ANIK ST-DENIS

Implication de la protéine kinase C (PKC)-α dans la régulation des fonctions du macrophage reliées aux maladies infectieuses

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

Jury d'évaluation :

Claude Daniel, Ph.D. Danielle Malo, Ph.D. Albert Descoteaux, Ph.D.

Avril 1999 INSTITUT ARMAND-FRAPPIER Université du Québec

ii

Table des matières

Table des matièresiii
Liste des tableauxix
Liste des figuresx
Liste des abréviations xii
Sommaire xiv
Introduction1
Revue bibliographique
 Macrophages
 Interféron (IFN)γ

2.2 Rôle de l'IFNy dans le défense de l'hôte8
3. Lipopolysaccharide10
3.1 Principales caractéristiques du LPS10
3.2 LBP (LPS Binding Protein)
3.3 Molécules de surface se liant au LPS11
3.3.1 CD1412
3.3 2 Récepteur Toll-like (TLR)13
4. Signalisation cellulaire induite par le LPS15
4.1 LPS induit les protéines tyrosines kinases (PTK)15
4.2 LPS induit les «Mitogen-Actived Protein Kinases» (MAPK)16
4.3 LPS induit la protéine kinase C (PKC)19
5. Protéine kinase C (PKC)
5.1 Principales caractéristiques et caractéristiques structurelles de PKC
5.2 Activation de PKC
5.3 Localisation de PKC
5.4 Fonctions spécifiques des différentes isoenzymes de PKC
5.5 Avantages et inconvénients des stratégies et des méthodes d'étude
des différentes isoenzymes de PKC26
6. Facteurs de transcription induits par le LPS28
6.1 NF-кВ
6.1.1 Description de NF-κB et de IκB28
6.1.2 Activation de NF-κB29
6.2 AP-1
7. Phagocytose et activité microbicide des macrophages
7.1 Description générale des processus de phagocytose et
de destruction des microbes

7.1.1 Stratégies d'échappement de certains pathogènes
intracellulaires à l'activité microbicide des macrophages
7.2 Phagocytose et la transduction des signaux
7.2.1 PKC et la phagocytose
7.3 PKC et l'activité microbicide des macrophages
7.3.1 PKC et Leishmania
7.3.2 PKC et Legionella pneumophila
Matériel et méthodes
1 ADN complémentaire et vecteurs 42
1.1 ADN complémentaire et vecteurs
1.2 Vectours
1.2 vecteurs
2. Purification de l'ADN
2.1 Culture bactérienne
2.2 Extraction de l'ADN plasmidique de type «mini-preps»45
2.3 Préparation de cellules compétentes <i>Escherichia coli</i> DH5-α46
2.4 Transformation bactérienne Escherichia coli DH5-α46
2.5 Digestion enzymatique et analyse sur gel47
3. Clonage dans le vecteur d'expression pCIN ₄ 49
3.1 Linéarisation et déphosphorylation du vecteur
d'expression pCIN ₄ et préparation des inserts49
3.2 Purification des fragments d'ADN
3.3 Ligation
3.4 Transformation bactérienne des produits de ligation
3.5 Vérification de l'orientation des inserts par digestion enzymatique51
3.6 Extraction de l'ADN à grande échelle de type «maxi-preps»

4. Culture cellulaire	54
4.1 Macrophages	54
4.2 Leishmania	54
	~ ~
5. Transfections des macrophages et des <i>Leishmania</i>	55
5.1 Electroporation des macrophages	55
5.2 Electroporation des <i>Leishmania</i>	56
6. Préparation des extraits totaux	57
6.1 Lysats cellulaires de macrophages	57
6.1.1 Niveau en protéine de PKC-α pour l'analyse de type Western Blot	57
6.1.2 Phosphorylation du facteur de transcription NF-κB et des MAPK	58
6.2 Lysats cellulaires de Leishmania	59
7. Dosage des protéines BCA (Pierce, Rockfort, IL)	59
8. Électrophorèse sur gel SDS-PAGE et électro-transfert	
sur membrane de nitrocellulose	60
9. Immunobuvardage de type Western Blot	61
10. Analyse de l'attachement du phorbol ester marqué [³ H]PDBu	62
11. Extraction d'ARN	62
12. Analyse de type Northern Blot	63
13. Détermination des nitrites	64
14. Quantification des cytokines	65
15. Détermination de MMP-9	66
16. Infection des macrophages	66

