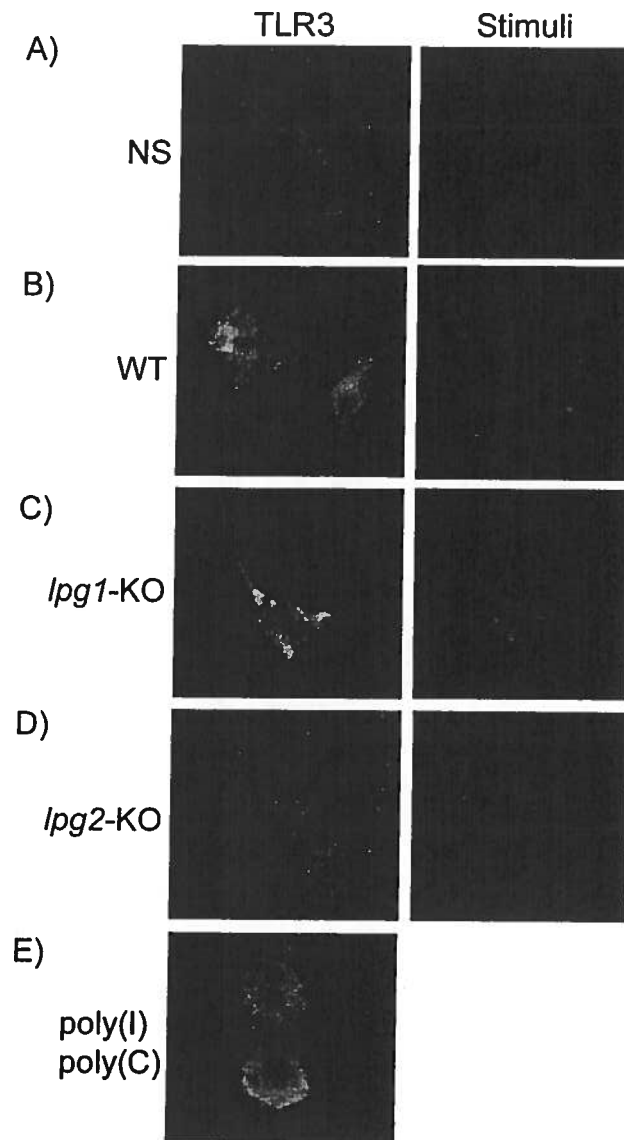


Figure 4

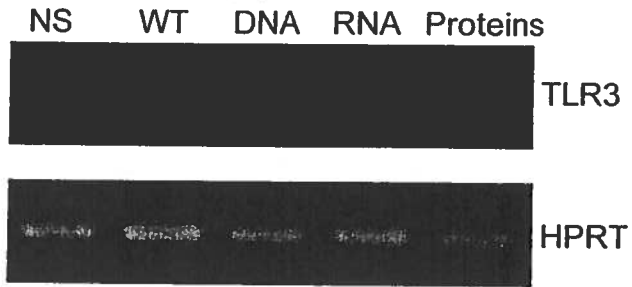


Figure 5

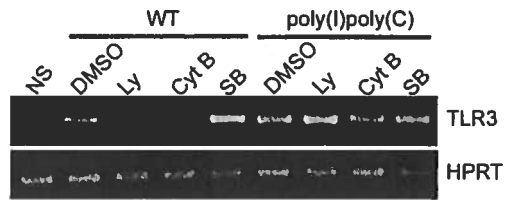


Figure 6

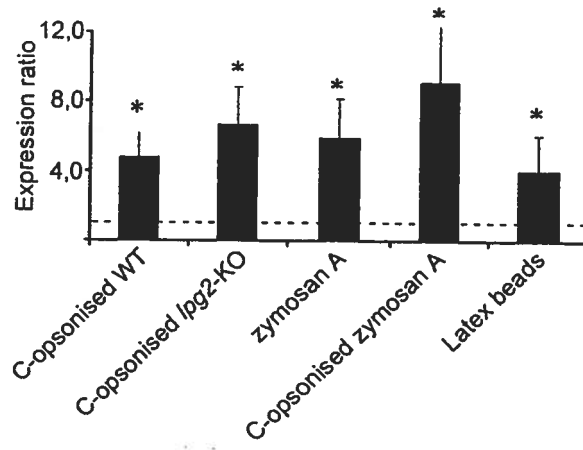
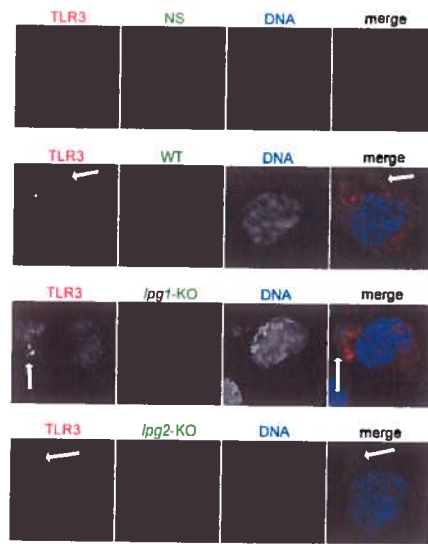
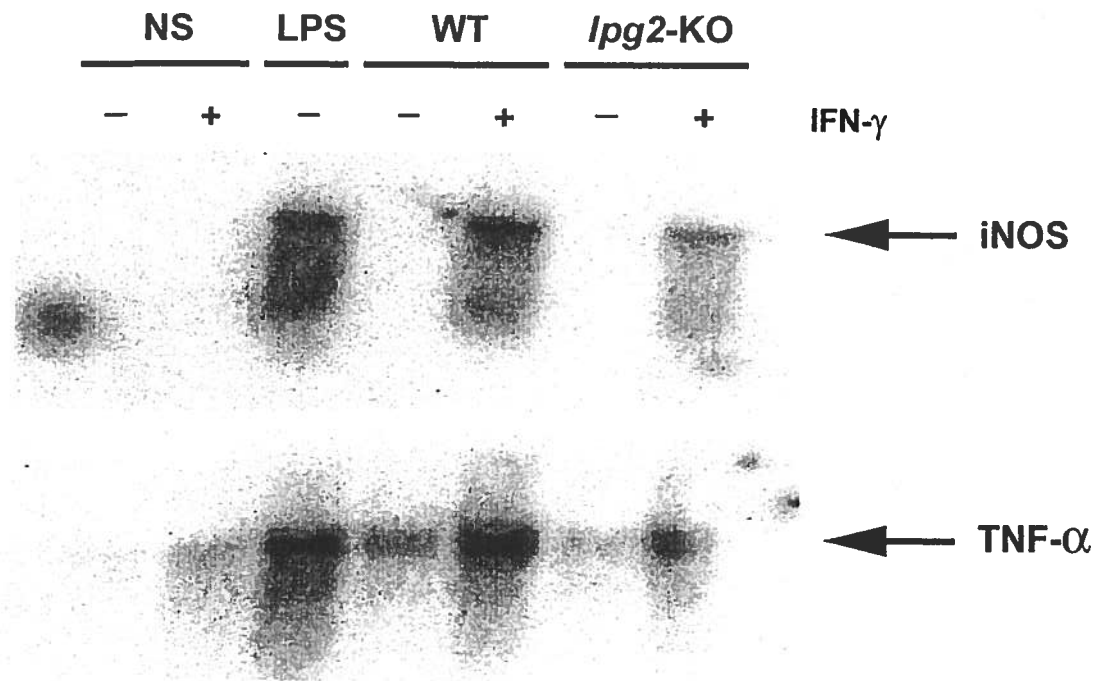


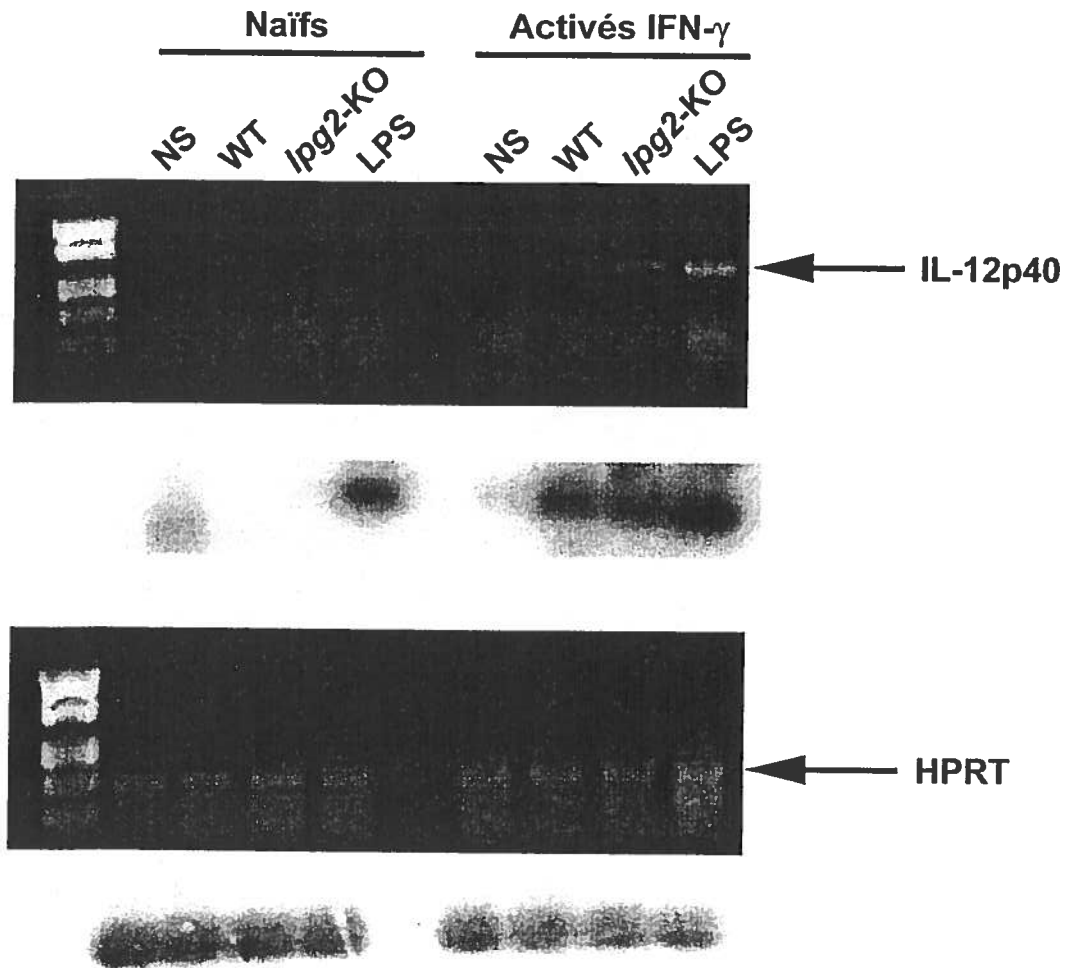
Figure 7



## **RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES**

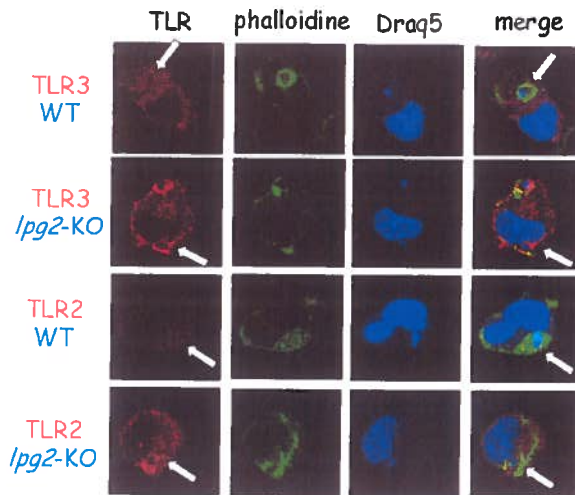


**FIGURE S1 : *L. DONOVANI* INDUIT LA TRANSCRIPTION D'INOS ET TNF- $\alpha$  DANS LES MACROPHAGES ACTIVES A L'IFN- $\gamma$ .** Les macrophages adhérents BMM furent activés avec l'IFN- $\gamma$  (50 U/mL) pour 18 h et stimulés avec le LPS (100 ng/mL) ou les promastigotes de *L. donovani* WT ou *lpg2*-KO en phase stationnaire à un ratio parasite:macrophage de 10:1 pour 6 h. L'ARN total fut isolé, séparé par migration sur gel d'agarose et transféré sur membrane de nylon. Cette membrane fut utilisée pour l'hybridation de type Northern avec des sondes spécifiques pour iNOS ou TNF- $\alpha$ . L'intégrité des ARNm fut analysée par coloration au bromure d'éthidium. NS : non-stimulés.

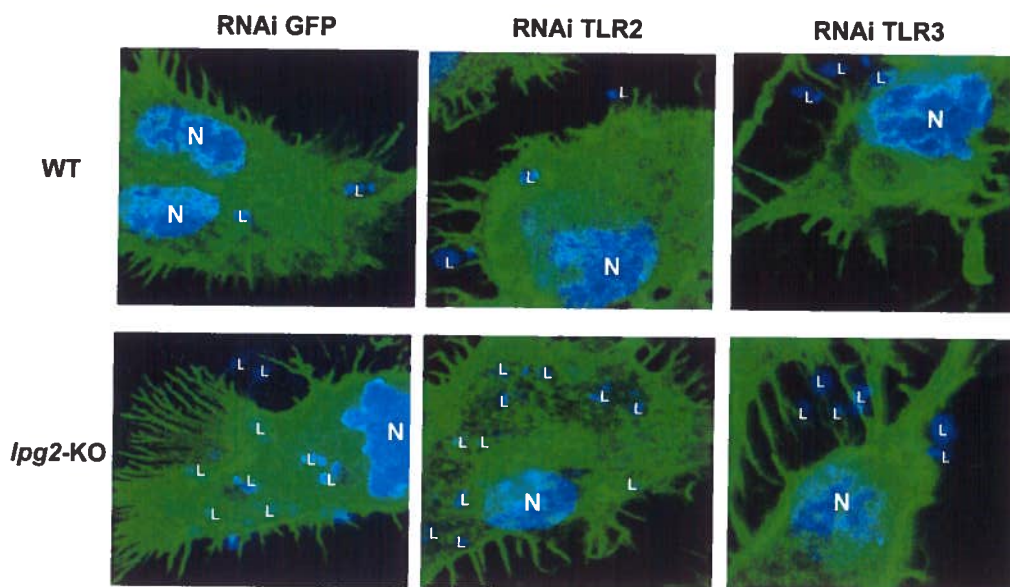


**FIGURE S2 : *L. DONOVANI* INDUIT IL-12P40 DANS LES MACROPHAGES ACTIVES A L'IFN- $\gamma$ .** Les macrophages BMM furent activés ou non à l'IFN- $\gamma$  (100 U/mL) pour 18 h et stimulés avec le LPS (100 ng/mL) ou par les promastigotes de *L. donovani* en phase stationnaire WT ou *lpg2-KO* à un ratio parasite:macrophage de 10:1 pour 6 h. L'ARN total fut extrait, inversement transcrits et l'ADNc utilisé pour un PCR de IL-12p40 ou HPRT. Les fragments furent séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (w/v). Les résultats furent confirmés par hybridation de type Southern.

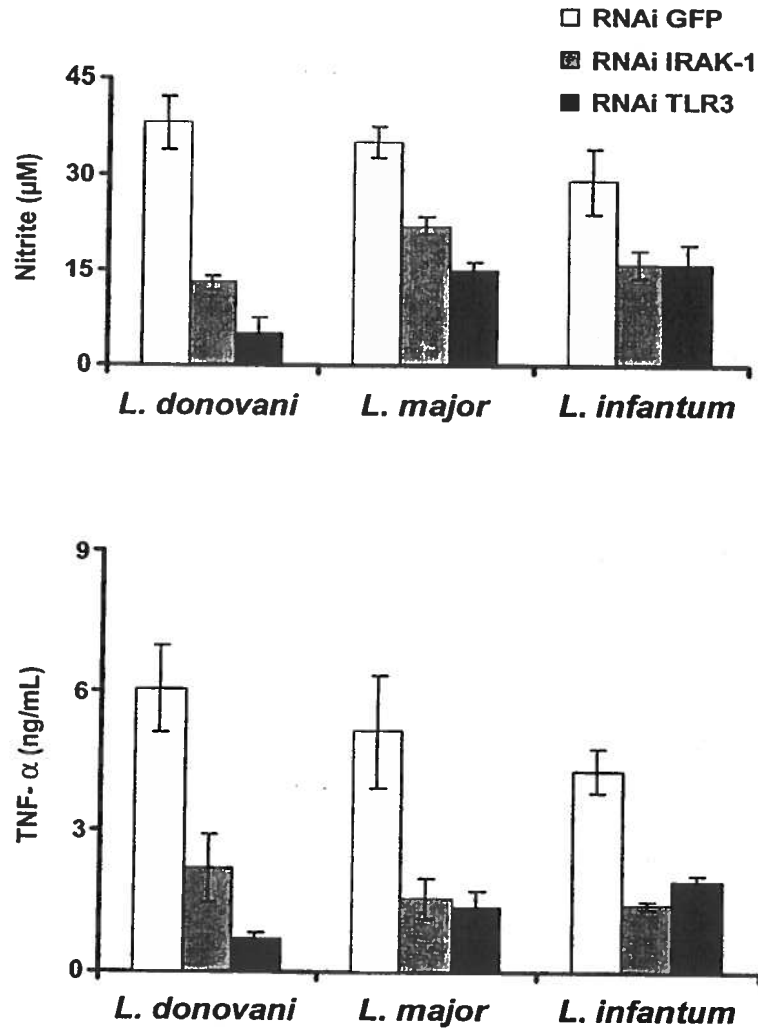




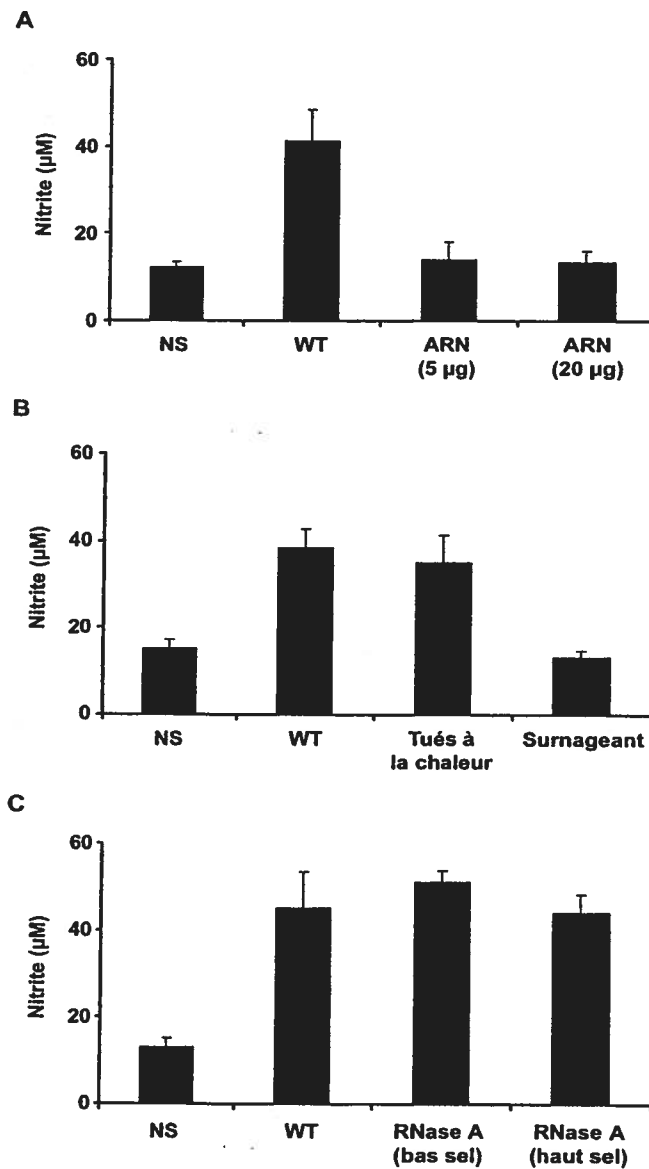
**FIGURE S3 : TLR2 ET TLR3 SONT LOCALISÉS À LA MEMBRANE DES PHAGOSOMES CONTENANT LES PROMASTIGOTES DE *L. DONOVANI*** Les macrophages péritonéaux adhérents furent activés à l'IFN- $\gamma$  pour 18 h et stimulés avec les promastigotes de *L. donovani* WT ou *lpg2-KO* en phase stationnaire pour 1 h. Les cellules furent fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps pour TLR2 ou TLR3. Un second anticorps couplé à alexa568 (rouge) fut utilisé pour révéler les TLR. Parallèlement, les cellules furent marquées avec phalloïdine-alexa488 (vert-actine) et Draq5 (bleu-ADN). Les cellules ont été visualisées par microscopie confocale.