16.1 Infection des macrophages avec Leishmania LV9-Luc	67
16.1.1 Mesure de l'activité en luciférase	68
16.2 Infection bactérienne des macrophages	69
16.2.1 Macrophages contrôles utilisés	69
16.2.2 Souches bactériennes et préparation des suspensions bactériennes	69
16.2.2.1 Legionella pneumophila	69
16.2.2.2 Tsm de Pseudomonas aeruginosa	70
16.3 Protocole d'infection bactérienne des macrophages	70
Résultats	72

4

1. Génération de lignées stables de macrophages RAW 264.7	
surexprimant le dominant-négatif (DN) de PKC-α7	'3
 Effet de la surexpression du DN PKC-α sur l'expression des gènes TNF-α, IL-1α et iNOS induits par le LPS	76
3. Effet de la surexpression du DN PKC- α sur la sécrétion de	
cytokines et sur la production de NO induites par le LPS8	1
 La surexpression du DN PKC-α augmente la sécrétion de MMP-9 induite par le LPS	4
 La phosphorylation et la dégradation de IκBα sont normales dans les macrophages surexprimants le DN PKC-α	:7
 La phosphorylation des MAP kinases p38, JNK et MEK1/2 sont normales pour les macrophages surexprimants le DN PKC-α9 	0
 Augmentation de la survie intracellulaire de Leishmania donovani dans les macrophages surexprimant le DN PKC-α9 	3

8. Les macrophages surexprimant le DN PKC- α stimulés à l'IFN γ
possèdent une activité anti-Leishmania94
9. La surexpression du DN PKC-α rend les macrophages permissifs
à la réplication intracellulaire de Legionella pneumophila101
10. Effet de la surexpression du DN PKC-α sur l'activité microbicide102
Discussion
Conclusion 113
Remerciements
Bibliographie
Annexe I 147
Annexe II

Liste des tableaux

75

TABLEAU 1 :	Inhibition de la sécrétion de NO
	induite par le LPS chez les macrophages
	surexprimant le DN PKC-α

Liste des figures

FIGURE 1 :	Modèles d'activation du LPS	14
FIGURE 2 :	Trois principales voies d'activation des MAP kinases	18
FIGURE 3 :	Structure des isoenzymes de PKC	21
FIGURE 4 :	Localisation intracellulaire des isoenzymes de PKC	24
FIGURE 5 :	Activation du facteur de transcription NF-κB	30
FIGURE 6 :	Surexpression du DN PKC-α dans la lignée de macrophages RAW 264.7	78
FIGURE 7 :	Effet de la surexpression du DN PKC- α sur l'expression des gènes TNF- α , IL-1 α et iNOS induits par le LPS	80
FIGURE 8 :	Effet de la surexpression du DN PKC- α sur la sécrétion de TNF- α , IL-1 α et sur la production de NO	83
FIGURE 9 :	Effet de la surexpression du DN PKC- α sur la sécrétion de la MMP-9	86
FIGURE 10 :	Effet de la surexpression du DN PKC- α sur l'activation de NF- κB	89
FIGURE 11 :	Effet de la surexpression du DN PKC-α sur la phosphorylation des MAP kinases	92
FIGURE 12 :	Courbe standard de l'activité en luciférase (RLU/s) en fonction du nombre de <i>Leishmania</i>	96
FIGURE 13 :	Effet de la surexpression du DN PKC-α sur la survie de <i>Leishmania donovani</i>	98

FIGURE 14 :	Effet de l'IFNγ sur les macrophages surexprimant le DN PKC-α avant l'infection à Leishmania donovani	100
FIGURE 15 :	Effet de la surexpression du DN PKC-α sur la phagocytose et l'activité microbicide	104