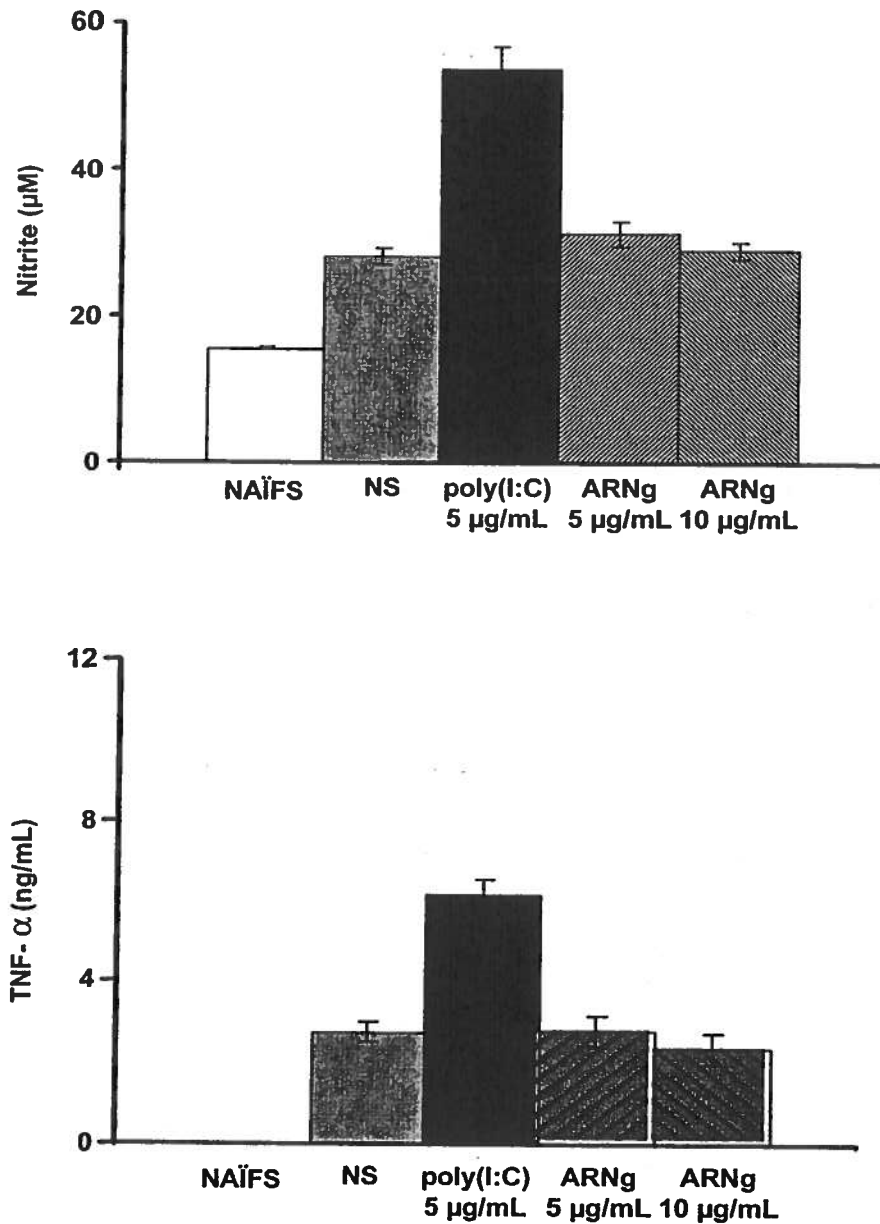
**FIGURE S4 : LES TLRs PERMETTENT L'INTERNALISATION DES PROMASTIGOTES** Les macrophages RAW 264.7 adhérents furent traités par RNAi envers GFP, TLR2 et TLR3, activés à l'IFN- $\gamma$  (100 U/mL) pour 18 h, infectés par des promastigotes de *L. donovani* en phase stationnaire WT ou *lpg2*-KO à un ratio parasite:macrophage de 10:1 pour 2 h. Les cellules furent ensuite fixées, perméabilisées et marquées par Draq5 (bleu-ADN) et phalloïdine-alexa488 (vert-actine). Les images furent prises par microscopie confocale. Les noyaux des macrophages sont identifiés par N alors que L représente les promastigotes de *Leishmania*.



**FIGURE S5 : TLR3 EST IMPLIQUE DANS LA SECRETION DE NO ET TNF- $\alpha$  EN REPONSE A *L. DONOVANI*, *L. MAJOR* ET *L. INFANTUM*** Les macrophages RAW 264.7 adhérents furent traités par RNAi envers GFP, IRAK-1 et TLR3, activés à l'IFN- $\gamma$  (100 U/mL) pour 18 h, infectés par des promastigotes de *L. donovani*, *L. major* et *L. infantum* en phase stationnaire WT à un ratio parasite:macrophage de 10:1 pour 18 h. Le surnageant fut récolté et le nitrite mesuré par le réactif de Griess. La sécrétion de TNF- $\alpha$  fut mesurée par ELISA.



**FIGURE S6: A LA RECHERCHE DU LIGAND** Les macrophages adhérents BMM furent activés à l'IFN- $\gamma$  (100 U/mL) pour 18 h et stimulés par les promastigotes de *L. donovani* WT en phase stationnaire à un ratio parasite:macrophage de 10:1 pour 18 h et A) 5 $\mu$ g ou 20 $\mu$ g d'ARN total des promastigotes de *L. donovani* WT en phase stationnaire. B) les promastigotes de *L. donovani* tués à la chaleur (65°C, 10 minutes) ou le surnageant d'une culture de *L. donovani*. C) les promastigotes de *L. donovani* traités avec la RNase A dans un tampon à basse ou haute concentration en sel. Suite à la stimulation, les surnageants furent récoltés et le nitrite mesuré par le réactif de Griess.



**FIGURE S7 : L'ARNg NE CAUSE PAS LA SECRETION DE NO ET TNF- $\alpha$**  Les macrophages BMM adhérents furent activés à l'IFN- $\gamma$  (100 U/mL) pour 18 h et stimulés avec le poly(I:C) (5  $\mu\text{g/mL}$ ) ou le complexe ARNg-ARNm de *T. brucei* à une concentration de 5 ou 10  $\mu\text{g/mL}$  pour 18 h. Le surnageant fut récolté et le niveau de nitrite mesuré par le réactif de Griess et le TNF- $\alpha$  par ELISA.

## **DISCUSSION**

## **1. TLR3 reconnaît la forme promastigote de *L. donovani***

À la fin des années 1980, *Leishmania* a permis de bien caractériser et comprendre le biais Th1/Th2 dans la réponse immunitaire. En effet, le patron de cytokines dans l'organisme au moment de l'infection est primordial pour la suite de celle-ci. Alors qu'un environnement en cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10) est associé à la susceptibilité envers les leishmanies, un patron en cytokines de type Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12), confère la résistance envers ces parasites (Scott *et al.*, 1988). Cette dichotomie est bien reflétée par l'infection *in vitro* de macrophages par les promastigotes. Contrairement aux macrophages au repos, les macrophages préalablement activés à l'IFN- $\gamma$  sécrètent des cytokines pro-inflammatoires suite à une stimulation par les promastigotes et ces derniers sont rapidement tués.

Contrairement à l'immunité acquise, l'immunité innée envers les pathogènes était caractérisée, pour de nombreuses années, comme primitive et imprécise. Cependant, les dix dernières années ont permis d'apporter la notion de spécificité à cette forme d'immunité. En effet, l'identification des pathogènes survient grâce à des PRR qui reconnaissent des PAMPs. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'un PRR spécifique aux promastigotes de *L. donovani* soit induit par l'IFN- $\gamma$  et que celui-ci permette de déclencher la réponse immunitaire observée chez ces macrophages.

### **1.1 L'IFN- $\gamma$ induit l'expression de TLR3**

L'IFN- $\gamma$  est très bien connu comme un puissant activateur du macrophage, augmentant sa capacité à résoudre rapidement et efficacement de nombreuses infections. Parmi les nombreux effets de l'IFN- $\gamma$  sur le macrophage, on note entre autre : une augmentation de la capacité à processor et présenter les antigènes, l'activation des fonctions microbicides et une inhibition de la voie apoptotique de ces

cellules. En plus, l'IFN- $\gamma$  induit la transcription de nombreux gènes, incluant plusieurs PRRs (Boehm *et al.*, 1997, Schroder *et al.*, 2004). De nombreux résultats préliminaires nous permettaient de croire que le PRR présent seulement chez les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  soit un TLR. En effet, la liaison d'un PAMP à un TLR est associée, entre autre, à l'activation des voies de signalisation ERK1/2 et p38 MAPk, permettant ainsi la translocation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, IL-12 et TNF- $\alpha$  (Akira *et al.*, 2006). Premièrement, les voies de signalisation ERK1/2 et p38 MAPk sont activées suite à une infection par les promastigotes de *L. donovani* dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  (Prive et Descoteaux, 2000). Deuxièmement, suite à l'infection des macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  par les promastigotes, contrairement aux macrophages naïfs, les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 transloquent au noyau, tel que démontré par des expériences de retard sur gel (Chano et Descoteaux, résultats non-publiés). Troisièmement, découlant de l'activation des facteurs de transcription et des MAPk, les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  induisent la transcription d'iNOS, TNF- $\alpha$  et IL-12p40 en réponse à *L. donovani* (Fig S1, Fig S2), ce qui se traduit par une forte sécrétion de NO, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\alpha$  par ces macrophages (Reiner *et al.*, 1990, Prive et Descoteaux, 2000, Flandin *et al.*, 2006). Ces différentes observations suggèrent l'implication d'un TLR dans la reconnaissance des promastigotes de *L. donovani* par ces macrophages. Cependant, l'indice ultime représente l'activation de l'activité kinase de IRAK-1 (Article I, Figure 1), la kinase centrale dans la transduction du signal suite à la reconnaissance d'un PAMP par les TLRs. Accessoirement, cette kinase est aussi employée dans la voie de signalisation de IL-1R et pourrait donc, théoriquement, être activée par l'IL-1 sécrété (Janssens et Beyaert, 2003a). Étant donné l'activation très rapide, en moins de 15 minutes, de IRAK-1 cette hypothèse serait surprenante. Cependant, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-IL-1R ou de souris IL-1R<sup>-/-</sup> permettrait d'écarter définitivement cette possibilité.

L'expression des TLRs est modulée par plusieurs cytokines et de nombreux stimuli (Janssens et Beyaert, 2003b). De plus, l'IFN- $\gamma$  est un puissant activateur des



macrophages, permettant, entre autre, de préparer le macrophage pour efficacement combattre plusieurs microorganismes pathogènes (Boehme *et al.*, 1997, Schroder *et al.*, 2004). Ainsi, il est fort probable que l'IFN- $\gamma$  induise l'expression d'un ou plusieurs TLRs. À cette fin, nous avons comparé par RT-PCR l'expression des différents TLRs entre les macrophages naïfs et les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ . À la figure 2A de la première publication, on voit très bien que TLR3 est le seul TLR présent chez les macrophages activés, mais indétectable chez les macrophages naïfs. De plus, cette induction est confirmée par immunofluorescence (Article I, Figure 2B). Une étude d'expression des TLRs chez une grande variété de types cellulaires a préalablement démontré que TLR3 est exprimé chez les cellules dendritiques mais pas chez les macrophages au repos (Muzio *et al.*, 2000). Il a été démontré qu'en plus de l'IFN- $\gamma$ , TLR3 est aussi induit par l'IFN $\alpha/\beta$  et, chez les souris, par le LPS (Article I, Figure 2B) (Heinz *et al.*, 2003). Par immunofluorescence, on observe que chez les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  mais non infectés, TLR3 semble exprimé à la membrane plasmique. Cette localisation extracellulaire peut paraître surprenante, TLR3 ayant été identifié comme un récepteur intracellulaire et non membranaire (Nishiya et Defranco, 2004). Cependant, Matsumoto *et al.* (2002, 2003) a démontré que, dans les fibroblastes du moins, TLR3 peut être exprimé à la surface et permettre la transduction du signal. De plus, ces images ont été réalisées par microscopie optique et non confocale. Étant donné que la microscopie optique permet de visualiser la cellule entière (3D) et non, comme c'est le cas pour la microscopie confocale, seulement une tranche mince de cette cellule, il est hasardeux d'établir la localisation exacte de ce récepteur à ce stade-ci. À cette fin, la microscopie confocale se révèle beaucoup plus précise. Cependant, suite à l'infection de macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  par *L. donovani*, TLR3 est localisé à la membrane des phagosomes contenant les promastigotes (Figure S3).

### 1.1.1 Autres indices de l'implication de TLR3

Différentes évidences laissent présager le rôle de TLR3 dans la reconnaissance de *Leishmania*. Premièrement, le cas d'IL-12 est intéressant. En effet, les macrophages

naïfs ne sécrètent pas d'IL-12 suite à une stimulation par *Leishmania* (Carrera *et al.*, 1996, Belkaid *et al.*, 1998). Ainsi, l'IL-12 détectée *in vivo* est sécrétée par les cellules dendritiques et non par les macrophages (Gorak *et al.*, 1998). Étant donné qu'il a été établi que TLR3 est seulement exprimé chez les cellules dendritiques, nous avons vérifié le rôle de ce récepteur dans l'induction d'IL-12. À cette fin, nous avons vérifié par RT-PCR la transcription d'IL-12p40 en réponse aux promastigotes de *L. donovani* chez les macrophages naïfs et activés à l'IFN- $\gamma$ . Ainsi, à la figure S2, nous voyons que dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ , donc qui possèdent TLR3, les leishmanies induisent IL-12p40, contrairement aux macrophages naïfs n'exprimant pas TLR3 (Figure S2). Il est aussi intéressant de noter que TLR3, contrairement à TLR4, ne nécessite pas la présence des canaux lipidiques afin d'efficacement transduire le signal. Ainsi, même si le LPG de *Leishmania* détruit ces radeaux lipidiques, la signalisation peut tout de même survenir via TLR3 (Nakahira *et al.*, 2006).

## **1.2 Utilisation du RNAi**

Afin d'étudier le rôle de TLR3 dans la réponse immunitaire des macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  envers *L. donovani*, nous avons utilisé la technique d'interférence par l'ARN (RNAi). Ce mécanisme a récemment été identifié chez *Caenorhabditis elegans* et permet d'inactiver l'expression d'une protéine (*silencing*) grâce à la dégradation spécifique de l'ARNm (Fire *et al.*, 1998). En temps normal, ce mécanisme post-transcriptionnel empêche une surproduction de protéines. En laboratoire, le *silencing* se produit après la transfection d'un ARNdb synthétique (siRNA) spécifique pour l'ARNm de la protéine à *silencer*. Une fois transfecté dans la cellule, le doublet d'ARN de 21 nt est incorporé dans RISC (RNA-inducing silencing complex), un complexe multiprotéique possédant, entre autres, une activité endonucléase. Les deux brins d'ARN sont dénaturés et l'ARNsb antisens sert de guide au complexe RISC afin de reconnaître spécifiquement l'ARNm de cette protéine. Ce dernier est ensuite scindé grâce à l'action de l'endonucléase du complexe RISC (Elbashir *et al.*, 2002, Dykxhoorn *et al.*, 2003).

Les études précédentes furent réalisées dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM). Cependant, les macrophages primaires sont particulièrement réfractaires à la transfection, nous avons donc dû utiliser la lignée cellulaire RAW 264.7. Étant donné que les macrophages primaires et les RAW 264.7 répondent similairement autant aux promastigotes de *L. donovani* qu'à l'IFN- $\gamma$ , les résultats obtenus dans la lignée cellulaire reflètent fidèlement les macrophages primaires (Article I, Figure 4A; résultats non-publiés). Afin de vérifier l'efficacité du *silencing*, le niveau d'expression des protéines a été évalué par immunofluorescence (Article I, Figure 3). En comparant l'expression des protéines dans la colonne « RNAi specific » versus la colonne « RNAi GFP », on peut bien voir la diminution de l'expression de IRAK-1, MyD88, TLR2 et TLR3. La transfection d'un siRNA contre GFP est utilisé comme contrôle négatif. En effet, la transfection de siRNA n'entraîne généralement pas de réponse immunitaire en tant que tel mais un léger taux de mortalité est observé suite à la réaction de transfection. Ainsi, en utilisant un siRNA non-spécifique, on peut s'assurer que la diminution de l'expression de la protéine d'intérêt est causée seulement par les siRNA et non un résultat de la réaction de transfection (Elbashir *et al.*, 2002, Huppi *et al.*, 2005).

### **1.3 TLR3 est important pour la sécrétion de NO et TNF- $\alpha$**

Suite au *silencing* de ces différentes protéines et l'activation des macrophages par l'IFN- $\gamma$ , nous avons mesuré le niveau de NO et de TNF- $\alpha$  sécrété suite à la stimulation par les promastigotes de *L. donovani*, soit WT ou les mutants déficients en phosphoglycans *lpg1-KO* et *lpg2-KO* (Article I, Figures 4 et 5). Tel qu'expliqué dans l'introduction, les mutants *lpg1-KO* ne possèdent pas de LPG à leur surface mais peuvent tout de même sécréter les différentes formes de phosphoglycans tels que PPG, PG ou sAP (Figure 6C). Au contraire, les mutants *lpg2-KO* ne possèdent aucune forme de phosphoglycans, ni le LPG membranaire, ni les phosphoglycans sécrétés (section 1.4.2.2, Figure 6C). Nos résultats démontrent que TLR3 est important pour la sécrétion de NO et de TNF- $\alpha$  en réponse aux promastigotes de *L. donovani*. En effet, on voit

(Article I, Figure 4) que dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  où TLR3 est absent (RNAi TLR3), l'infection par les promastigotes, autant WT que les mutants déficients en phosphoglycans, n'induit pas la sécrétion de NO ou de TNF- $\alpha$ .

Alors que mes recherches étaient déjà entamées, deux groupes ont démontré que TLR2 joue un rôle dans la reconnaissance du LPG de *L. major* (Becker *et al.*, 2003, De Veer *et al.*, 2003). Afin d'examiner le rôle de ce TLR dans la reconnaissance de *L. donovani*, nous l'avons inclus dans notre étude. Ainsi, grâce aux différents mutants, nous avons pu démontrer que TLR2 reconnaît les sous-unités répétées Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$  des phosphoglycans de *L. donovani*. En effet, l'inhibition de TLR2 diminue la sécrétion de NO et TNF- $\alpha$  en réponse aux promastigotes WT et *lpg1*-KO, mais n'a aucun effet sur la sécrétion de NO et TNF- $\alpha$  suite à l'infection par les leishmanies déficientes en phosphoglycans (*lpg2*-KO). En plus, l'observation que le LPG purifié des promastigotes procycliques de *L. major* est un plus faible stimulateur des macrophages que le LPG purifié des promastigotes métacycliques, qui possèdent deux fois plus d'unités répétées, confirme cette reconnaissance (Becker *et al.*, 2003). Ainsi, dans le cas d'une stimulation par les promastigotes *lpg2*-KO, la sécrétion de NO et TNF- $\alpha$  survient suite à la reconnaissance d'une autre molécule des promastigotes par TLR3.

Aux figures 4 et 5, on observe que le *silencing* de MyD88 diminue la sécrétion de NO et TNF- $\alpha$  moins drastiquement que pour les autres protéines. Cependant, cela ne signifie pas que MyD88 a un rôle secondaire ou moins important que IRAK-1, TLR2 ou TLR3. En effet, l'efficacité du *silencing* varie légèrement entre chaque cellule et expérience (Elbashir *et al.*, 2002, Huppi *et al.*, 2005). Ainsi, il est particulièrement audacieux de vouloir quantifier les résultats obtenus. Cependant, en se basant sur les images obtenues par immunofluorescence, le *silencing* de MyD88 semble être légèrement moins efficace que pour les autres protéines (Article I, Figure 3). Ainsi, on peut présumer qu'une plus grande quantité de MyD88 subsistent dans la cellule suite au RNAi.

Afin de s'assurer de la spécificité de l'inhibition obtenue par RNAi, nous avons inclus différents contrôles lors de nos expériences. Comme prévu, l'inhibition de TLR2 diminue la sécrétion de NO et TNF- $\alpha$  suite à une stimulation par le peptidoglycan mais n'a aucune influence lors d'une stimulation par le LPS (reconnu par TLR4) ou le poly(I:C) (reconnu par TLR3). Le *silencing* de TLR3 diminue la sécrétion de ces cytokines suite à la stimulation par poly(I:C) mais aucune diminution n'est observée suite à la stimulation par le LPS et PGN. Et finalement, le *silencing* d'IRAK-1 et de MyD88 diminue la sécrétion suite à une stimulation par tous ces réactifs (Article I, Figures 4 et 5).

#### **1.4 Autres rôles de TLR3 dans la reconnaissance de *L. donovani***

Les TLRs sont impliqués dans une large variété de phénomènes chez les macrophages : phagocytose, présentation antigénique, activité microbicide, etc... Pour cette raison, la contribution de TLR2 et TLR3 dans ces phénomènes en réponse à *L. donovani* a été étudiée. Afin de vérifier le rôle de ces TLRs dans la phagocytose, nous avons compté, le nombre de promastigotes internalisés par les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  où l'expression, soit de TLR2, soit de TLR3, a été inhibée par RNAi. À la figure 6 de la première publication, on voit justement que le *silencing* de TLR2 et TLR3 cause une diminution faible (environ 25%) mais significative du nombre de promastigotes WT internalisés. De plus, le *silencing* de TLR2 n'a aucun effet sur l'internalisation des mutants *lpg2-KO*, ce qui constitue une autre preuve de la reconnaissance des sous-unités répétées des phosphoglycans de *L. donovani* par TLR2. À noter que l'inhibition de l'expression de TLR2 ou TLR3 n'a aucun effet sur le nombre de billes de latex internalisées (résultats non-présentés). En utilisant la microscopie confocale, on peut bien discerner les parasites internalisés de ceux qui sont plutôt attachés à la cellule. La figure S4 présente une image représentative des différentes expériences. On voit que, dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  dont l'expression de TLR2 ou TLR3 est inhibée, les leishmanies (marqués en bleu) se

trouvent à la surface des macrophages (en vert) mais ne sont pas internalisés. Cette observation est en accord avec Doyle *et al.* (2004), qui a précédemment démontré que les TLRs sont impliqués dans l'internalisation des bactéries et non leur attachement aux cellules. Le fait que les TLRs soient faiblement impliqués n'est pas nécessairement une surprise. Tel qu'expliqué dans la revue de littérature, les promastigotes de *Leishmania* sont internalisés via plusieurs récepteurs différents, les TLRs font partie de ceux-ci mais ne sont pas essentiels. D'ailleurs, en inhibant l'expression du MR, on observe aussi une diminution de l'internalisation des promastigotes de *L. donovani* d'environ 25% (Chakraborty *et al.*, 2001). Pour l'internalisation des promastigotes de *Leishmania*, CR3 semble être le récepteur phagocytaire de choix, ce dernier étant responsable d'environ 80% de la phagocytose des parasites (Lodge *et al.*, 2006).

Tel que mentionné dans l'introduction, le NO est l'arme chimique la plus leishmanicide de l'arsenal du macrophage. Étant donné que le *silencing* des différentes protéines des TLRs cause une diminution de la sécrétion de NO, nous avons voulu vérifier si cette diminution se traduit par la perte de l'activité leishmanicide des macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ . Tel que prévu, les parasites peuvent survivre dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  dans lequel l'expression de TLR3 a été inhibée (Article I, Figure 7). Cependant, le *silencing* de TLR2 et MyD88 ne diminue pas l'activité leishmanicide de ces macrophages, les leishmanies étant tuées aussi efficacement que dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  (résultats non-présentés). En ce qui concerne TLR2, il a été démontré qu'en réponse à *Listeria monocytogenes*, TLR2 est essentiel pour la sécrétion de cytokines. Cependant, l'activité listericide des macrophages est Myd88- et TLR2-indépendante (Edelson et Unanue, 2002). En plus, Kropf *et al.* (2004a, 2004b), a précédemment démontré le rôle de TLR4 dans le contrôle d'une infection par *L. major*. Dans le cas de MyD88, son *silencing* étant moins efficace que pour les autres protéines, il est possible qu'assez de protéines subsistent pour assurer l'activité leishmanicide. En effet, il existe un lien entre le niveau d'expression des TLRs et le déclenchement de la réponse immunitaire car le niveau d'expression de TLR4 détermine la finalité d'une infection par *S. typhimurium*, (Bihl *et al.*, 2003, Roy *et*

*al.*, 2006). Il n'est donc pas déraisonnable de supposer qu'un tel effet est aussi observé selon l'expression des différentes composantes de la voie de signalisation des TLRs. La même expérience a été réalisée avec les mutants *lpg2-KO* qui ne survivent généralement pas dans les macrophages (même dans les macrophages naïfs). Dans ce cas, le *silencing* des TLRs ne peut malheureusement pas renverser leur inéluctable destin (résultats non présentés).

### **1.5 Ligands potentiels de TLR3**

Malgré quelques tentatives, nous n'avons pas pu identifier le ligand de TLR3. Premièrement, le ligand de TLR3 est probablement une molécule conservée chez toutes les espèces de *Leishmania* car le *silencing* de TLR3 diminue la sécrétion de NO et TNF- $\alpha$  par les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  en réponse aux promastigotes de *L. major* et *L. infantum* (Figure S5). À première vue, les glycoconjugués de *Leishmania* représenteraient un PAMP idéal. En effet, ces molécules étant présentes seulement chez ces parasites, exprimées constitutivement et essentielles à la survie des leishmanies, ils répondent très bien à la définition de PAMP. Cependant, il est bien démontré que TLR2 est le PRR responsable de la reconnaissance des sous-unités répétées Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$  des phosphoglycans des leishmanies (Becker *et al.*, 2003, De Veer *et al.*, 2003, Flandin *et al.*, 2006). Étant donné que le LPG est une très grosse molécule, plusieurs domaines différents peuvent théoriquement être reconnus par les TLRs. Par exemple, l'ancre GPI de *P. falciparum* est reconnue principalement par TLR2 mais TLR4 est aussi impliqué (Krishnegowda *et al.*, 2005). Cependant, nos résultats montrent que les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  déclenchent une réponse immunitaire suite à une stimulation par les promastigotes déficients en phosphoglycans (*lpg2-KO*). En plus, la stimulation de macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  par les glycoconjugués (LPG, PG et GIPLs) de *L. donovani* ne cause pas la sécrétion de NO et de TNF- $\alpha$  (Camargo *et al.*, 1997). Donc, ces glycoconjugués ne constituent pas le ligand de TLR3.

Étant donné que TLR3 a été identifié comme un récepteur pour l'ARNdb, soit d'origine virale (Alexopoulou *et al.*, 2001), parasitaire (*S. mansoni*) (Aksoy *et al.*, 2005) ou endogène, via la reconnaissance de structures secondaires dans l'ARNm des cellules nécrotiques (Kariko *et al.*, 2004), nos premières tentatives d'identifier le ligand furent réalisées dans cet objectif. En plus, il a été démontré que *Leishmania*, à cause d'un mécanisme de transcription antisens, possède, à l'état normal, un niveau significatif de structures ARNdb (Kapler et Beverley, 1989, Beverley, 2003). À cette fin, nous avons premièrement stimulé les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  avec l'ARN total isolé des promastigotes WT en phase stationnaire. À la figure S6A, nous voyons que l'ARN purifié de ces parasites n'induit pas la sécrétion de NO. À la figure S6B, on voit que la sécrétion de NO est aussi abondante en réponse aux promastigotes tués à la chaleur qu'aux promastigotes vivants. En plus, une stimulation par le surnageant d'une culture de *L. donovani* en phase stationnaire ne cause pas de sécrétion de NO par les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ . Ainsi, le ligand de TLR3 n'est pas une molécule sécrétée par les leishmanies. Selon la concentration en sels du tampon de la RNaseA, cet enzyme dégrade spécifiquement l'ARNsb (faible concentration en NaCl) ou l'ARNdb (forte concentration en NaCl). Cependant, suite à l'incubation des promastigotes avec cet enzyme dans les deux conditions, aucune différence n'est observée quant à la sécrétion de NO (Figure S6C).

À la fin des années 1980, le groupe du Dr. Patterson a démontré la présence de virus à ARN dans les leishmanies (Widmer *et al.*, 1989). Afin de tester l'hypothèse que TLR3 reconnaît justement les leishmaniovirus présents dans ces parasites, nous avons tenté de détecter la présence d'une activité RNA-polymérase RNA-dépendante, spécifique aux virus à ARN. Cependant, en utilisant la même méthode que Widmer *et al.* (1990), nous ne pouvons pas détecter la présence de cette activité (résultats non-publiés). En plus, jusqu'à présent, aucun groupe n'a démontré la présence de ces leishmaniovirus chez *L. donovani*. Les leishmanies possèdent un autre motif ARNdb pouvant répondre à la définition d'un PAMP, les ARNg couplés au pré-ARNm. Importants dans le phénomène de RNA editing (voir section 1.3), nous avons testé



l'hypothèse que ces structures sont reconnues par TLR3. Même si la stimulation de macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  par l'ARN total extrait des leishmanies ne mène pas à la sécrétion de NO (Figure S6A), il est possible que la méthode d'extraction d'ARN ne permette pas d'obtenir ces ARNg, ceux-ci se retrouvant à l'intérieur des mitochondries. Ainsi, nous avons établi une collaboration avec le Dr Reza Salavati de l'Université McGill (Institut de Parasitologie) qui nous a cordialement fourni le complexe synthétique pré-ARNm-ARNg de la sous-unité 6 de l'ATPase de *T. brucei* (Seiwert *et al.*, 1996). Cependant, la stimulation des macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  par ceux-ci n'induit pas la sécrétion de NO (Figure S7A) ou de TNF- $\alpha$  (Figure S7B). Quoiqu'assez improbable, le complexe pré-ARNm-ARNg de *Leishmania* pourrait être légèrement différent du complexe de *T. brucei* testé, Dr Salavati propose donc de tenter d'isoler ces ARNg des mitochondries de *Leishmania* afin de tester leur effet immunogène.

Certains groupes qualifient les TLRs selon la nature du PAMP reconnu. Par exemple, les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont considérés comme des récepteurs d'acides nucléiques (Akira *et al.*, 2006). Cependant, certaines découvertes récentes laissent présager que les PAMPs reconnus par un TLR peuvent être de différente nature. En effet, TLR9 est caractérisé depuis longtemps pour son rôle dans la reconnaissance de l'ADN hémi-méthylé (ADN CpG), d'où son inclusion dans le groupe des TLRs à acides nucléiques. Cependant, l'hémozoin, un cristal formé par l'agrégation de l'hème suite à la digestion de l'hémoglobine par *P. falciparum*, est aussi reconnue par TLR9 (Coban *et al.*, 2005). Ainsi, les TLRs peuvent reconnaître plusieurs PAMPs différents et, donc, le ligand de TLR3 chez les promastigotes de *Leishmania* n'est pas nécessairement un acide nucléique.

Afin d'identifier le ligand de TLR3, il serait possible de fractionner un extrait des protéines des promastigotes de *L. donovani* en phase stationnaire et ensuite tester le potentiel immunogène de ces différentes fractions. Cette technique a déjà permis de démontrer que *Toxoplasma gondii* possède plusieurs PAMPs reconnus par différents

TLRs (Del Rio *et al.*, 2004). L'utilisation de différents promastigotes mutants serait aussi une bonne méthode pour identifier le ligand de TLR3. Jusqu'à présent, chez *L. donovani*, il n'existe que les mutants LPG décrits dans la revue de littérature. Afin de tester différents PAMPs potentiels, il serait intéressant de générer des mutants KO pour différentes protéines de *Leishmania*, par exemple gp63. Malheureusement, *Leishmania* est un des seuls organismes RNAi-déficients, d'où l'impossibilité d'utiliser cette technique pour générer les différents mutants (Cottrell et Doering, 2003, Robinson et Beverley, 2003). En plus des mutants ciblés, la génération de mutants aléatoires à l'aide de transposons serait, bien sûre longue, mais théoriquement intéressante (Beverley, 2003). Étant donné que les promastigotes procycliques (en phase logarithmique) n'induisent pas la sécrétion de NO et de TNF- $\alpha$  chez les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ , on peut donc présumer qu'ils ne possèdent pas le ligand de TLR3. Par électrophorèse en deux dimensions, il serait possible d'identifier les protéines présentes seulement chez les promastigotes métacycliques. Ainsi, on pourrait obtenir des indices quant à l'identité de ce ligand. Finalement, il est à noter que le ligand de TLR4 chez les leishmanies n'a pas encore été identifié (Kropf *et al.*, 2004a, Kropf *et al.*, 2004b).

## **1.6 Coopération entre les TLRs**

Avec la caractérisation de TLR3 comme PRR pour *Leishmania*, il s'agit du troisième TLR impliqué dans la reconnaissance de ce parasite. Tel que mentionné dans l'introduction, une réponse immunitaire appropriée envers de nombreux microorganismes pathogènes nécessite l'apport de plusieurs récepteurs. D'ailleurs, la stimulation de macrophages par des bactéries complètes mène à la formation d'une réponse immunitaire beaucoup plus complexe que la somme de tous les PAMPs pris séparément (Zarembek et Godowski, 2002, Nau *et al.*, 2003, Bellocchio *et al.*, 2004). Alors que certains microorganismes sont reconnus par plusieurs TLRs agissant en synergie, dans d'autres cas, l'utilisation de ces récepteurs est plutôt séquentielle. Par exemple, la sécrétion de cytokines suite à une stimulation par *T. cruzi*, dépend de la

reconnaissance de l'ADN par TLR9 et de l'ancre GPI d'une glycoprotéine de surface par TLR2, ces deux récepteurs agissant en synergie (Ropert et Gazzinelli, 2004, Bafica *et al.*, 2006). Alternativement, même si TLR2, TLR9 et TLR11 sont impliqués dans la reconnaissance de *P. falciparum*, tous ces récepteurs sont dispensables individuellement pour l'activation des cellules NK par les érythrocytes infectés (Baratin *et al.*, 2005). À l'inverse, suite à une infection par *C. albicans*, TLR2 est responsable de tuer le pathogène fongique alors que la sécrétion de cytokines est TLR4-dépendante (Blasi *et al.*, 2005). Dans le cas de *Leishmania*, certains indices laissent présager une forte collaboration entre TLR2, TLR3 et TLR4. Nous avons en effet démontré que TLR2 et TLR3 sont tous les deux importants pour la sécrétion de TNF- $\alpha$  et de NO par les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  (Becker *et al.*, 2003, De Veer *et al.*, 2003, Flandin *et al.*, 2006). Cependant, dans le contrôle de la parasitémie, TLR3 et TLR4, mais pas TLR2, sont importants (Kropf *et al.*, 2004a, Kropf *et al.*, 2004b, Flandin *et al.*, 2006). Ainsi, on pourrait imaginer une coopération entre TLR2 et TLR3 pour les étapes précoces dans la détection de *Leishmania*, alors qu'une coopération TLR3-TLR4 permettrait d'efficacement résoudre l'infection. Ce modèle expliquerait la présence de TLR2 et TLR3 à la membrane des phagosomes contenant les leishmanies (Figure S3). En effet, TLR2 doit former un hétérodimère, l'homodimérisation des domaines TIR de TLR2 (contrairement à TLR4) n'étant pas suffisante pour la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les macrophages (Ozinsky *et al.*, 2000). En plus, la sécrétion de chimiokines est un évènement assez précoce en réponse à un pathogène et TLR4 n'est pas impliqué dans ce phénomène (Antoniazzi *et al.*, 2004). Afin de mieux étudier la coopération entre les TLRs, il serait intéressant de prochainement utiliser des macrophages provenant de souris KO pour un ou plusieurs TLRs. Récemment, l'équipe du Dr. Trottein a démontré une interaction entre TLR2 et TLR3 dans la reconnaissance de *S. mansoni* par les cellules dendritiques, accréditant ainsi la possibilité de coopération entre ces deux TLRs (F. Trottein, résultats non-publiés).

Malgré quelques tentatives, je n'ai pas réussi à co-immunoprécipiter TLR2 et TLR3 dans les macrophages. Cela ne signifie pas nécessairement qu'il n'y a pas

d'interaction entre ces deux récepteurs. En effet, dans la littérature, les expériences de co-immunoprécipitation fructueuses avec les TLRs furent réalisées dans des systèmes hétérologues surexprimant les TLRs (cellules HEK293, COS) (Ozinsky *et al.*, 2000, Tapping et Tobias, 2003, Nakata *et al.*, 2006). À ma connaissance, aucune immunoprécipitation n'a été réalisée dans des cellules à l'état « normal ».

## **1.7 Rôles des TLRs dans le développement de médicaments**

La découverte des TLRs a fourni de nombreuses possibilités pour le développement de nouveaux médicaments. Théoriquement, l'activation de la voie de signalisation des TLRs permettrait d'éradiquer certains microorganismes pathogènes. À l'inverse, en bloquant cette voie de signalisation, on pourrait traiter les maladies inflammatoires (Hoebe *et al.*, 2006). Concrètement, les TLRs permettent d'expliquer l'effet bénéfique de l'utilisation de l'ADN CpG comme adjuvant dans les différents tests de vaccins anti-*Leishmania*. En effet, ces derniers sont reconnus par TLR9, ce qui permet la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une réponse immunitaire de type Th1 (Flynn *et al.*, 2005, McCluskie et Krieg, 2006, Wu *et al.*, 2006). La crème d'imiquimod, qui permet la résorption plus rapide des symptômes de leishmaniose cutanée, fonctionne aussi selon ce modèle (Buates et Matlashewski, 1999, Arevalo *et al.*, 2001, Miranda-Verastegui *et al.*, 2005). Étant un ligand de TLR7 et TLR8, la crème d'imiquimod, permet, *in vivo*, la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine active les macrophages qui pourront ensuite détruire les parasites. Ainsi, selon notre modèle, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  induit l'expression de TLR3 chez les macrophages. Ceux-ci peuvent donc reconnaître et tuer les leishmanies.