Liste des abréviations

ADNc	: acide déoxyribonucléique complémentaire
ATCC	: «American Type Culture Collection»
BSA	: «Bovine Serum Albumin»
DAG	: diacylglycérol
DMEM	: «Dulbecco's Modified Eagle Medium»
DN	: dominant-négatif
D.O.	: densité optique
EDTA	: acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	: acide éthylène bis(oxyéthylène nitrilo)tétraacétique
ELISA	: «Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay»
ERK	: «Extracellular-signal-Regulated-Kinase»
EtBr	: bromure d'éthide
G418	: généticine
GPI	: glycosylphosphatidylinositol
HBSS	: «Hank's Balanced Salt Solution»
ΙΓΝγ	: interféron gamma
IL	: interleukine
iNOS	: oxyde nitrique synthétase inductible
IP ₃	: inositol triphosphate
JNK/SAPK	: «Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase»
kDa	: kilodaltons
LB	: «Luria Broth»
LBP	: «LPS Binding Protein»
LPS	: lipopolysaccharide
Luc	: luciférase
MAPK	: «Mitogen Actived protein kinases»

MEK	: MAP Kinase activateur ou MAPK-kinase
MEKK	: MEK kinase
MMP-9	: métalloprotéinase-9
NO	: oxyde nitrique
PBS	: tampon salin phosphaté «Phosphate-Buffered saline»
PBS-T	: PBS et Tween-20
[³ H]PDBu	: phorbol 12,13-dibutyrate marqué au tritium
PIP ₂	: phosphatidylinositol biphosphate
РКС	: protéine kinase C
PS	: phosphatidylsérine
РТК	: protéine tyrosine kinase
rpm	: rotations par minute
RLU/s	: unité lumineuse relative par seconde
SDS	: dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	: électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SVF	: sérum de veau foetal
TNF	: facteur nécrosant des tumeurs
Tsm	: mutant thermosensible

Sommaire

Le lipopolysaccharide (LPS) est le plus puissant et le mieux caractérisé des activateurs fonctionnels des macrophages. Sa liaison au récepteur de surface cellulaire engendre une multitude de cascades intracellulaires, incluant la sécrétion de plusieurs molécules immunomodulatrices, comme l'oxyde nitrique et les cytokines proinflammatoires. Dans cette étude, le rôle de l'isoenzyme α de la protéine kinase C (PKC) dans la régulation des fonctions du macrophage reliées aux maladies infectieuses a été analysé. Pour ce faire, la surexpression d'un mutant dominant-négatif (DN) du gène de PKC-α (DN PKC-α) dans la lignée de macrophage murin, RAW 264.7, a été effectuée. Les caractéristiques morphologiques et de croissance des clones surexprimant le DN PKC- α sont identiques aux cellules parentales. Au niveau fonctionnel, la surexpression du DN PKC- α inhibe fortement l'expression du gène de l'IL-1 α et ceux de iNOS et TNFa à des degrés moindres. La surexpression du DN PKC-a n'inhibe pas toutes les réponses au LPS puisque la sécrétion de la métalloprotéinase-9 (MMP-9) est régulée de façon négative par les clones surexprimant le DN PKC- α . De plus, l'induction par le LPS de la phosphorylation et de la dégradation de IkB, l'activation de NF-kB, tout comme la phosphorylation des MAP kinases p38, JNK et MEK1/2 ne sont pas affectées par la surexpression du DN PKC- α .

Cette étude a également permis de démontrer que PKC- α a un rôle important à jouer dans le contrôle de la réplication de deux pathogènes intracellulaires, soit *Leishmania donovani* et *Legionella pneumophila*. Cependant, la surexpression du DN PKC- α dans la lignée de macrophage RAW 264.7 n'a pas affecté leur capacité microbicide puisqu'ils sont capables de tuer *Pseudomonas aeruginosa*.