## **1.8 Facteur génétique**

Récemment, la présence de polymorphismes dans les gènes des TLRs a été associée à une plus grande susceptibilité chez certaines personnes, ou groupes de personnes, pour la malaria (Mockenhaupt *et al.*, 2006a, 2006b) ou la tuberculose (Ben-

Ali *et al.*, 2004, Yim *et al.*, 2006). Depuis quelques années, différentes études démontrent la prédisposition de certaines tribus ethniques envers des maladies infectieuses dont la leishmaniose (Bucheton *et al.*, 2002). Étant donné l'importance potentielle des TLRs dans le déclenchement de la réponse immunitaire envers *Leishmania*, il serait intéressant d'explorer la possibilité que des polymorphismes dans ces récepteurs soit associés à une augmentation de la susceptibilité pour la leishmaniose.

## **2. TLR3 est un senseur de l'identité des particules internalisées**

### **2.1 Induction de TLR3 par les promastigotes de *L. donovani***

En réponse à un microorganisme pathogène, le macrophage entreprend un remodelage assez important de son transcriptome. En plus, les gènes régulés positivement suite à la reconnaissance d'un pathogène donne une idée sur l'identité des gènes nécessaires à l'élimination d'un microorganisme. D'ailleurs, l'augmentation de l'expression d'un TLR en réponse à un stimulus est une bonne indication de son rôle dans la reconnaissance de celui-ci (Janssens et Beyaert, 2003b, Jenner et Young, 2005). Afin de comprendre les rôles des différents TLRs en réponse à la forme promastigote de *L. donovani*, nous avons étudié le rôle de ce parasite sur l'expression des différents TLRs et des protéines adaptatrices. Tel que démontré à la figure 1 de l'article II, *L. donovani* induit l'expression de l'ARNm de TLR3. Cependant, on n'observe pas d'effet sur l'expression des autres TLRs et des différentes protéines adaptatrices. Même si TLR2 et TLR4 sont impliqués dans la reconnaissance de *Leishmania*, leur expression n'est pas modulée par une infection (Article II, Figure 1). Il ne s'agit pas de la première fois que la modulation sélective de certains TLRs est observée en réponse à un microorganisme (Zarembek et Godowski, 2002, Chang, J. S. *et al.*, 2006b). Notre observation que l'expression de l'ARNm de TLR2 n'est pas modulée est cependant en contradiction avec Becker *et al.* (2003) qui a démontré l'augmentation de l'expression de TLR2 par le LPG de *L. major* chez les cellules NK. Cependant, Nau *et al.* (2003) a préalablement démontré une modulation différente par une bactérie complète versus un PAMP purifié. Dans le cas de *Leishmania*, la structure du LPG pourrait être légèrement différente entre la forme purifiée et la forme membranaire ancrée aux promastigotes. En ce qui concerne l'ARNm de TLR4, son absence de modulation n'est pas surprenante. En effet, chez les macrophages murins, même une stimulation par le LPS n'augmente pas l'expression de TLR4 (Matsuguchi *et al.*, 2000).

Afin de s'assurer de l'induction de l'ARNm de TLR3, l'expression a été quantifiée par PCR quantitatif (Q-PCR) en collaboration avec l'équipe du Dre Danielle Malo de l'Université McGill. À la figure 2A de l'article II, on voit clairement que l'ARNm de TLR3 est induit par les promastigotes de *L. donovani* WT et *lpg1*-KO ainsi que par le LPS et le poly(I:C) par un facteur de 3,7-, 3,0-, 5,7- et 7,4-fois respectivement. Inversement, le peptidoglycan ne cause pas l'induction de TLR3, ce qui avait préalablement été montré dans la première publication (Article I, Figure 2B). L'observation que les mutants *lpg2*-KO n'induisent pas l'ARNm de TLR3 fut cependant très surprenante. En observant l'expression de TLR3 par immunofluorescence, on peut voir que cette absence d'induction par les promastigotes *lpg2*-KO n'est pas due à une mauvaise infection (Article II, Figure 3D). En effet, en utilisant les promastigotes exprimant constitutivement GFP, on peut s'assurer que les macrophages sont bels et biens infectés.

Par RT-PCR, l'expression des ARNm de TLR2 et TLR4 ne semble pas modulée par les promastigotes WT (Article II, Figure 1). L'expression de l'ARNm de ces TLRs a été mesurée par Q-PCR et, comme prévu, *Leishmania* ne module pas leur expression (résultats non-présentés). Tel que démontré dans la première publication, TLR3 est exprimé dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  (Flandin *et al.*, 2006). Nous avons donc voulu observer l'effet des promastigotes sur l'expression de TLR3 dans ces macrophages. Par RT-PCR, on observe que le niveau d'expression de l'ARNm de TLR3 est similaire dans les cellules stimulées ou non par *L. donovani* (Article II, Figure 2B). Dans les macrophages naïfs, l'induction de l'ARNm de TLR3 survient suite à une stimulation par le parasite complet. En effet, la stimulation de macrophages naïfs par l'ARN, l'ADN ou les protéines totales des promastigotes WT en phase stationnaire n'est pas suffisante pour induire l'ARNm de TLR3 (Article II, Figure 4).

## 2.2 Mécanismes d'induction de TLR3

Afin de mieux étudier le mécanisme d'induction de TLR3 en réponse à *L. donovani*, les macrophages ont été pré-traités avec différents inhibiteurs pharmacologiques avant la stimulation. À la figure 5 de l'article II, on voit qu'en inhibant la PI3k (Ly294002) ou le réarrangement de l'actine (cytochalasin B), *Leishmania* n'induit pas l'expression de l'ARNm de TLR3. Ceci laisse présager que cette induction survient suite à la phagocytose des promastigotes. En stimulant les macrophages par le poly(I:C), un oligonucléotide d'ARNdb ne pénétrant pas la cellule par phagocytose, on observe que l'ARNm de TLR3 est induit même dans ces cellules. Ainsi, on peut présumer que TLR3 est induit suite à l'internalisation des promastigotes.

En général, un TLR augmente sa propre expression, tel que démontré par le rôle de p38 MAPk dans cette auto-régulation (Kammanadiminti *et al.*, 2004, Chang, J. H. *et al.*, 2006a). Ainsi, la région promotrice de plusieurs *TLR* contiennent des sites de liaison NF-kB et Sp1 (Wang *et al.*, 2001, Rehli, 2002). Cependant, dans notre cas, l'inhibition spécifique de p38 MAPk (SB203580) n'a aucun effet sur l'induction de l'ARNm de TLR3. Étant donné que TLR3 n'est pas exprimé dans les macrophages au repos, il aurait été surprenant que cette induction soit causée par un mécanisme d'auto-régulation. En plus, en réponse au LPS, l'expression de TLR1-3 et TLR6-9 est augmentée via l'action de IRF-1 et IRF-2 (Nhu *et al.*, 2006).

### 2.2.1 Induction de TLR3 suite à la phagocytose

Afin d'étudier la spécificité de l'induction de l'ARNm de TLR3, les macrophages ont été stimulés par d'autres particules différentes. L'observation que le zymosan, le zymosan opsonisé au complément et les billes de latex induisent l'expression de l'ARNm de TLR3 (respectivement 5,9-, 9,1- et 4,1-fois) est assez surprenante (Article II, Figure 6). En effet, ce résultat laisse présager que l'ARNm de TLR3 est induit suite à la réaction de phagocytose. Ainsi, l'activation des récepteurs



phagocytiques mène à cette induction. Cependant, on peut présumer que ce n'est pas tous les récepteurs phagocytiques qui induisent TLR3. En effet, les promastigotes de *L. donovani* déficients en phosphoglycans *lpg2-KO* n'induisent pas l'expression de ce récepteur (Article II, Figure 2A) alors que ces parasites opsonisés au complément causent une augmentation de l'expression de ce PRR. Ainsi, il est clair que TLR3 est induit suite à l'activation des CRs. Il a été préalablement démontré que les glycoconjugués des leishmanies peuvent se lier directement aux CRs. Étant donné que les mutants *lpg2-KO* ne possèdent pas ces molécules, ils ne peuvent pas être reconnus par ces récepteurs, expliquant ainsi la différence entre les promastigotes WT et *lpg2-KO*.

Cette induction pourrait permettre aux macrophages de correctement identifier la particule internalisée. Ce rôle de senseur de l'identité est déjà bien établi dans le cas de TLR2. En effet, Underhill *et al.*(1999) a déjà démontré que suite à l'internalisation des particules de zymosan, TLR2 est rapidement recruté à la membrane des phagosomes afin de reconnaître la particule internalisée. En plus, TLR1 et TLR6 sont eux aussi recrutés aux phagosomes suite à l'internalisation des particules. Ainsi, les TLRs présents au phagosome coopèrent afin de discriminer entre les différents pathogènes et déclencher une réponse immunitaire appropriée (Underhill *et al.*, 1999, Ozinsky *et al.*, 2000). Le fait que TLR3 induit suite à la phagocytose soit présent à la membrane des phagosomes contenant les leishmanies est en accord avec cette hypothèse (Article II, Figure 7). En plus, Zarembek et Gadowski (2002) ont démontré que TLR3 est induit suite à la phagocytose des bactéries autant Gram-positives que Gram-négatives. Lors des prochaines expériences, la question de la demi-vie de l'ARNm de TLR3 serait une avenue intéressante à explorer. En effet, il a été démontré que *M. tuberculosis* induit l'expression de l'ARNm de plusieurs TLRs mais TLR1 et TLR6, qui sont impliqués dans la reconnaissance de ce pathogène, sont induits avec une plus grande stabilité que les TLRs non-spécifiques (Chang, J. S. *et al.*, 2006b).

## **2.3 Altération de la fonction de TLR3 par *Leishmania***

Ces résultats laissent cependant entrevoir un léger problème. En effet, dans la première publication, nous avons démontré que TLR3 est présent chez les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  et celui-ci explique la réponse immunitaire observée chez ces cellules (Flandin *et al.*, 2006). Cependant, dans la seconde publication, nous démontrons que ce récepteur est exprimé suite à la phagocytose du promastigote par les macrophages naïfs. Ainsi, il faut se demander pourquoi TLR3 induit par *Leishmania* dans ces cellules ne peut pas reconnaître les promastigotes et déclencher la réponse immunitaire envers ce parasite. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette apparente contradiction.

### **2.3.1 La localisation du récepteur**

La première possibilité étant la localisation du récepteur. Tel qu'expliqué dans la revue de littérature, certains TLRs sont exprimés à la membrane plasmique alors que d'autres TLRs sont localisés à l'intérieur de la cellule. Selon leur localisation, les TLRs peuvent reconnaître différents PAMPs. Par exemple, la localisation intracellulaire de TLR9 permet la reconnaissance de motifs CpG de l'ADN des microorganismes pathogènes alors que son expression à la membrane plasmique permet la reconnaissance par l'ADN de l'hôte (Lamphier *et al.*, 2006, Barton *et al.*, 2006). Inversement, TLR4, qui est normalement exprimé à la membrane plasmique, est retrouvé à l'intérieur de la cellule chez les neuroblastomes NB-1. Ainsi, même si ces cellules possèdent toutes les molécules nécessaires à la reconnaissance du LPS (MD-2, CD14), elles ne répondent pas à ce stimulus (Hassan *et al.*, 2006). Dans le cas de TLR3, celui-ci est rapidement recruté aux endosomes contenant l'ARNdb viral, tel que démontré par sa colocalisation avec EEA1 et LAMP1 (Johnsen *et al.*, 2006). D'ailleurs, suite à une stimulation par le poly(I:C), la transduction du signal via TLR3, contrairement à TLR4, dépend d'un pH acide permettant l'agrégation des récepteurs (Latz *et al.*, 2002, Espevik *et al.*, 2003, De Bouteiller *et al.*, 2005). Cependant, un autre groupe a déjà démontré, dans les fibroblastes, que TLR3 peut aussi bien transduire le signal depuis la membrane

plasmique (Matsumoto *et al.*, 2002). Ainsi, il sera important de prochainement étudier la localisation exacte de TLR3 en réponse à l'IFN- $\gamma$  versus sa localisation lorsque induit suite à la phagocytose des promastigotes de *L. donovani*. En effet, il est possible que le TLR3 induit lors de la phagocytose des particules ne soit pas exprimé au bon endroit pour reconnaître les leishmanies.

### 2.3.2 Altération de la voie de signalisation des TLRs

Étant donné que *Leishmania* a la réputation de saboter les différentes voies de signalisation du macrophage, une autre possibilité pour cette absence de réponse dans les macrophages naïfs serait l'altération de la voie des TLRs par le parasite. Dans la littérature, certaines protéines inhibitrices ont été identifiées, tel que MyD88s (Janssens *et al.*, 2002, Burns *et al.*, 2003). Cependant, les résultats obtenus par RT-PCR nous permettent d'exclure l'induction de cette forme de la protéine (Article II, Figure 1). En effet, les amorces utilisées pour le RT-PCR de MyD88 permet de distinguer les deux formes de cette protéine. En effet, MyD88s est 150 nt plus petit que la forme normale, ce qui se traduit par une différence visible dans la migration du fragment amplifié.

Dans les macrophages naïfs, non seulement IRAK-1 n'est pas activé en réponse à *L. donovani*, on observe une légère désactivation de cette kinase (Article I, Figure 1), laissant présager une action inhibitrice envers la voie de signalisation des TLRs. Ainsi, différentes études démontrent que *Leishmania* induit la phosphotyrosine phosphatase SHP-1 (Olivier *et al.*, 1998, Blanchette *et al.*, 1999, Nandan *et al.*, 2002). Cette phosphatase est bien connue comme inhibitrice de la voie des JAK/STAT, cependant, il a été récemment démontré que celle-ci permet la déphosphorylation d'IRAK-1, empêchant ainsi la transduction du signal par les TLRs (Martin Olivier, communication personnelle). Ce sabotage pourrait expliquer pourquoi les macrophages naïfs, même si TLR3 est induit, ne déclenchent pas de réponse immunitaire envers *Leishmania* : une fois que le macrophage est infecté, le parasite détourne la cellule-hôte à son avantage et il est trop tard pour l'éliminer. D'ailleurs, l'importance dans la

cinétique d'activation des macrophages a aussi été démontré dans le cas des infections par *T. gondii* (Sibley *et al.*, 1991, Shapira *et al.*, 2004). L'induction de protéines inhibitrices pour la voie de signalisation des TLRs est un mécanisme assez répandu chez plusieurs pathogènes, dont les mycobactéries. En effet, comme *Leishmania*, les mycobactéries persistent dans les macrophages et altèrent la réponse immunitaire innée de la cellule-hôte (Portnoy, 2005). Par exemple, *M. tuberculosis* inhibe la voie des TLRs grâce à l'induction rapide d'IRAK-M, bloquant ainsi la transduction du signal (Pathak *et al.*, 2005). En plus, *M. avium* augmente la stabilité de l'ARNm de STAT1 $\beta$ , qui agit comme dominant-négatif de STAT1 $\alpha$  et donc abroge la signalisation via la voie JAK/STAT (Alvarez *et al.*, 2003).

## **CONCLUSION**

Lors de cette étude, nous avons démontré l'importance des TLRs dans la reconnaissance des promastigotes de *L. donovani* et le déclenchement de la réponse immunitaire. Afin d'établir l'infection, les promastigotes de *L. donovani* pénètrent silencieusement dans les macrophages au repos. Au contraire, l'entrée des promastigotes dans les macrophages activés à l'IFN- $\gamma$  cause la sécrétion de NO et de cytokines pro-inflammatoires et, ultimement, la destruction des parasites. Au cours de ce projet de recherche, nous avons pu démontrer que TLR3, étant le seul TLR induit par l'IFN- $\gamma$ , est un joueur primordial pour la réponse immunitaire observée chez ces macrophages. En effet, TLR3, suite à la reconnaissance d'une molécule encore non-identifiée des promastigotes, est important pour la sécrétion de NO et de TNF- $\alpha$  ainsi que pour l'activité leishmanicide des macrophages activés à l'IFN- $\gamma$ . En plus, nos travaux ont permis de valider l'hypothèse que TLR2 reconnaît et permet la sécrétion de NO et de TNF- $\alpha$  en réponse aux sous-unités répétées Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$  des phosphoglycans des promastigotes de *L. donovani*. Nous avons de plus présenté l'importance de ces deux PRRs dans la phagocytose des promastigotes. Comme c'est le cas pour plusieurs microorganismes pathogènes, une forte collaboration entre les TLRs est nécessaire afin d'efficacement résoudre les infections. Étant donné que les rôles de TLR2 et TLR4 dans la reconnaissance des leishmanies sont déjà bien établis, nos résultats démontrent que trois TLRs sont nécessaires au contrôle de ce parasite. Le niveau de coopération entre ces PRRs devra être étudié plus en détail.

Nous avons aussi démontré que, chez les macrophages au repos, TLR3 est induit suite à la liaison à certains récepteurs phagocytiques, dont CR. En plus, l'expression de TLR3 à la membrane des phagosomes suite à l'internalisation de différentes particules permet d'émettre l'hypothèse que TLR3, comme c'est le cas pour TLR2, est un senseur des particules internalisées. Ainsi, TLR3, et TLR2, peuvent être considérés comme des sentinelles du macrophage. Cependant, l'induction de TLR3 suite à la phagocytose des promastigotes de *L. donovani* peut sembler en contradiction avec le rôle de ce PRR dans la réponse immunitaire envers les leishmanies. Ainsi, il est

probable que *Leishmania* altère fortement les voies de signalisation des TLRs afin de survivre et proliférer dans les macrophages.

# REMERCIEMENTS



Au cours de ces nombreuses années de doctorat, plusieurs personnes ont apporté soutien et encouragements nécessaires à la terminaison de mes études. Premièrement, je dois remercier mon directeur de recherche Albert Descoteaux pour le support et la confiance accordés au cours de ces années ainsi que pour l'encadrement nécessaire à la progression de mes travaux. Tes idées et conseils pertinents ont permis de mener mon projet à terme. Étant donné qu'un environnement de travail agréable est garant de bons moments, je tiens à souligner l'amitié et le support fournis par les différents membres du laboratoire au cours de ces cinq années. Depuis environ deux ans, nous sommes grosso modo les mêmes étudiants et nous avons réussi à former une belle équipe. Christelle, Adrien, Tamsir, Robert, PO et François, grâce à vous, les journées passées au laboratoire et les soirées au Dieu du ciel furent très plaisantes. Merci beaucoup à RoRo, mon partenaire de local, ton ardeur au travail, ta détermination et tes connaissances furent très prisées. Bonne chance. Merci CriCri et DriDri, votre arrivée dans la laboratoire en a beaucoup changé la dynamique, votre présence fut toujours (ou presque) enrichissante. Merci Franky Love pour les discussions pertinentes et les courriels impertinents. Merci à PoPo, mon partenaire de dock, tes nombreux commentaires ont permis de détendre l'atmosphère. Jërëjër à TamTam, ta joie de vivre et ta vision africaine de la vie furent appréciées. En espérant qu'on puisse prochainement partager un bon yassa dans les rues de Dakar !!

Ayant passé de nombreuses années dans le labo, j'ai pu faire la connaissance de plusieurs personnes, étudiants et stagiaires, dont l'apport fut fort agréable. Particulièrement John (pour ta joie de vivre), Frédo et Mel (pour votre expérience et vos conseils), Fred (pour nos conversations sur la politique et la randonnée pédestre), Sil (bonne chance avec ton bébé) et Nath (ce fut court mais agréable). Passer toutes mes journées à Laval aurait été plus difficile sans vous : Maria, Julie et Mélanie, François, Pascale, Hélène et Nicolas. Merci ! Au cours de ce projet, j'ai de nombreuses fois dû passer des journées complètes au microscope, donc merci Marcel pour ton expertise et les nombreuses discussions devant le microscope confocal. Je tiens aussi à remercier le CHPI pour les travel awards qui m'ont permis d'assister à plusieurs congrès.

Pour continuer dans le domaine scientifique, je dois aussi souligner l'importance de mes copains de l'U de M. Sans vous, ma maîtrise aurait été ennuyante et je n'aurais pas continué au doc. Merci Manuela, Hélène, Dimitri, Loubna, François, Éric, Charles, Ihmad, Jean-François, Karine et George.

Où serais-je sans l'amour et le support inconditionnel de ma famille ? Chose certaine, je ne serais pas en train de terminer la rédaction de ma thèse ! Mes parents Claire et Robert m'ont toujours soutenu au cours de ces très (trop ?) longues années d'étude. Autant du point de vue affectif, personnel ou financier, leur soutien fut indéfectible. Merci beaucoup à vous. Ma famille n'est pas très nombreuse mais je me dois de remercier Jacques, Henriette et François, Colette, Ingomar et Armin, et Simone, sans oublier ma belle-mère Gisèle et Pierre. Bien sûr, j'ai une pensée particulière pour mon associé de toujours Gérard et ma chère tante Claudie. Même si le majestueux Iton coule physiquement loin d'ici, il occupera toujours une place importante pour moi.

Un grand merci aux deux Julie, nos nombreuses soirées furent toujours agréables et appréciées ! La dernière mais non la moindre dans cette liste : ma petite chouette adorée. Sans ma chère Karine, je n'ose imaginer où je serais. L'amour et le soutien fournis tout au long de ces années m'ont grandement aidé, et je suis sûr que tous nos projets futurs se réaliseront et seront très, très agréables.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Aderem, A. et Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu Rev Immunol* 17 593-623.

Aga, E., Katschinski, D.M., Van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W. et Laskay, T. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*, *J Immunol* 169 (2), 898-905.

Agnese, D.M., Calvano, J.E., Hahm, S.J., Coyle, S.M., Corbett, S.A., Calvano, S.E. et Lowry, S.F. (2002) Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections, *J Infect Dis* 186 (10), 1522-5.

Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M. et Wagner, H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments, *Eur J Immunol* 32 (7), 1958-68.

Akira, S., Uematsu, S. et Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity, *Cell* 124 (4), 783-801.

Aksoy, E., Zouain, C.S., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M., Capron, M., Ryffel, B. et Trottein, F. (2005) Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells, *J Biol Chem* 280 (1), 277-83.

Alexander, J. et Russell, D.G. (1992) The interaction of *Leishmania* species with macrophages, *Adv Parasitol* 31 175-254.

Alexander, W.S. et Hilton, D.J. (2004) The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response, *Annu Rev Immunol* 22 503-29.

Alexander, W.S., Starr, R., Fenner, J.E., Scott, C.L., Handman, E., Sprigg, N.S., Corbin, J.E., Cornish, A.L., Darwiche, R., Owczarek, C.M., Kay, T.W., Nicola, N.A., Hertzog, P.J., Metcalf, D. et Hilton, D.J. (1999) SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine, *Cell* 98 (5), 597-608.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. et Flavell, R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, *Nature* 413 (6857), 732-8.

Allavena, P., Chieppa, M., Monti, P. et Piemonti, L. (2004) From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor, *Crit Rev Immunol* 24 (3), 179-92.

Alvarez, G.R., Zwillig, B.S. et Lafuse, W.P. (2003) *Mycobacterium avium* inhibition of IFN-gamma signaling in mouse macrophages: Toll-like receptor 2 stimulation increases expression of dominant-negative STAT1 beta by mRNA stabilization, *J Immunol* 171 (12), 6766-73.

Amela, C., Lopez-Gay, D., Alberdi, J.C. et Castilla, J. (1996) Injecting drug use as risk factor for visceral leishmaniasis in AIDS patients, *Eur J Epidemiol* 12 (1), 91-2.

Anderson, K.V., Jurgens, G. et Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product, *Cell* 42 (3), 779-89.

Antoine, J.C., Prina, E., Jouanne, C. et Bongrand, P. (1990) Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH, *Infect Immun* 58 (3), 779-87.

Antoniazzi, S., Price, H.P., Kropf, P., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Smith, D.F. et Muller, I. (2004) Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*, *Infect Immun* 72 (9), 5168-74.

Arevalo, I., Ward, B., Miller, R., Meng, T.C., Najar, E., Alvarez, E., Matlashewski, G. et Llanos-Cuentas, A. (2001) Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator, *Clin Infect Dis* 33 (11), 1847-51.

Awasthi, A., Mathur, R., Khan, A., Joshi, B.N., Jain, N., Sawant, S., Boppana, R., Mitra, D. et Saha, B. (2003) CD40 signaling is impaired in *L. major*-infected macrophages and is rescued by a p38MAPK activator establishing a host-protective memory T cell response, *J Exp Med* 197 (8), 1037-43.

Babior, B.M. (1999) NADPH oxidase: an update, *Blood* 93 (5), 1464-76.

Baeuerle, P.A. et Baltimore, D. (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor, *Science* 242 (4878), 540-6.

Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T. et Sher, A. (2006) Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection, *J Immunol* 177 (6), 3515-9.

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

Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N. et Zilberstein, D. (2005) Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response, *Mol Biochem Parasitol* 141 (1), 99-108.

Baratin, M., Roetynck, S., Lepolard, C., Falk, C., Sawadogo, S., Uematsu, S., Akira, S., Ryffel, B., Tiraby, J.G., Alexopoulou, L., Kirschning, C.J., Gysin, J., Vivier, E. et Ugolini, S. (2005) Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (41), 14747-52.

Barsoum, R.S. (2004) Parasitic infections in organ transplantation, *Exp Clin Transplant* 2 (2), 258-67.

Barton, G.M., Kagan, J.C. et Medzhitov, R. (2006) Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA, *Nat Immunol* 7 (1), 49-56.

Barton, G.M. et Medzhitov, R. (2003) Linking Toll-like receptors to IFN-alpha/beta expression, *Nat Immunol* 4 (5), 432-3.

Batada, N.N., Shepp, L.A. et Siegmund, D.O. (2004) Stochastic model of protein-protein interactions: Why signaling proteins need to be colocalized, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (17), 6445-9.

Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., Gonzalez, A., Maldonado, C. et Isibasi, A. (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2, *Mol Biochem Parasitol* 130 (2), 65-74.

Becker, T., Volchuk, A. et Rothman, J.E. (2005) Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (11), 4022-6.

Belkaid, Y., Butcher, B. et Sacks, D.L. (1998a) Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells, *Eur J Immunol* 28 (4), 1389-400.

Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J. et Sacks, D.L. (1998b) Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis, *J Exp Med* 188 (10), 1941-53.

Bell, J.K., Askins, J., Hall, P.R., Davies, D.R. et Segal, D.M. (2006) The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (23), 8792-7.

Bell, J.K., Botos, I., Hall, P.R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D.M. et Davies, D.R. (2005) The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (31), 10976-80.

Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R. et Segal, D.M. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors, *Trends Immunol* 24 (10), 528-33.

Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S.S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S.M. et Romani, L. (2004) The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*, *J Immunol* 172 (5), 3059-69.

Ben-Ali, M., Barbouche, M.R., Bousnina, S., Chabbou, A. et Dellagi, K. (2004) Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients, *Clin Diagn Lab Immunol* 11 (3), 625-6.



- Benne, R., Van Den Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H. et Tromp, M.C. (1986) Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA, *Cell* 46 (6), 819-26.
- Berman, J. (2006) Visceral leishmaniasis in the New World & Africa, *Indian J Med Res* 123 (3), 289-94.
- Bern, C., Joshi, A.B., Jha, S.N., Das, M.L., Hightower, A., Thakur, G.D. et Bista, M.B. (2000) Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective, *Am J Trop Med Hyg* 63 (3-4), 184-8.
- Bertholet, S., Dickensheets, H.L., Sheikh, F., Gam, A.A., Donnelly, R.P. et Kenney, R.T. (2003) *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation, *Infect Immun* 71 (4), 2095-101.
- Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview, *Mol Immunol* 40 (12), 845-59.
- Beverley, S.M. (2003) Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age, *Nat Rev Genet* 4 (1), 11-9.
- Beverley, S.M. et Turco, S.J. (1998) Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*, *Trends Microbiol* 6 (1), 35-40.
- Bhat, G.J., Koslowsky, D.J., Feagin, J.E., Smiley, B.L. et Stuart, K. (1990) An extensively edited mitochondrial transcript in kinetoplastids encodes a protein homologous to ATPase subunit 6, *Cell* 61 (5), 885-94.

Bhattacharya, S.K., Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Junge, K., Karbwang, J., Bryceson, A.D. et Berman, J.D. (2004) Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India, *Clin Infect Dis* 38 (2), 217-21.

Bihl, F., Salez, L., Beaubier, M., Torres, D., Lariviere, L., Laroche, L., Benedetto, A., Martel, D., Lapointe, J.M., Ryffel, B. et Malo, D. (2003) Overexpression of Toll-like receptor 4 amplifies the host response to lipopolysaccharide and provides a survival advantage in transgenic mice, *J Immunol* 170 (12), 6141-50.

Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K.A. and Olivier, M. (1999) *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation, *Eur J Immunol* 29 (11), 3737-44.

Blasi, E., Mucci, A., Neglia, R., Pezzini, F., Colombari, B., Radzioch, D., Cossarizza, A., Lugli, E., Volpini, G., Del Giudice, G. et Peppoloni, S. (2005) Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*, *FEMS Immunol Med Microbiol* 44 (1), 69-79.

Blobe, G.C., Stribling, S., Obeid, L.M. et Hannun, Y.A. (1996) Protein kinase C isoenzymes: regulation and function, *Cancer Surv* 27 213-48.

Blos, M., Schleicher, U., Soares Rocha, F.J., Meissner, U., Rollinghoff, M. et Bogdan, C. (2003) Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase, *Eur J Immunol* 33 (5), 1224-34.

Blum, B., Bakalara, N. et Simpson, L. (1990) A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information, *Cell* 60 (2), 189-98.

Blum, B. et Simpson, L. (1990) Guide RNAs in kinetoplastid mitochondria have a nonencoded 3' oligo(U) tail involved in recognition of the preedited region, *Cell* 62 (2), 391-7.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. et Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma, *Ann Rev Immunol* 15, 749-95.

Boehmer, E.D., Meehan, M.J., Cutro, B.T. et Kovacs, E.J. (2005) Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway, *Mech Ageing Dev* 126 (12), 1305-13.

Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., McNally, E., Pickart, C. et Ma, A. (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses, *Nat Immunol* 5 (10), 1052-60.

Borovsky, D. et Schlein, Y. (1987) Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence, *Med Vet Entomol* 1 (3), 235-42.

Brennan, C.A. et Anderson, K.V. (2004) *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response, *Annu Rev Immunol* 22 457-83.

Brint, E.K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., Mckenzie, A.N., O'Neill, L.A. et Liew, F.Y. (2004) ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance, *Nat Immunol* 5 (4), 373-9.

Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P. and Mosser, D.M. (1995) Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis, *J Immunol* 155 (6), 3102-11.

Brittingham, A. et Mosser, D.M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes, *Parasitol Today* 12 (11), 444-7.

Buates, S. et Matlashewski, G. (1999) Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action, *J Infect Dis* 179 (6), 1485-94.

Buates, S. et Matlashewski, G. (2001) General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection, *J Immunol* 166 (5), 3416-22.

Bucheton, B., Kheir, M.M., El-Safi, S.H., Hammad, A., Mergani, A., Mary, C., Abel, L. et Dessein, A. (2002) The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan, *Microbes Infect* 4 (14), 1449-57.

Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R. et Tschopp, J. (2003) Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4, *J Exp Med* 197 (2), 263-8.

Camargo, M.M., Andrade, A.C., Almeida, I.C., Travassos, L.R. et Gazzinelli, R.T. (1997) Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages, *J Immunol* 159 (12), 6131-9.

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. et Goeddel, D.V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1, *Nature* 383 (6599), 443-6.

Carrera, L., Gazzinelli, R.T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R. et Sacks, D.L. (1996) *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice, *J Exp Med* 183 (2), 515-26.

Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P.N. et Bowie, A.G. (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling, *Nat Immunol* 7 (10), 1074-81.

Castellano, F., Chavrier, P. et Caron, E. (2001) Actin dynamics during phagocytosis, *Semin Immunol* 13 (6), 347-55.

Chakraborty, P., Ghosh, D. et Basu, M.K. (2001) Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes, *J Parasitol* 87 (5), 1023-7.

Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nunez, G. et Inohara, N. (2003) An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid, *Nat Immunol* 4 (7), 702-7.

Chang, J.H., Park, J.Y. et Kim, S.K. (2006a) Dependence on p38 MAPK signalling in the up-regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis*-treated HeLa cells, *Immunology* 118 (2), 164-70.

Chang, J.S., Huggett, J.F., Dheda, K., Kim, L.U., Zumla, A. et Rook, G.A. (2006b) *Mycobacterium tuberculosis* induces selective up-regulation of TLRs in the mononuclear leukocytes of patients with active pulmonary tuberculosis, *J Immunol* 176 (5), 3010-8.

Chatelain, R., Varkila, K. et Coffman, R.L. (1992) IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice, *J Immunol* 148 (4), 1182-7.

Chaudhuri, G. et Chang, K.P. (1988) Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes, *Mol Biochem Parasitol* 27 (1), 43-52.

Choe, J., Kelker, M.S. et Wilson, I.A. (2005) Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain, *Science* 309 (5734), 581-5.

Chuang, T.H. et Ulevitch, R.J. (2004) Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors, *Nat Immunol* 5 (5), 495-502.

Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H. et Wu, H. (2002) All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction, *J Cell Sci* 115 (Pt 4), 679-88.

Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T. et Akira, S. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin, *J Exp Med* 201 (1), 19-25.

Cook, D.N., Pisetsky, D.S. et Schwartz, D.A. (2004) Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease, *Nat Immunol* 5 (10), 975-9.

Cooper, E.L., Kauschke, E. et Cossarizza, A. (2002) Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff, *Bioessays* 24 (4), 319-33.

Cottrell, T.R. et Doering, T.L. (2003) Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens, *Trends Microbiol* 11 (1), 37-43.

Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J. et Greenberg, S. (2000) A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2), 680-5.

Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G. et Greenberg, S. (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension, *J Biol Chem* 274 (3), 1240-7.

Creagh, E.M. et O'Neill, L.A. (2006) TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity, *Trends Immunol* 27 (8), 352-7.

Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavate, C., Desjeux, P. et Alvar, J. (2006) *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade, *Indian J Med Res* 123 (3), 357-88.

Da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S. et Ulevitch, R.J. (2001) Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2, *J Biol Chem* 276 (24), 21129-35.

Da Silva, R.P., Hall, B.F., Joiner, K.A. et Sacks, D.L. (1989) CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages, *J Immunol* 143 (2), 617-22.

Dalpke, A.H., Opper, S., Zimmermann, S. et Heeg, K. (2001) Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs, *J Immunol* 166 (12), 7082-9.

Daneshvar, H., Coombs, G.H., Hagan, P. et Phillips, R.S. (2003) *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines, *J Infect Dis* 187 (10), 1662-8.

Davies, C.R., Cooper, A.M., Peacock, C., Lane, R.P. et Blackwell, J.M. (1990) Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*, *Parasitology* 101 Pt 3 337-43.

Davies, C.R., Kaye, P., Croft, S.L. et Sundar, S. (2003) Leishmaniasis: new approaches to disease control, *Bmj* 326 (7385), 377-82.

De Almeida, M.C. (2002) Infective inoculum for *Leishmania*, *Trends Parasitol* 18 (4), 154-5.

De Almeida, M.C., Vilhena, V., Barral, A. et Barral-Netto, M. (2003) Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (7), 861-70.

De Bouteiller, O., Merck, E., Hasan, U.A., Hubac, S., Benguigui, B., Trinchieri, G., Bates, E.E. et Caux, C. (2005) Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH, *J Biol Chem* 280 (46), 38133-45.

De Veer, M.J., Curtis, J.M., Baldwin, T.M., Didonato, J.A., Sexton, A., McConville, M.J., Handman, E. et Schofield, L. (2003) MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling, *Eur J Immunol* 33 (10), 2822-31.



Del Rio, L., Butcher, B.A., Bennouna, S., Hieny, S., Sher, A. et Denkers, E.Y. (2004) *Toxoplasma gondii* triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors, *J Immunol* 172 (11), 6954-60.

Delbridge, L.M. et O'Riordan, M.X.D. (2006) Innate recognition of intracellular bacteria, *Curr Opin Immunol* 19, DOI 10.1016/j.coi.2006.11.005.

Deleo, F.R., Allen, L.A., Apicella, M. et Nauseef, W.M. (1999) NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis, *J Immunol* 163 (12), 6732-40.

Dermine, J.F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G. et Desjardins, M. (2001) Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes, *J Biol Chem* 276 (21), 18507-12.

Dermine, J.F., Goyette, G., Houde, M., Turco, S.J. et Desjardins, M. (2005) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages, *Cell Microbiol* 7 (9), 1263-70.

Dermine, J.F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. et Desjardins, M. (2000) *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis, *Cell Microbiol* 2 (2), 115-26.

Descoteaux, A., Avila, H.A., Zhang, K., Turco, S.J. et Beverley, S.M. (2002) *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability, *Embo J* 21 (17), 4458-69.

Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S.J. et Beverley, S.M. (1995) A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*, *Science* 269 (5232), 1869-72.

Descoteaux, A. et Matlashewski, G. (1989) c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages, *Mol Cell Biol* 9 (11), 5223-7.

Descoteaux, A., Mengeling, B.J., Beverley, S.M. et Turco, S.J. (1998) *Leishmania donovani* has distinct mannosylphosphoryltransferases for the initiation and elongation phases of lipophosphoglycan repeating unit biosynthesis, *Mol Biochem Parasitol* 94 (1), 27-40.

Descoteaux, A. et Turco, S.J. (2002) Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection, *Microbes Infect* 4 (9), 975-81.

Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis, *Trends Cell Biol* 5 (5), 183-6.

Desjardins, M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions, *Nat Rev Immunol* 3 (4), 280-91.

Desjardins, M. et Descoteaux, A. (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan, *J Exp Med* 185 (12), 2061-8.

Desjardins, M., Houde, M. et Gagnon, E. (2005) Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity, *Immunol Rev* 207 158-65.

Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. et Griffiths, G. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus, *J Cell Biol* 124 (5), 677-88.

Diefenbach, A., Schindler, H., Donhauser, N., Lorenz, E., Laskay, T., MacMicking, J., Rollinghoff, M., Gresser, I. et Bogdan, C. (1998) Type 1 interferon (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) and

type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite, *Immunity* 8 (1), 77-87.

Dobson, D.E., Mengeling, B.J., Cilmi, S., Hickerson, S., Turco, S.J. et Beverley, S.M. (2003a) Identification of genes encoding arabinosyltransferases (SCA) mediating developmental modifications of lipophosphoglycan required for sand fly transmission of *Leishmania major*, *J Biol Chem* 278 (31), 28840-8.