La surexpression du DN PKC- α dans la lignée de macrophage RAW 264.7 s'est donc avérée un outil de travail profitable, puisqu'il a permis d'apporter plusieurs évidences importantes concernant le rôle de PKC- α dans l'inflammation et dans la défense de l'hôte contre l'infection. Introduction

Les macrophages peuvent être activés pour accomplir une variété de fonctions, incluant la sécrétion d'oxyde nitrique (NO) et de cytokines proinflammatoires, comme le facteur nécrosant des tumeurs (TNF)- α et l'interleukine (IL)-1 α , qui sont d'importants médiateurs impliqués dans la défense de l'hôte et l'inflammation. Les macrophages activés possèdent une très grande capacité à détruire les microbes et les tumeurs (Unanue and Allen, 1987). Par contre, certains parasites intracellulaires, comme *Leishmania donovani* et certaines bactéries intracellulaires Gram-négatives, comme *Legionella pneumophila* ont mis au point des stratégies leur permettant de déjouer les mécanismes microbicides des macrophages.

Les macrophages exposés à l'IFNy subissent plusieurs changements phénotypiques et fonctionnels importants leurs permettant d'être pré-activés, afin d'exécuter certaines fonctions aux détriments d'autres (Adams and Hamilton, 1987). Suite à leur interaction avec un second signal, ces macrophages deviennent complètement activés et acquièrent la capacité à détruire les cellules néoplasiques et les pathogènes intracellulaires et extracellulaires (Adams and Hamilton, 1987).

Le lipopolysaccharide (LPS), est l'un des signaux extracellulaires rencontrés par les macrophages. Le LPS est la principale composante membranaire des bactéries Gramnégatives et le plus puissant et le mieux caractérisé des activateurs fonctionnels des macrophages (Raetz, 1990). La liaison du LPS à son récepteur de surface, engendre une multitude de cascades intracellulaires, incluant la phosphorylation de plusieurs protéines empruntant la voie des tyrosines ou des sérines/thréonines kinases (Wright *et al.*, 1990 ; Weinstein *et al.*, 1991). Des études basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de protéines tyrosines kinases (PTK) démontrent que leur activité est essentielle pour l'exécution des fonctions des macrophages induites par le LPS (Weinstein *et al.*, 1991 ; Dong *et al.*, 1993 ; Shapira *et al.*, 1994). En plus des PTK, la stimulation des macrophages au LPS active la protéine kinase C (PKC) (Shapira *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 1994). Plusieurs expériences utilisant une grande variété d'inhibiteurs de PKC, comme l'inhibiteur H-7, indiquent que l'activité de PKC est requise pour l'expression de plusieurs gènes impliqués dans diverses fonctions du macrophage, comme par exemple la sécrétion du TNF- α et de l'IL-1 α , la production de NO et l'activité anti-tumorale (Shapira *et al.*, 1994; Novotney *et al.*, 1991; Kovacs *et al.*, 1988; Taniguchi *et al.*, 1989).

La PKC a d'abord été caractérisée comme étant une protéine sérine/thréonine kinase Ca²⁺-dépendante et phospholipide-dépendante qui requière le diacylglycérol (DAG) pour son activité (Parker *et al.*, 1986). Par la suite, il a été établit que PKC n'était pas une seule entité, mais plutôt une famille comprenant jusqu'à 12 isoenzymes (Blobe *et al.*, 1996). Étant donné que les isoenzymes de PKC possèdent une structure différente, qu'elles diffèrent au niveau de leur régulation et que leur localisation dans la cellule et leur substrat leurs sont spécifiques, il a été proposé que dans une cellule donnée, plusieurs isoenzymes de PKC peuvent être exprimées tout en exerçant des fonctions spécifiques et différentes (Nishizuka, 1992 ; Dekker and Parker, 1994).

Les monocytes/macrophages expriment les isoenzymes Ca²⁺-dépendantes α , β I, β II, et les isoenzymes Ca²⁺-indépendantes δ , ε et l'isoenzyme atypique ζ (Fujihara *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 1994 ; Zheng *et al.*, 1995 ; Mischak *et al.*, 1991). Jusqu'à maintenant, les études sur chacune de ces isoenzymes impliquées dans les fonctions du macrophage sont limitées et uniquement basées sur la régulation de la production de l'oxyde nitrique. Par exemple, une étude basée sur la régulation à la baisse des différentes isoenzymes de PKC induite par le traitement au phorbol ester de la lignée de macrophages J774, a démontré que PKC- β II participe à l'expression du gène de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS) et à la production de NO dans cette lignée de macrophages activée par le LPS (Fujihara *et al.*, 1994). Plus récemment, une autre étude portant sur des transfections transitoires des différentes isoenzymes de PKC exprimées dans la lignée de macrophage RAW 264.7, a démontré que l'expression du gène iNOS était également régulé par PKC- ε, mais contrairement à PKC- β II, la voie dépendant de PKC-ε n'est pas impliquée dans les réponses induites par le LPS, mais plutôt en réponse à l'activation par le phorbol ester (Diaz-Guerra *et al.*, 1996).