Dobson, D.E., Scholtes, L.D., Myler, P.J., Turco, S.J. et Beverley, S.M. (2006) Genomic organization and expression of the expanded SCG/L/R gene family of *Leishmania major*: internal clusters and telomeric localization of SCGs mediating species-specific LPG modifications, *Mol Biochem Parasitol* 146 (2), 231-41.

Dobson, D.E., Scholtes, L.D., Valdez, K.E., Sullivan, D.R., Mengeling, B.J., Cilmi, S., Turco, S.J. et Beverley, S.M. (2003b) Functional identification of galactosyltransferases (SCGs) required for species-specific modifications of the lipophosphoglycan adhesin controlling *Leishmania major*-sand fly interactions, *J Biol Chem* 278 (18), 15523-31.

Donovan, C. (1903) Memoranda: on the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India, *British Med J*, July 11, 79.

Doyle, S.E., O'Connell, R.M., Miranda, G.A., Vaidya, S.A., Chow, E.K., Liu, P.T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R.L., Yeh, W.C., Lane, T.F. et Cheng, G. (2004) Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38, *J Exp Med* 199 (1), 81-90.

Doyle, S.L. et O'Neill, L.A. (2006) Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity, *Biochem Pharmacol* 72 (9), 1102-13.

Duclos, S. et Desjardins, M. (2000) Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens, *Cell Microbiol* 2 (5), 365-77.

Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H. et Desjardins, M. (2000) Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages, *J Cell Sci* 113 Pt 19 3531-41.

Dujardin, J.C. (2006) Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring?, *Trends Parasitol* 22 (1), 4-6.

Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. et Sharp, P.A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (6), 457-67.

Edelmann, K.H., Richardson-Burns, S., Alexopoulou, L., Tyler, K.L., Flavell, R.A. et Oldstone, M.B. (2004) Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections?, *Virology* 322 (2), 231-8.

Edelson, B.T. et Unanue, E.R. (2002) MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity, *J Immunol* 169 (7), 3869-75.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K. et Tuschl, T. (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs, *Methods* 26 (2), 199-213.

Ellis, S.L., Shakarian, A.M. et Dwyer, D.M. (1998) *Leishmania*: amastigotes synthesize conserved secretory acid phosphatases during human infection, *Exp Parasitol* 89 (2), 161-8.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D.C., Haas, B.J., Tran, A.N., Wortman, J.R., Alsmark, U.C., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J.M., Cerqueira, G.C., Creasy, T., Delcher, A.L., Djikeng, A., Embley, T.M., Hauser, C., Ivens, A.C., Kummerfeld, S.K., Pereira-Leal, J.B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S.L., Shallom, J., Silva, J.C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S.E., Donelson, J.E., Andersson, B., Stuart, K.D. et Hall, N. (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa, *Science* 309 (5733), 404-9.

Espevik, T., Latz, E., Lien, E., Monks, B. et Golenbock, D.T. (2003) Cell distributions and functions of Toll-like receptor 4 studied by fluorescent gene constructs, *Scand J Infect Dis* 35 (9), 660-4.

Estevez, A.M. et Simpson, L. (1999) Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria--a review, *Gene* 240 (2), 247-60.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. et Henson, P.M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells, *Nature* 405 (6782), 85-90.

Fajardo, M., Schleicher, M., Noegel, A., Bozzaro, S., Killinger, S., Heuner, K., Hacker, J. et Steinert, M. (2004) Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, *Microbiology* 150 (Pt 9), 2825-35.

Feagin, J.E. et Stuart, K. (1988) Developmental aspects of uridine addition within mitochondrial transcripts of *Trypanosoma brucei*, *Mol Cell Biol* 8 (3), 1259-65.

Fearon, D. T. (1998) The complement system and adaptive immunity, *Semin Immunol* 10 (5), 355-61.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. et Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391 (6669), 806-11.

Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M. et Maniatis, T. (2003a) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway, *Nat Immunol* 4 (5), 491-6.

Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith, D.E., Sims, J.E., Bird, T.A. et O'Neill, L.A. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction, *Nature* 413 (6851), 78-83.

Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M. et Golenbock, D.T. (2003b) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF, *J Exp Med* 198 (7), 1043-55.

Flandin, J.F., Chano, F. et Descoteaux, A. (2006) RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages, *Eur J Immunol* 36 (2), 411-20.

Flynn, B., Wang, V., Sacks, D.L., Seder, R.A. et Verthelyi, D. (2005) Prevention and treatment of cutaneous leishmaniasis in primates by using synthetic type D/A oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs, *Infect Immun* 73 (8), 4948-54.

Forget, G., Gregory, D.J. et Olivier, M. (2005a) Proteasome-mediated degradation of STAT1 $\alpha$  following infection of macrophages with *Leishmania donovani*, *J Biol Chem* 280 (34), 30542-9.

Forget, G., Gregory, D.J., Whitcombe, L.A. et Olivier, M. (2006) Role of Host Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-Induced Inhibition of Nitric Oxide Production, *Infect Immun* 74 (11), 6272-9.

Forget, G., Matte, C., Siminovitch, K.A., Rivest, S., Pouliot, P. et Olivier, M. (2005b) Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1, *Eur J Immunol* 35 (6), 1906-17.

Forget, G., Siminovitch, K.A., Brochu, S., Rivest, S., Radzioch, D. et Olivier, M. (2001) Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis, *Eur J Immunol* 31 (11), 3185-96.

Frommel, T.O., Button, L.L., Fujikura, Y. and McMaster, W.R. (1990) The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*, *Mol Biochem Parasitol* 38 (1), 25-32.

Gagnon, E., Bergeron, J.J. et Desjardins, M. (2005) ER-mediated phagocytosis: myth or reality?, *J Leukoc Biol* 77 (6), 843-5.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J. et Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages, *Cell* 110 (1), 119-31.

Gantt, K.R., Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, S.M., Nascimento, E.T., Goldman, T.L., Recker, T.J., Miller, M.A. et Wilson, M.E. (2003) Activation of TGF-

beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages, *J Immunol* 170 (5), 2613-20.

Garcia-Garcia, E. et Rosales, C. (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis, *J Leukoc Biol* 72 (6), 1092-108.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. et Desjardins, M. (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions, *J Cell Biol* 152 (1), 165-80.

Gay, N.J., Gangloff, M. et Weber, A.N. (2006) Toll-like receptors as molecular switches, *Nat Rev Immunol* 6 (9), 693-8.

Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J.M. et Hoffmann, J.A. (2001) *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis, *Dev Cell* 1 (4), 503-14.

Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J. et Madara, J.L. (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression, *J Immunol* 167 (4), 1882-5.

Giorgione, J.R., Turco, S.J. et Epanand, R.M. (1996) Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (21), 11634-9.

Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A.J., Distefano, P.S., Bertin, J., Sansonetti, P.J. et Philpott, D.J. (2003a) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan, *Science* 300 (5625), 1584-7.



Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J. et Sansonetti, P.J. (2003b) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection, *J Biol Chem* 278 (11), 8869-72.

Gon, Y., Asai, Y., Hashimoto, S., Mizumura, K., Jibiki, I., Machino, T., Ra, C. et Horie, T. (2004) A20 inhibits toll-like receptor 2- and 4-mediated interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 31 (3), 330-6.

Gorak, P.M., Engwerda, C.R. et Kaye, P.M. (1998) Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection, *Eur J Immunol* 28 (2), 687-95.

Gorelik, L., Constant, S. et Flavell, R.A. (2002) Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation, *J Exp Med* 195 (11), 1499-505.

Gotthardt, D., Warnatz, H.J., Henschel, O., Bruckert, F., Schleicher, M. et Soldati, T. (2002) High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases, *Mol Biol Cell* 13 (10), 3508-20.

Greenberg, S. et Grinstein, S. (2002) Phagocytosis and innate immunity, *Curr Opin Immunol* 14 (1), 136-45.

Greis, K.D., Turco, S.J., Thomas, J.R., McConville, M.J., Homans, S.W. et Ferguson, M.A. (1992) Purification and characterization of an extracellular phosphoglycan from *Leishmania donovani*, *J Biol Chem* 267 (9), 5876-81.

Guerin, P.J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S.L., Desjeux, P., Wasunna, M.K. et Bryceson, A.D. (2002) Visceral leishmaniasis: current status of control,

diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda, *Lancet Infect Dis* 2 (8), 494-501.

Guermouprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. et Amigorena, S. (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells, *Nature* 425 (6956), 397-402.

Gumy, A., Louis, J.A. et Launois, P. (2004) The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds, *Int J Parasitol* 34 (4), 433-44.

Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Sjolín, C., Schreiber, A.D., Trimble, W.S. et Grinstein, S. (1998) v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (20), 11691-6.

Han, J. et Ulevitch, R.J. (2005) Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity, *Nat Immunol* 6 (12), 1198-205.

Hassan, F., Islam, S., Tumorhuu, G., Naiki, Y., Koide, N., Mori, I., Yoshida, T. et Yokochi, T. (2006) Intracellular expression of toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide, *BMC Cancer* 6 (1), 281.

Hatsuzawa, K., Tamura, T., Hashimoto, H., Yokoya, S., Miura, M., Nagaya, H. et Wada, I. (2006) Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis, *Mol Biol Cell* 17 (9), 3964-77.

Hatzigeorgiou, D.E., Geng, J., Zhu, B., Zhang, Y., Liu, K., Rom, W.N., Fenton, M.J., Turco, S.J. et Ho, J.L. (1996) Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-

induced interleukin 1 beta gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (25), 14708-13.

Hawn, T.R., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Buckner, F.S., Akira, S. et Aderem, A. (2002) *Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway, *Microbes Infect* 4 (8), 763-71.

Hawn, T.R., Verbon, A., Lettinga, K.D., Zhao, L.P., Li, S.S., Laws, R.J., Skerrett, S.J., Beutler, B., Schroeder, L., Nachman, A., Ozinsky, A., Smith, K.D. et Aderem, A. (2003) A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease, *J Exp Med* 198 (10), 1563-72.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. et Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5, *Nature* 410 (6832), 1099-103.

Heale, J.P. et Speert, D.P. (2002) Macrophages in bacterial infection. In B. Burke and C.E. Lewis (Ed.) *The macrophage, second edition*. Oxford University Press, Oxford, UK, p. 210-52.

Heinz, S., Haehnel, V., Karaghiosoff, M., Schwarzfischer, L., Muller, M., Krause, S.W. et Rehli, M. (2003) Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice, *J Biol Chem* 278 (24), 21502-9.

Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L. et Locksley, R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets, *J Exp Med* 169 (1), 59-72.

Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E. et Gately, M.K. (1993) Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*, *J Exp Med* 177 (5), 1505-9.

Henry, R.M., Hoppe, A.D., Joshi, N. et Swanson, J.A. (2004) The uniformity of phagosome maturation in macrophages, *J Cell Biol* 164 (2), 185-94.

Hertzog, P.J., O'Neill, L.A. et Hamilton, J.A. (2003) The interferon in TLR signaling: more than just antiviral, *Trends Immunol* 24 (10), 534-9.

Herwaldt, B.L. (1999) Leishmaniasis, *Lancet* 354 (9185), 1191-9.

Heyman, B., Wiersma, E.J. et Kinoshita, T. (1990) *In vivo* inhibition of the antibody response by a complement receptor-specific monoclonal antibody, *J Exp Med* 172 (2), 665-8.

Hoebe, K., Jiang, Z., Georgel, P., Tabet, K., Janssen, E., Du, X. et Beutler, B. (2006) TLR signaling pathways: opportunities for activation and blockade in pursuit of therapy, *Curr Pharm Des* 12 (32), 4123-34.

Holm, A., Tejle, K., Gunnarsson, T., Magnusson, K.E., Descoteaux, A. et Rasmusson, B. (2003) Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 302 (4), 653-8.

Holm, A., Tejle, K., Magnusson, K.E., Descoteaux, A. et Rasmusson, B. (2001) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKCalpha and defective phagosome maturation, *Cell Microbiol* 3 (7), 439-47.

Honda, K. et Taniguchi, T. (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors, *Nat Rev Immunol* 6 (9), 644-58.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. et Taniguchi, T. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses, *Nature* 434 (7034), 772-7.

Hornig, T., Barton, G.M. et Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway, *Nat Immunol* 2 (9), 835-41.

Horwitz, M.A. (1984) Phagocytosis of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: Engulfment within a pseudopod coil, *Cell* 36 (1), 27-33.

Hossain, H., Tchatalbachev, S. et Chakraborty, T. (2006) Host gene expression profiling in pathogen-host interactions, *Curr Opin Immunol* 18 (6), 422-9.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D. et Desjardins, M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation, *Nature* 425 (6956), 402-6.

Hultmark, D. (1994) Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family, *Biochem Biophys Res Commun* 199 (1), 144-6.

Huppi, K., Martin, S.E. et Caplen, N.J. (2005) Defining and assaying RNAi in mammalian cells, *Mol Cell* 17 (1), 1-10.

Igo, R.P., Jr., Lawson, S.D. et Stuart, K. (2002a) RNA sequence and base pairing effects on insertion editing in *Trypanosoma brucei*, *Mol Cell Biol* 22 (5), 1567-76.

Igo, R.P., Jr., Weston, D.S., Ernst, N.L., Panigrahi, A.K., Salavati, R. et Stuart, K. (2002b) Role of uridylate-specific exoribonuclease activity in *Trypanosoma brucei* RNA editing, *Eukaryot Cell* 1 (1), 112-8.

Ihle, J.N. et Kerr, I.M. (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily, *Trends Genet* 11 (2), 69-74.

Ilg, T. (2000) Proteophosphoglycans of *Leishmania*, *Parasitol Today* 16 (11), 489-97.

Ilg, T., Montgomery, J., Stierhof, Y.D. et Handman, E. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, *ppg1*, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor, *J Biol Chem* 274 (44), 31410-20.

Ilg, T., Overath, P., Ferguson, M.A., Rutherford, T., Campbell, D.G. et McConville, M.J. (1994) O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans, *J Biol Chem* 269 (39), 24073-81.

Inohara, N. et Nunez, G. (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis, *Nat Rev Immunol* 3 (5), 371-82.

Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L. et Nunez, G. (2003) Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease, *J Biol Chem* 278 (8), 5509-12.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K.,

Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasc, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B. et Myler, P.J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*, *Science* 309 (5733), 436-42.

Janeway, C.A., Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 (Pt 1), 1-13.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. et Shlomchil, M. (2001) *Immunobiology, The immune system in health and disease, fifth edition*. Garland Publishing, NY, USA, 732 p.

Janssens, S. et Beyaert, R. (2003a) Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members, *Mol Cell* 11 (2), 293-302.

Janssens, S. et Beyaert, R. (2003b) Role of Toll-like receptors in pathogen recognition, *Clin Microbiol Rev* 16 (4), 637-46.

Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J. et Beyaert, R. (2002) Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88, *Curr Biol* 12 (6), 467-71.

Jenner, R.G. et Young, R.A. (2005) Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling, *Nat Rev Microbiol* 3 (4), 281-94.

Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M. et Beutler, B. (2005) CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling, *Nat Immunol* 6 (6), 565-70.

Jiang, Z., Georgel, P., Li, C., Choe, J., Crozat, K., Rutschmann, S., Du, X., Bigby, T., Mudd, S., Sovath, S., Wilson, I.A., Olson, A. et Beutler, B. (2006) Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (29), 10961-6.

Jiang, Z., Zamanian-Daryoush, M., Nie, H., Silva, A.M., Williams, B.R. et Li, X. (2003) Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR, *J Biol Chem* 278 (19), 16713-9.

Johnsen, I.B., Nguyen, T.T., Ringdal, M., Tryggestad, A.M., Bakke, O., Lien, E., Espevik, T. et Anthonsen, M.W. (2006) Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling, *Embo J* 25 (14), 3335-46.

Joshi, M.B., Mallinson, D.J. et Dwyer, D.M. (2004) The human pathogen *Leishmania donovani* secretes a histidine acid phosphatase activity that is resistant to proteolytic degradation, *J Eukaryot Microbiol* 51 (1), 108-12.



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

Joshi, P.B., Sacks, D.L., Modi, G. et McMaster, W.R. (1998) Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63), *Mol Microbiol* 27 (3), 519-30.

Kabesch, M. et Lauener, R.P. (2004) Why Old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis, *J Leukoc Biol* 75 (3), 383-7.

Kagan, J.C. et Medzhitov, R. (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling, *Cell* 125 (5), 943-55.

Kaisho, T. et Akira, S. (2004) Pleiotropic function of Toll-like receptors, *Microbes Infect* 6 (15), 1388-94.

Kamhawi, S. (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?, *Trends Parasitol* 22 (9), 439-45.

Kamhawi, S., Modi, G.B., Pimenta, P.F., Rowton, E. et Sacks, D.L. (2000) The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment, *Parasitology* 121 ( Pt 1) 25-33.

Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Barillas-Mury, C., Sacks, D.L. et Valenzuela, J.G. (2004) A role for insect galectins in parasite survival, *Cell* 119 (3), 329-41.

Kammanadī minti, S.J., Mann, B.J., Dutil, L. et Chadee, K. (2004) Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*, *Faseb J* 18 (1), 155-7.

Kane, M.M. et Mosser, D.M. (2001) The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis, *J Immunol* 166 (2), 1141-7.

Kang, D.C., Gopalkrishnan, R.V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A.M. et Fisher, P.B. (2002) mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2), 637-42.

Kapler, G.M. et Beverley, S.M. (1989) Transcriptional mapping of the amplified region encoding the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major* reveals a high density of transcripts, including overlapping and antisense RNAs, *Mol Cell Biol* 9 (9), 3959-72.

Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. et Weissman, D. (2004) mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3, *J Biol Chem* 279 (13), 12542-50.

Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O. et Akira, S. (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response, *Immunity* 23 (1), 19-28.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. et Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin, *Immunity* 11 (1), 115-22.

Kedzierski, L., Montgomery, J., Bullen, D., Curtis, J., Gardiner, E., Jimenez-Ruiz, A. et Handman, E. (2004) A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3, *J Immunol* 172 (8), 4902-6.

Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F. et Modabber, F. (2006) Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview, *Indian J Med Res* 123 (3), 423-38.

Killick-Kendrick, R. (1985) Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmania* and their phlebotomine vectors, *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 78 (5 Pt 2), 747-55.

Killick-Kendrick, R., Wallbanks, K.R., Molyneux, D.H. et Lavin, D.R. (1988) The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis of *Phlebotomus papatasi*, *Parasitol Res* 74 (6), 586-90.

Kima, P.E. et Dunn, W. (2005) Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate *Leishmania parasitophorous vacuoles*, *Microb Pathog* 38 (4), 139-45.

Kinjyo, I., Hanada, T., Inagaki-Ohara, K., Mori, H., Aki, D., Ohishi, M., Yoshida, H., Kubo, M. et Yoshimura, A. (2002) SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation, *Immunity* 17 (5), 583-91.

Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R. et Flavell, R.A. (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling, *Cell* 110 (2), 191-202.

Kobayashi, K.S. et Flavell, R.A. (2004) Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system, *J Leukoc Biol* 75 (3), 428-33.

Kopf, M., Brombacher, F., Kohler, G., Kienzle, G., Widmann, K.H., Lefrang, K., Humborg, C., Ledermann, B. et Solbach, W. (1996) IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*, *J Exp Med* 184 (3), 1127-36.

Krishnegowda, G., Hajjar, A.M., Zhu, J., Douglass, E.J., Uematsu, S., Akira, S., Woods, A.S. et Gowda, D.C. (2005) Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity, *J Biol Chem* 280 (9), 8606-16.

Kropf, P., Freudenberg, M.A., Modolell, M., Price, H.P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D.F. et Muller, I. (2004a) Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*, *Infect Immun* 72 (4), 1920-8.

Kropf, P., Freudenberg, N., Kalis, C., Modolell, M., Herath, S., Galanos, C., Freudenberg, M. et Muller, I. (2004b) Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication, *J Leukoc Biol* 76 (1), 48-57.

Kuhns, D.B., Long Priel, D.A. et Gallin, J.I. (1997) Endotoxin and IL-1 hyporesponsiveness in a patient with recurrent bacterial infections, *J Immunol* 158 (8), 3959-64.

Lamphier, M.S., Sirois, C.M., Verma, A., Golenbock, D.T. et Latz, E. (2006) TLR9 and the Recognition of Self and Non-Self Nucleic Acids, *Ann N Y Acad Sci* 1082 31-43.

Lang, T., Hellio, R., Kaye, P.M. et Antoine, J.C. (1994) *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation, *J Cell Sci* 107 ( Pt 8) 2137-50.

Laouar, Y., Sutterwala, F.S., Gorelik, L. et Flavell, R.A. (2005) Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma, *Nat Immunol* 6 (6), 600-7.

Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Kurt-Jones, E.A., Golenbock, D.T. et Espevik, T. (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction, *J Biol Chem* 277 (49), 47834-43.

Lauener, R.P., Birchler, T., Adamski, J., Braun-Fahrlander, C., Bufe, A., Herz, U., Von Mutius, E., Nowak, D., Riedler, J., Waser, M. et Sennhauser, F.H. (2002) Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children, *Lancet* 360 (9331), 465-6.

Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., Solbach, W. et Laskay, T. (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors, *Infect Immun* 70 (2), 826-35.

Leal, L.M., Moss, D.W., Kuhn, R., Muller, W. et Liew, F.Y. (1993) Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection, *Eur J Immunol* 23 (2), 566-9.

Lee, H.K., Dunzendorfer, S., Soldau, K. et Tobias, P.S. (2006) Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14, *Immunity* 24 (2), 153-63.

Leishman, W.B. (1903) On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India, *British Med J*, May 30, 1252-4.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. et Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell* 86 (6), 973-83.

Lemesre, J.L., Sereno, D., Daulouede, S., Veyret, B., Brajon, N. et Vincendeau, P. (1997) *Leishmania* spp.: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms, *Exp Parasitol* 86 (1), 58-68.

Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M., Jr. et Lemon, S.M. (2005) Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes, *J Biol Chem* 280 (17), 16739-47.

Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K. et Flavell, R.A. (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses, *Annu Rev Immunol* 24 99-146.

Locksley, R.M., Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J. et Gardner, K.D., Jr. (1987) Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets, *Ann Inst Pasteur Immunol* 138 (5), 744-9.

Lodge, R. et Descoteaux, A. (2005) *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42, *Cell Microbiol* 7 (11), 1647-58.

Lodge, R. et Descoteaux, A. (2006) Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation, *Eur J Immunol* 36 (10), 2735-44.

Lodge, R., Diallo, T.O. et Descoteaux, A. (2006) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane, *Cell Microbiol* 8 (12), 1922-31.

Mahoney, A.B., Sacks, D.L., Saraiva, E., Modi, G. et Turco, S.J. (1999) Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions, *Biochemistry* 38 (31), 9813-23.

Mansell, A., Smith, R., Doyle, S.L., Gray, P., Fenner, J.E., Crack, P.J., Nicholson, S.E., Hilton, D.J., O'Neill, L.A. et Hertzog, P.J. (2006) Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation, *Nat Immunol* 7 (2), 148-55.

Martinon, F., Burns, K. et Tschopp, J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta, *Mol Cell* 10 (2), 417-26.

Martinon, F. et Tschopp, J. (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens, *Trends Immunol* 26 (8), 447-54.

Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Ogawa, T. et Yoshikai, Y. (2000) Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages, *J Immunol* 165 (10), 5767-72.

Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A. et Seya, T. (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells, *J Immunol* 171 (6), 3154-62.

Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K. et Seya, T. (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling, *Biochem Biophys Res Commun* 293 (5), 1364-9.

Mbow, M.L., Bleyenbergh, J.A., Hall, L.R. et Titus, R.G. (1998) *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*, *J Immunol* 161 (10), 5571-7.

McCluskie, M.J. et Krieg, A.M. (2006) Enhancement of infectious disease vaccines through TLR9-dependent recognition of CpG DNA, *Curr Top Microbiol Immunol* 311 155-78.

McConville, M.J. et Blackwell, J.M. (1991) Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids, *J Biol Chem* 266 (23), 15170-9.

McConville, M.J., Schnur, L.F., Jaffe, C. et Schneider, P. (1995) Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species, *Biochem J* 310 ( Pt 3) 807-18.

McConville, M.J., Thomas-Oates, J.E., Ferguson, M.A. et Homans, S.W. (1990) Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*, *J Biol Chem* 265 (32), 19611-23.

McGettrick, A.F., Brint, E.K., Palsson-McDermott, E.M., Rowe, D.C., Golenbock, D.T., Gay, N.J., Fitzgerald, K.A. et O'Neill, L.A. (2006) Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC{epsilon} during Toll-like receptor 4 signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (24), 9196-201.

McGettrick, A.F. et O'Neill, L.A. (2004) The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction, *Mol Immunol* 41 (6-7), 577-82.

McGwire, B.S., Chang, K.P. et Engman, D.M. (2003) Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63, *Infect Immun* 71 (2), 1008-10.

McNeely, T.B., Rosen, G., Londner, M.V. et Turco, S.J. (1989) Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and



glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*, *Biochem J* 259 (2), 601-4.

McNeely, T.B. et Turco, S.J. (1987) Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan, *Biochem Biophys Res Commun* 148 (2), 653-7.

Medvedev, A.E., Lentschat, A., Kuhns, D.B., Blanco, J.C., Salkowski, C., Zhang, S., Arditi, M., Gallin, J.I. et Vogel, S.N. (2003) Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections, *J Exp Med* 198 (4), 521-31.

Medvedev, A.E., Thomas, K., Awomoyi, A., Kuhns, D.B., Gallin, J.I., Li, X. et Vogel, S.N. (2005) Cutting edge: expression of IL-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) proteins with mutations identified in a patient with recurrent bacterial infections alters normal IRAK-4 interaction with components of the IL-1 receptor complex, *J Immunol* 174 (11), 6587-91.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. et Janeway, C.A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 388 (6640), 394-7.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. et Janeway, C.A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways, *Mol Cell* 2 (2), 253-8.

Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B. et Gorvel, J.P. (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death, *Nat Cell Biol* 1 (7), E183-8.

Metchnikov, E. (1884) Über eine sprosspilzkrankheit des daphnien. Beitrag zur lehre über den kampf der phagocyten gegen krankheitserreger, *Virchows Arch* 96, 177-95.

Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. et Tschopp, J. (2004) RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation, *Nat Immunol* 5 (5), 503-7.

Miao, L., Stafford, A., Nir, S., Turco, S.J., Flanagan, T.D. et Eband, R.M. (1995) Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*, *Biochemistry* 34 (14), 4676-83.

Miranda-Verastegui, C., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, I., Ward, B.J. et Matlashewski, G. (2005) Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru, *Clin Infect Dis* 40 (10), 1395-403.

Mitchison, A. (1993) Will we survive?, *Sci Am* 269 (3), 136-44.

Miyake, K. (2006) Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors, *J Endotoxin Res* 12 (4), 195-204.

Mockenhaupt, F.P., Cramer, J.P., Hamann, L., Stegemann, M.S., Eckert, J., Oh, N.R., Otchwemah, R.N., Dietz, E., Ehrhardt, S., Schroder, N.W., Bienzle, U. et Schumann, R.R. (2006a) Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (1), 177-82.

Mockenhaupt, F.P., Hamann, L., Von Gaertner, C., Bedu-Addo, G., Von Kleinsorgen, C., Schumann, R.R. et Bienzle, U. (2006b) Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy, *J Infect Dis* 194 (2), 184-8.

Morrison, A.C., Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., Wilson, M.L. et Tesh, R.B. (1995) Nocturnal activity patterns of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia, *J Med Entomol* 32 (5), 605-17.

Mosser, D.M. et Edelson, P.J. (1985) The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes, *J Immunol* 135 (4), 2785-9.

Muraille, E., De Trez, C., Brait, M., De Baetselier, P., Leo, O. et Carlier, Y. (2003) Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response, *J Immunol* 170 (8), 4237-41.

Murray, H.W. (1981) Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages, *J Exp Med* 153 (5), 1302-15.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. et Saravia, N.G. (2005) Advances in leishmaniasis, *Lancet* 366 (9496), 1561-77.

Murray, H.W., Spitalny, G.L. et Nathan, C.F. (1985) Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon-gamma, *J Immunol* 134 (3), 1619-22.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., Van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P. et Mantovani, A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells, *J Immunol* 164 (11), 5998-6004.

Nacy, C.A., Fortier, A.H., Meltzer, M.S., Buchmeier, N.A. et Schreiber, R.D. (1985) Macrophage activation to kill *Leishmania major*: activation of macrophages for

intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon-gamma and non-interferon lymphokines, *J Immunol* 135 (5), 3505-11.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. et Kishimoto, T. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor, *Nature* 387 (6636), 924-9.

Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M., Kimura, A., Abe, T., Seki, E., Sato, S., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., Yamanishi, K., Kawase, I., Nakanishi, K. et Kishimoto, T. (2002) SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses, *Immunity* 17 (5), 677-87.

Nakahira, K., Kim, H.P., Geng, X.H., Nakao, A., Wang, X., Murase, N., Drain, P.F., Sasidhar, M., Nabel, E.G., Takahashi, T., Lukacs, N.W., Ryter, S.W., Morita, K. et Choi, A.M. (2006) Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts, *J Exp Med* 203 (10), 2377-89.

Nakata, T., Yasuda, M., Fujita, M., Kataoka, H., Kiura, K., Sano, H. et Shibata, K. (2006) CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex, *Cell Microbiol* 8 (12), 1899-909.

Nakayama, K., Okugawa, S., Yanagimoto, S., Kitazawa, T., Tsukada, K., Kawada, M., Kimura, S., Hirai, K., Takagaki, Y. et Ota, Y. (2004) Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages, *J Biol Chem* 279 (8), 6629-34.

Nandan, D., Yi, T., Lopez, M., Lai, C. et Reiner, N.E. (2002) *Leishmania* EF-1 alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation, *J Biol Chem* 277 (51), 50190-7.

Nau, G.J., Schlesinger, A., Richmond, J.F. et Young, R.A. (2003) Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria, *J Immunol* 170 (10), 5203-9.

Ng Yan Hing, J.D., Desjardins, M. et Descoteaux, A. (2004) Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C-alpha in phagosome maturation, *Biochem Biophys Res Commun* 319 (3), 810-6.

Nhu, Q.M., Cuesta, N. et Vogel, S.N. (2006) Transcriptional regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced Toll-like receptor (TLR) expression in murine macrophages: role of interferon regulatory factors 1 (IRF-1) and 2 (IRF-2), *J Endotoxin Res* 12 (5), 285-95.

Nishiya, T. et DeFranco, A.L. (2004) Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors, *J Biol Chem* 279 (18), 19008-17.

Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S. et DeFranco, A.L. (2005) TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements, *J Biol Chem* 280 (44), 37107-17.

Noben-Trauth, N., Lira, R., Nagase, H., Paul, W.E. et Sacks, D.L. (2003) The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*, *J Immunol* 170 (10), 5152-8.

Olivier, M., Badaro, R., Medrano, F.J. et Moreno, J. (2003) The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms, *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1 79-98.

Olivier, M., Brownsey, R.W. et Reiner, N.E. (1992) Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (16), 7481-5.

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

Olivier, M., Romero-Gallo, B.J., Matte, C., Blanchette, J., Posner, B.I., Tremblay, M.J. et Faure, R. (1998) Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression, *J Biol Chem* 273 (22), 13944-9.

O'Neill L, A. (2006) DisSARMing Toll-like receptor signaling, *Nat Immunol* 7 (10), 1023-5.

O'Neill, L.A., Fitzgerald, K.A. et Bowie, A.G. (2003) The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members, *Trends Immunol* 24 (6), 286-90.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. et Seya, T. (2003a) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction, *Nat Immunol* 4 (2), 161-7.

Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. et Seya, T. (2003b) TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta, *J Biol Chem* 278 (50), 49751-62.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L. et Aderem, A. (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* 97 (25), 13766-71.

Padigel, U.M., Alexander, J. et Farrell, J.P. (2003) The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*, *J Immunol* 171 (7), 3705-10.

Pathak, S.K., Basu, S., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Kundu, M. et Basu, J. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated IRAK-M induction negatively regulates Toll-like receptor-dependent interleukin-12 p40 production in macrophages, *J Biol Chem* 280 (52), 42794-800.

Pelletier, I., Hashidate, T., Urashima, T., Nishi, N., Nakamura, T., Futai, M., Arata, Y., Kasai, K., Hirashima, M., Hirabayashi, J. et Sato, S. (2003) Specific recognition of *Leishmania major* poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells, *J Biol Chem* 278 (25), 22223-30.

Pelletier, I. et Sato, S. (2002) Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope, *J Biol Chem* 277 (20), 17663-70.

Peters, C., Stierhof, Y.D. et Ilg, T. (1997) Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages, *Infect Immun* 65 (2), 783-6.

Piedrafita, D., Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Xu, D., Sands, W., Feng, G.J., Thomas, E., Brewer, J., Ferguson, M.A., Alexander, J. et Liew, F.Y. (1999) Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans, *Eur J Immunol* 29 (1), 235-44.

Pimenta, P.F., Saraiva, E.M., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J. et Sacks, D.L. (1994) Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (19), 9155-9.

Pimenta, P.F., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P.V. et Sacks, D.L. (1992) Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut, *Science* 256 (5065), 1812-5.

Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T. et Gordon, S. (1996) Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes *in vitro*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (22), 12456-60.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. et Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene, *Science* 282 (5396), 2085-8.

Portnoy, D.A. (2005) Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens, *Curr Opin Immunol* 17 (1), 25-8.

Pratlong, F., Dereure, J., Bucheton, B., El-Saf, S., Dessein, A., Lanotte, G. et Dedet, J.P. (2001) Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis, *Parasitology* 122 (Pt 6), 599-605.

Prive, C. et Descoteaux, A. (2000) *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages, *Eur J Immunol* 30 (8), 2235-44.



Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.J., Wei, W.Q., Ferguson, M.A., Brimacombe, J.S. et Liew, F.Y. (1996) Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (20), 10984-9.

Proudfoot, L., O'Donnell, C.A. et Liew, F.Y. (1995) Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages, *Eur J Immunol* 25 (3), 745-50.

Puentes, S.M., Da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H. et Joiner, K.A. (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9, *J Immunol* 145 (12), 4311-6.

Qureshi, S.T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P. et Malo, D. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4), *J Exp Med* 189 (4), 615-25.

Rakesh, K. et Agrawal, D.K. (2005) Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors, *Biochem Pharmacol* 70 (5), 649-57.

Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J.P. et Campino, L. (2006) First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*, *Int J Parasitol* 36 (13), 1383-8.

Rehli, M. (2002) Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression, *Trends Immunol* 23 (8), 375-8.

Reiner, N.E. (1987) Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*, *J Immunol* 138 (6), 1919-25.

Reiner, N.E., Ng, W., Wilson, C.B., McMaster, W.R. et Burchett, S.K. (1990) Modulation of *in vitro* monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1, *J Clin Invest* 85 (6), 1914-24.

Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J. et Sambhara, S. (2002) Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging, *J Immunol* 169 (9), 4697-701.

Rhee, S.H., Im, E., Riegler, M., Kokkotou, E., O'Brien, M. et Pothoulakis, C. (2005) Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (38), 13610-5.

Roach, T.I., Kiderlen, A.F. et Blackwell, J.M. (1991) Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from Lshs and Lshr congenic mouse strains, *Infect Immun* 59 (11), 3935-44.

Roberts, L.J., Handman, E. et Foote, S.J. (2000) Leishmaniasis, *Bmj* 321, 801-4.

Robinson, K.A. et Beverley, S.M. (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*, *Mol Biochem Parasitol* 128 (2), 217-28.

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. et Bazan, J.F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (2), 588-93.

Rodrigues, V., Jr., Santana Da Silva, J. et Campos-Neto, A. (1998) Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis, *Infect Immun* 66 (3), 1233-6.

Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A. et Bates, P.A. (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG, *Nature* 430 (6998), 463-7.

Roport, C. et Gazzinelli, R.T. (2004) Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*, *J Endotoxin Res* 10 (6), 425-30.

Rosas, L.E., Keiser, T., Pyles, R., Durbin, J. et Satoskar, A.R. (2003) Development of protective immunity against cutaneous leishmaniasis is dependent on STAT1-mediated IFN signaling pathway, *Eur J Immunol* 33 (7), 1799-805.

Ross, J.A. et Auger, M.J. (2002) The biology of the macrophage. In B. Burke and C.E. Lewis (Ed.) *The macrophage, second edition*. Oxford University Press, Oxford, UK, p. 1-72.

Rowe, D.C., McGettrick, A.F., Latz, E., Monks, B.G., Gay, N.J., Yamamoto, M., Akira, S., O'Neill, L.A., Fitzgerald, K.A. et Golenbock, D.T. (2006) The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (16), 6299-304.

Roy, M.F., Lariviere, L., Wilkinson, R., Tam, M., Stevenson, M.M. et Malo, D. (2006) Incremental expression of Tlr4 correlates with mouse resistance to *Salmonella* infection and fine regulation of relevant immune genes, *Genes Immun* 7 (5), 372-83.

Rus, H., Cudrici, C. et Niculescu, F. (2005) The role of the complement system in innate immunity, *Immunol Res* 33 (2), 103-12.

Russell, D. G. et Wright, S.D. (1988) Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes, *J Exp Med* 168 (1), 279-92.

Ryan, K.A., Garraway, L.A., Descoteaux, A., Turco, S.J. et Beverley, S.M. (1993) Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (18), 8609-13.

Sacks, D.L. (1989) Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes, *Exp Parasitol* 69 (1), 100-3.

Sacks, D.L. (2001) *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence, *Cell Microbiol* 3 (4), 189-96.

Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J. et Beverley, S.M. (2000) The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (1), 406-11.

Sacks, D.L., Saraiva, E.M., Rowton, E., Turco, S.J. et Pimenta, P.F. (1994) The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence, *Parasitology* 108, S55-62.

Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K. et Akira, S. (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling, *J Immunol* 171 (8), 4304-10.

Savill, J., Fadok, V., Henson, P. et Haslett, C. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis, *Immunol Today* 14 (3), 131-6.

Scharton-Kersten, T., Afonso, L.C., Wysocka, M., Trinchieri, G. et Scott, P. (1995) IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis, *J Immunol* 154 (10), 5320-30.

Schlein, Y. et Romano, H. (1986) *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae), *Exp Parasitol* 62 (3), 376-80.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. et Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J Leukoc Biol* 75 (2), 163-89.

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

Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E. et Sher, A. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens, *J Exp Med* 168 (5), 1675-84.

Seaman, J., Mercer, A.J. et Sondorp, E. (1996) The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994, *Int J Epidemiol* 25 (4), 862-71.

Seay, M.B., Heard, P.L. et Chaudhuri, G. (1996) Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes, *Infect Immun* 64 (12), 5129-37.

Seiwert, S.D., Heidmann, S. et Stuart, K. (1996) Direct visualization of uridylyate deletion in vitro suggests a mechanism for kinetoplastid RNA editing, *Cell* 84 (6), 831-41.