Plusieurs stratégies et méthodes d'études sont utilisées afin de déterminer le rôle spécifique des différentes isoenzymes de PKC dans la régulation des fonctions des macrophages. Parmi ces stratégies, on retrouve fréquemment l'utilisation d'activateurs (comme le phorbol ester) et d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de PKC (comme H-7). Cependant, ces stratégies comportent plusieurs inconvénients. Par exemple, ce type de stratégie ne permet pas de déterminer facilement le rôle spécifique de chacune des isoenzymes de PKC impliquées dans la régulation des fonctions de différents types cellulaires. Dans la présente étude, les efforts ont été centrés sur le rôle de PKC-a impliquée dans la régulation des fonctions du macrophage reliées aux maladies infectieuses. Pour ce faire, l'approche expérimentale utilisée a été de surexprimer un mutant dominant-négatif (DN) de l'isoenzyme- α de PKC dans la lignée de macrophage RAW 264.7. Le choix de la lignée de macrophage RAW 264.7 a été basé sur plusieurs caractéristiques essentielles de cette lignée de macrophage, dont leur capacité à répondre à divers signaux extracellulaires, incluant le LPS et l'INFy, et de phagocyter normalement. De plus, ces macrophages peuvent être transfectés (Stacey et al., 1993) comparativement à un grand nombre de lignées qui en sont incapables. Un mutant dominant-négatif consiste à la modification au site d'attachement à l'ATP de l'isoenzyme mutante donné, résultant en une perte de l'activité kinase de cette même isoenzyme. Le mutant dominant négatif de PKC-a, est un mutant catalytiquement inactif qui agit en compétitionnant avec l'isoenzyme α endogène correspondante (Dekker and Parker, 1994; Jaken, 1996). La surexpression d'isoenzymes de PKC est une approche fructueuse qui a déjà été utilisée dans d'autres lignées cellulaires, afin d'analyser le rôle spécifique des différentes isoenzymes de PKC impliquées dans la croissance cellulaire, la différentiation, la sécrétion d'hormones et la transduction des signaux (Baier et al., 1996; Uberall et al., 1997). Les objectifs de cette étude sont donc : 1) générer des lignées

stables de macrophages surexprimant les formes sauvage et mutante (DN) de PKC- α , 2) analyser l'expression génique et la sécrétion de molécules immunomodulatrices induites par le LPS, 3) caractériser la signalisation dépendante de PKC- α induite par le LPS et 4) déterminer le rôle de PKC- α dans les processus de phagocytose et de destruction des microbes. L'atteinte de ces objectifs précisera le rôle de PKC- α dans l'inflammation et la défense de l'hôte contre l'infection.

Revue bibliographique

1. Macrophages

1.1 Principales fonctions des macrophages

Les macrophages sont présents dans tous les tissus de l'organisme et ils participent à une grande variété d'événements physiologiques et pathologiques. Ces cellules peuvent être activées pour accomplir des fonctions complexes reliées à l'inflammation et à la défense de l'hôte telles que : la destruction des cellules néoplasiques et de pathogènes intracellulaires et extracellulaires, la présentation d'antigènes aux lymphocytes T, ainsi que la sécrétion de plusieurs médiateurs inflammatoires, comme l'oxyde nitrique, plusieurs cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) et les métabolites de l'acide arachidonique. La plupart de ces fonctions, ne sont pas constitutives, étant plutôt acquises. Normalement, les macrophages tissulaires sont à un stade réceptif (Adams and Hamilton,1987). Par la suite, en réponse aux divers signaux extracellulaires rencontrés dans leur microenvironnement, les macrophages subissent des changements fonctionnels et phénotypiques importants leur permettant d'exécuter ces fonctions.