Seki, Y., Inoue, H., Nagata, N., Hayashi, K., Fukuyama, S., Matsumoto, K., Komine, O., Hamano, S., Himeno, K., Inagaki-Ohara, K., Cacalano, N., O'Garra, A., Oshida, T., Saito, H., Johnston, J.A., Yoshimura, A. et Kubo, M. (2003) SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses, *Nat Med* 9 (8), 1047-54.

Seth, R.B., Sun, L. et Chen, Z.J. (2006) Antiviral innate immunity pathways, *Cell Res* 16 (2), 141-7.

Shakarian, A.M., Joshi, M.B., Ghedin, E. et Dwyer, D.M. (2002) Molecular dissection of the functional domains of a unique, tartrate-resistant, surface membrane acid phosphatase in the primitive human pathogen *Leishmania donovani*, *J Biol Chem* 277 (20), 17994-8001.

Shapira, S., Harb, O.S., Caamano, J. et Hunter, C.A. (2004) The NF-kappaB signaling pathway: immune evasion and immunoregulation during toxoplasmosis, *Int J Parasitol* 34 (3), 393-400.

Sibley, L.D., Adams, L.B., Fukutomi, Y. et Krahenbuhl, J.L. (1991) Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages, *J Immunol* 147 (7), 2340-5.

Silverstein, A.M. (1979) History of immunology. Cellular versus humoral immunity: determinants and consequences of an epic 19th century battle, *Cell Immunol* 48 (1), 208-21.

Simpson, L., Sbicego, S. et Aphasizhev, R. (2003) Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business, *Rna* 9 (3), 265-76.

Singh, S., Chaudhry, V.P. et Wali, J.P. (1996) Transfusion-transmitted kala-azar in India, *Transfusion* 36 (9), 848-9.

Smith, K.A. (2002) Medical immunology: a new journal for a new subspecialty, *Med Immunol* 1 (1), 1.

Soto, J., Arana, B.A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J.C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J.D., Junge, K., Engel, J. et Sindermann, H. (2004) Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis, *Clin Infect Dis* 38 (9), 1266-72.

Souto-Padron, T. (2002) The surface charge of trypanosomatids, *An Acad Bras Cienc* 74 (4), 649-75.

St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F. et Descoteaux, A. (1999) Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages, *J Immunol* 163 (10), 5505-11.

Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E. and Nusslein-Volhard, C. (1991) The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal, *Cell* 65 (5), 725-35.

Stierhof, Y.D., Bates, P.A., Jacobson, R.L., Rogers, M.E., Schlein, Y., Handman, E. et Ilg, T. (1999) Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors, *Eur J Cell Biol* 78 (10), 675-89.

Stoiber, D., Kovarik, P., Cohney, S., Johnston, J.A., Steinlein, P. et Decker, T. (1999) Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma, *J Immunol* 163 (5), 2640-7.

Stuart, K.D., Schnauffer, A., Ernst, N.L. et Panigrahi, A.K. (2005) Complex management: RNA editing in trypanosomes, *Trends Biochem Sci* 30 (2), 97-105.

Sun, J., Duffy, K.E., Ranjith-Kumar, C.T., Xiong, J., Lamb, R.J., Santos, J., Masarapu, H., Cunningham, M., Holzenburg, A., Sarisky, R.T., Mbow, M.L. et Kao, C. (2006) Structural and functional analyses of the human Toll-like receptor 3. Role of glycosylation, *J Biol Chem* 281 (16), 11144-51.

Sundar, S. and Chatterjee, M. (2006) Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities, *Indian J Med Res* 123 (3), 345-52.

Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A. et Berman, J. (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis, *N Engl J Med* 347 (22), 1739-46.

Sutterwala, F.S., Noel, G.J., Clynes, R. et Mosser, D.M. (1997) Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation, *J Exp Med* 185 (11), 1977-85.

Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J.M., Wesche, H., Ohashi, P.S., Mak, T.W. et Yeh, W.C. (2002) Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4, *Nature* 416 (6882), 750-6.



Swaminath, C.S., Shortt, H.E. et Anderson L.A.P. (1942) Transmission of Indian kala-azar to man by the bites of *Phlebotomus argentipes*, ann and brun. *Indian J Med Res*, 30 (3), 473-7.

Swaminath, C.S., Shortt, H.E. et Anderson, L.A. (2006) Transmission of Indian kala-azar to man by the bites of *Phlebotomus argentipes*, ann and brun. 1942, *Indian J Med Res* 123 (3), 473-7.

Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E., Subramanyam, J.M., Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F. et Schaub, R.G. (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response, *J Exp Med* 177 (6), 1797-802.

Taguchi, T., Mitcham, J.L., Dower, S.K., Sims, J.E. et Testa, J.R. (1996) Chromosomal localization of *TIL*, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14, *Genomics* 32 (3), 486-8.

Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W. et Taniguchi, T. (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors, *Nature* 434 (7030), 243-9.

Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K. et Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6, *Int Immunol* 13 (7), 933-40.

Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L. et Akira, S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins, *J Immunol* 169 (1), 10-4.

Tanji, T. et Ip, Y.T. (2005) Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response, *Trends Immunol* 26 (4), 193-8.

Tapping, R.I. et Tobias, P.S. (2003) Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling, *J Endotoxin Res* 9 (4), 264-8.

Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J.A. et Imler, J.L. (2000) Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (19), 10520-5.

Thyphronitis, G., Kinoshita, T., Inoue, K., Schweinle, J.E., Tsokos, G.C., Metcalf, E.S., Finkelman, F.D. et Balow, J.E. (1991) Modulation of mouse complement receptors 1 and 2 suppresses antibody responses *in vivo*, *J Immunol* 147 (1), 224-30.

Ting, J.P. et Davis, B.K. (2005) CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases, *Annu Rev Immunol* 23 387-414.

Touret, N., Paroutis, P. et Grinstein, S. (2005a) The nature of the phagosomal membrane: endoplasmic reticulum versus plasmalemma, *J Leukoc Biol* 77 (6), 878-85.

Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H.P., Van Der Wel, N., Houben, D., Peters, P.J., De Chastellier, C., Mellman, I. et Grinstein, S. (2005b) Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation, *Cell* 123 (1), 157-70.

Tripathi, A. et Gupta, C.M. (2003) Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes, *Mol Biochem Parasitol* 128 (1), 1-9.

Trouiller, P., Olliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R. et Ford, N. (2002) Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure, *Lancet* 359 (9324), 2188-94.

Turco, S.J. et Descoteaux, A. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites, *Annu Rev Microbiol* 46 65-94.

Turco, S.J., Hull, S.R., Orlandi, P.A., Jr., Shepherd, S.D., Homans, S.W., Dwek, R.A. et Rademacher, T.W. (1987) Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan, *Biochemistry* 26 (19), 6233-8.

Underhill, D.M. et Gantner, B. (2004) Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity, *Microbes Infect* 6 (15), 1368-73.

Underhill, D.M. et Ozinsky, A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action, *Annu Rev Immunol* 20 825-52.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M. and Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens, *Nature* 401 (6755), 811-5.

Urbina, J.A. (1997) Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites, *Parasitology* 114 Suppl S91-9.

Van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Muller, A., Holscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., Solbach, W. et Laskay, T. (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (37), 13837-42.

Van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. et Laskay, T. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages, *J Immunol* 173 (11), 6521-5.

Viana Da Costa, A., Huerre, M., Delacre, M., Auriault, C., Correia Costa, J.M. et Verwaerde, C. (2002) IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistant mouse model of *Leishmania major* infection, *Parasitol Int* 51 (4), 367-79.

Wan, Y., Wu, Y., Zhou, J., Zou, L., Liang, Y., Zhao, J., Jia, Z., Engberg, J., Bian, J. et Zhou, W. (2005) Cross-presentation of phage particle antigen in MHC class II and endoplasmic reticulum marker-positive compartments, *Eur J Immunol* 35 (7), 2041-50.

Wanderley, J.L., Benjamin, A., Real, F., Bonomo, A., Moreira, M.E. et Barcinski, M.A. (2005) Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay, *Braz J Med Biol Res* 38 (6), 807-12.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. et Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK, *Nature* 412 (6844), 346-51.

Wang, T., Lafuse, W.P. et Zwillig, B.S. (2001) NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by *Mycobacterium avium*, *J Immunol* 167 (12), 6924-32.

Warburg, A. et Schlein, Y. (1986) The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*, *Am J Trop Med Hyg* 35 (5), 926-30.

Weiss, D.S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S. et Zychlinsky, A. (2004) Toll-like receptors are temporally involved in host defense, *J Immunol* 172 (7), 4463-9.

Wells, C.A., Chalk, A.M., Forrest, A., Taylor, D., Waddell, N., Schroder, K., Himes, S.R., Faulkner, G., Lo, S., Kasukawa, T., Kawaji, H., Kai, C., Kawai, J., Katayama, S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Hume, D.A. et Grimmond, S.M. (2006) Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade, *Genome Biol* 7 (2), R10.

Werb, Z. et Cohn, Z.A. (1972) Plasma membrane synthesis in the macrophage following phagocytosis of polystyrene latex particles, *J Biol Chem* 247 (8), 2439-46.

Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S. et Cao, Z. (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex, *Immunity* 7 (6), 837-47.

Whitelaw, D.M. (1966) The intravascular lifespan of monocytes, *Blood* 28 (3), 455-64.

Widmer, G., Comeau, A.M., Furlong, D.B., Wirth, D.F. et Patterson, J.L. (1989) Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (15), 5979-82.

Widmer, G., Keenan, M.C. et Patterson, J.L. (1990) RNA polymerase activity is associated with viral particles isolated from *Leishmania braziliensis* subsp. *guyanensis*, *J Virol* 64 (8), 3712-5.

Wilson, M.E. et Pearson, R.D. (1986) Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism, *J Immunol* 136 (12), 4681-8.

Wilson, M.E. et Pearson, R.D. (1988) Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes, *Infect Immun* 56 (2), 363-9.

Woodman, R.C., Johnston, B., Hickey, M.J., Teoh, D., Reinhardt, P., Poon, B.Y. et Kubes, P. (1998) The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice, *J Exp Med* 188 (11), 2181-6.

Worthey, E.A., Schnauffer, A., Mian, I.S., Stuart, K. et Salavati, R. (2003) Comparative analysis of editosome proteins in trypanosomatids, *Nucleic Acids Res* 31 (22), 6392-408.

Wozencraft, A.O., Sayers, G. et Blackwell, J.M. (1986) Macrophage type 3 complement receptors mediate serum-independent binding of *Leishmania donovani*. Detection of macrophage-derived complement on the parasite surface by immunoelectron microscopy, *J Exp Med* 164 (4), 1332-7.

Wu, W., Weigand, L., Belkaid, Y. et Mendez, S. (2006) Immunomodulatory effects associated with a live vaccine against *Leishmania major* containing CpG oligodeoxynucleotides, *Eur J Immunol* 36 (12), 3238-47.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. et Akira, S. (2002a) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4, *Nature* 420 (6913), 324-9.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. et Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway, *Nat Immunol* 4 (11), 1144-50.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. et Akira, S. (2002b) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that

preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling, *J Immunol* 169 (12), 6668-72.

Yamamoto, M., Takeda, K. et Akira, S. (2004) TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling, *Mol Immunol* 40 (12), 861-8.

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

Yao, C., Leidal, K.G., Brittingham, A., Tarr, D.E., Donelson, J.E. et Wilson, M.E. (2002) Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*, *Mol Biochem Parasitol* 121 (1), 119-28.

Yeung, T., Ozdamar, B., Paroutis, P. et Grinstein, S. (2006) Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis, *Curr Opin Cell Biol* 18 (4), 429-37.

Yim, J.J., Lee, H.W., Lee, H.S., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S. et Holland, S.M. (2006) The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans, *Genes Immun* 7 (2), 150-5.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. et Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses, *Nat Immunol* 5 (7), 730-7.

Yoshida, Y., Kang, K., Berger, M., Chen, G., Gilliam, A.C., Moser, A., Wu, L., Hammerberg, C. et Cooper, K.D. (1998) Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin, *J Immunol* 161 (11), 5873-9.

Zarembek, K.A. et Godowski, P.J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines, *J Immunol* 168 (2), 554-61.

Zijlstra, E.E. et El-Hassan, A.M. (2001) Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95 Suppl 1 S27-58.

Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A., El-Hassan, I.M. et El-Hassan, A.M. (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis, *Lancet Infect Dis* 3 (2), 87-98.

Zufferey, R., Allen, S., Barron, T., Sullivan, D.R., Denny, P.W., Almeida, I.C., Smith, D.F., Turco, S.J., Ferguson, M.A. et Beverley, S.M. (2003) Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*, *J Biol Chem* 278 (45), 44708-18.



# **ANNEXE 1**

**Interview about RNA interference and TLRs  
with Jean-Frédéric Flandin and Albert Descoteaux**

**Modern Aspects of Immunobiology, 20 (4), p. 4**

## RNA interference and TLRs

with

Jean-Frédéric Flandin and Albert Descoteaux, INRS- Institut Armand-Frappier 531 boul. des Prairies Laval, QC Canada H7V 1B7  
albert.descoteaux@iaf.inrs.ca



### What is known about *Leishmania donovani* promastigotes?

Jean-Frédéric Flandin and Albert Descoteaux: Protozoan parasites of the genus *Leishmania* cause leishmaniasis, a spectrum of diseases afflicting over 12 millions people worldwide. There are three clinical manifestations of leishmaniasis, ranging from the self-healing cutaneous ulcers caused by *L. major*, to life-threatening visceral leishmaniasis, caused by *L. donovani*. *Leishmania* are biphasic parasites, alternating between the flagellated promastigote that develops in the midgut of the sandfly vector and the non-motile amastigote that proliferates within the phagolysosomal compartment of macrophages. *Leishmania* promastigotes are inoculated into

mammals during the blood meal of the female sandfly and are rapidly internalized by macrophages. This represents a crucial step in the outcome of an infection. The entry of *L. donovani* promastigotes in naive/resting macrophages is silent (without inducing significant release of pro-inflammatory cytokines), thereby facilitating the establishment of an infection. On the other hand, in IFN- $\gamma$ -primed macrophages, the entry of the parasite is accompanied by the activation of ERK1/2 and p38 MAP kinase pathways as well as the secretion of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines, ultimately leading to the destruction of the parasite (1,2).

### Which *Leishmania donovani* molecules are important for the infection?

Jean-Frédéric Flandin and Albert Descoteaux: *Leishmania* synthesizes a family of glycoconjugates which have in common repeating Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$  disaccharides which are not found in mammals (3). Lipophosphoglycan (LPG), the most abundant GPI-anchored glycoconjugate is part of the dense glycocalyx at the surface of *Leishmania* promastigotes and is primordial for their survival in the sandfly as well as in the macrophage (at least for *L. major* and *L. donovani*). During the internalization of promastigotes, the presence of LPG blocks phagosome maturation (4) and causes retention, at the phagosome, of the molecular machinery associated with actin polymerization (Cdc42, Arp2/3, WASP) (5), resulting in a periphago-

somal accumulation of F-actin (6). This potentially delays the fusion of the phagosome with late endosomes and lysosomes and enables the promastigote to differentiate into an amastigote (4,6,7). Furthermore, LPG suppresses signalling in macrophages via SOCS3 (Suppressor Of Cytokines Signalling) up-regulation and inhibition of PKC activity (7,8). In addition to LPG, *Leishmania* secrete a family of heavily glycosylated proteins and proteoglycans that are important for parasite virulence (3). Other members of the promastigote surface glycocalyx contribute to virulence. The major surface glycoprotein GP63 (or MSP or leishmanolysin) is a metalloprotease that binds to complement component C3 and cleaves C3b to

the inactive C3bi, thereby evading complement-mediated lysis (9). Also, two virulence factors, the secreted filamentous proteophosphoglycan (fPPG) and cathepsin L-like cysteine protease (CP) are important for *Leishmania* infection but their exact role is not yet fully understood (10,11).

### Are Toll-like receptors (TLR) involved in recognition?

Jean-Frédéric Flandin and Albert Descoteaux: Because of the predominant role of TLRs in innate immunity, much research is currently being conducted on the relationship between *Leishmania* and TLRs. Lately, two groups showed that LPG from *L. major* activates NF- $\kappa$ B and IL-8 expression in a TLR2-dependent manner (8,12). Furthermore, it was shown that LPG colocalizes with TLR2 at the NK cells membrane and they both co-immunoprecipitate (12). In addition to TLR2, TLR4 plays a role in the control of *L. major* infection in a mouse model, via the induction of iNOS (13).

In the case of *L. donovani* promastigotes, we addressed the hypothesis that priming macrophages with IFN- $\gamma$  induces the expression of a receptor which enables activated macrophages to recognize *L. donovani* promastigotes. We observed that in IFN- $\gamma$ -

primed macrophages, *L. donovani* promastigotes stimulated IRAK-1 activity. In addition, we found that TLR3 expression was barely detectable in naive macrophages but expressed in IFN- $\gamma$ -treated macrophages. Using RNA interference, we showed that the silencing of TLR3 in IFN- $\gamma$ -primed macrophages significantly decreases NO and TNF- $\alpha$  secretion following infection with *L. donovani* promastigotes. Consequently, in the absence of TLR3, parasite survival inside activated macrophages was enhanced. Using LPG-deficient promastigotes, we demonstrated that as was the case for *L. major* LPG, TLR2 recognizes the Gal $\beta$ 1,4Man-PO $_4$ -containing phosphoglycans of *L. donovani* (1). On the other hand, although TLR3 appears to play a role in the recognition of *Leishmania* promastigotes, the *Leishmania* molecules recognized by this receptor remain(s) to be identified.

### Why have you used RNA interference for your studies?

Jean-Frédéric Flandin and Albert Descoteaux: We needed a good method for rapidly screening the role of TLRs and downstream signalling intermediates in the response of IFN- $\gamma$ -primed macrophages to *L. donovani* promastigotes. RNA interference is a relatively new method in which the transfection of a siRNA duplex of 21 nucleotides specific for the gene of interest leads to the degradation of the target mRNA and thus the silencing of a single protein (14). Because siRNAs are passed on to daughter cells during 3 to 5 cell divisions, it allowed us to rapidly obtain temporary knock-out cell

lines (15). In summary, RNAi represents a good alternative to the generation of knock-out mice, a time-consuming and expensive method.

### REFERENCES

1. Flandin JF et al. Eur J Immunol 36, 411, 2006
2. Prive C et al. Eur J Immunol 30, 2235, 2000
3. Descoteaux A et al. Biochim Biophys Acta 1455, 341, 1999
4. Desjardins M et al. J Exp Med 185, 2061, 1997
5. Lodge R et al. Cell Microbiol 7, 1647, 2005
6. Holm A et al. Cell Microbiol 3, 439, 2001
7. Descoteaux A et al. J Immunol 149, 3008, 1992
8. De Veer MJ et al. Eur J Immunol 33, 2822, 2003
9. Joshi PB et al. Mol Biochem Parasitol 120, 33, 2002
10. Mundodi V et al. Gene 282, 257, 2002
11. Rogers ME et al. Nature 430, 463, 2004
12. Becker I et al. Mol Biochem Parasitol 130, 65, 2003
13. Kropf P et al. Infect Immun 72, 1920, 2004
14. Huppi K et al. Mol Cell 17, 1, 2005
15. McManus MT et al. Nat Rev Genet 3, 737, 2002

## ANNEXE 2

RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3  
in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes  
by interferon- $\gamma$ -primed macrophages

Jean-Frédéric Flandin, Frédéric Chano and Albert Descoteaux

European Journal of Immunology, 36, 411-20.

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

European Journal of Immunology

Volume 36, Issue 2, pages 411–420, February 2006

RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani*  
promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages.

Flandin JF, Chano F, Descoteaux A.

DOI: 10.1002/eji.200535079