2. Interféron (IFN)y

2.1 Biosynthèse de l'IFNy

Dans l'hôte normal, les lymphocytes T représentent la principale source de production de l'IFN γ . Toutes les populations de cellules T CD8⁺ et une certaine partie des cellules T CD4⁺ peuvent produire de l'IFN γ (Vilcek *et al.*, 1985 ; Schreiber and Celada, 1985). Il a été démontré, par d'autres études, que l'IFN γ peut être également produit par les cellules NK (natural killer) (Handa *et al.*, 1983 ; Bancroft *et al.*, 1992). Mais des études subséquentes ont permis de démontrer que le TNF- α et les macrophages sont deux facteurs requis pour la production de l'IFN γ par les cellules NK (Bancroft *et al.*, 1989 ; Bancroft *et al.*, 1992). De plus, IL-12, qui est un produit des macrophages en réponse à la présence de bactéries, de particules bactériennes ou de parasites, peut induire l'expression génique de l'IFN γ dans les lymphocytes T. Il a été démontré que la sécrétion de IL-12 par ces différentes cellules immunitaires est dépendante de l'induction à l'IFN γ (Wolf *et al.*, 1991; Stern *et al.*, 1990). Une étude plus récente a démontré que IL-12 induit l'expression et la sécrétion de l'IFN γ par les macrophages péritonéaux de souris (Puddu *et al.*, 1997).

2.2 Rôle de l'IFNy dans le défense de l'hôte

Un important rôle physiologique de l'IFNγ est son habileté à réguler l'expression des molécules de classe I et II du CMH à la surface d'une variété de cellules immunitaires, incluant les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (Vilcek et al., 1985; Trinchieri and Perussia, 1985; Basham and

Merigan, 1983; Basham et al., 1985). L'IFNy est une cytokine importante et responsable de l'initiation de l'activation des macrophages, de la régulation de la différentiation et des fonctions des macrophages (Schreiber and Celada, 1985; Adam and Hamilton, 1984). Les macrophages tissulaires réceptifs exposés à l'IFNy subissent plusieurs altérations biochimiques et fonctionnelles, permettant aux macrophages d'entrer dans un nouveau stade d'activation, appelé stade de pré-activation. Par la suite, avec l'interaction des macrophages pré-activés avec un second signal, les macrophages deviennent complètement activés et acquièrent, à ce moment, les capacités à détruire les cellules néoplasiques et les parasites intracellulaires (Adams and Hamilton, 1987). Alors, la fonction à détruire les tumeurs et les parasites intracellulaires exercée par les macrophages est initiée par l'IFNy et est accentuée par le second signal rencontré par les macrophages pré-activés. De plus, l'IFNy réduit la susceptibilité des macrophages à l'infection microbienne (Bancroft et al., 1989; Schreiber, 1986). L'IFNy est un puissant activateur du métabolisme oxydatif (production des divers radicaux oxygène, NO) et de l'activité microbicide exercée par les macrophages humains infectés (Nathan et al., 1983). L'importance de l'IFNy dans la destruction des pathogènes a été également démontrée dans le modèle animal. Les souris pré-traitées à l'IFNy sont capables de détruire des pathogènes, comme Listeria monocytogenes (Bancroft et al., 1987 ; Bancroft et al., 1989; Buchmeier and Schreiber, 1985) ou Leishmania major (Green et al., 1990a) qui sont capables normalement de déjouer la fonction de destruction des macrophages et de s'y répliquer. Également, Murray et collaborateurs ont démontré que l'administration de l'IFNy avant l'infection, augmente à la fois les activités oxydative et microbicide des macrophages péritonéaux de souris infectés (Murray et al., 1985). Parallèlement, les macrophages provenant de souris déficientes pour l'IFNy se sont avérés déficients quant à leur capacité à produire du TNF- α et du NO (Nansen *et al.*, 1998).

3. Lipopolysaccharide

3.1 Principales caractéristiques du LPS

Le LPS, est l'un de ces seconds signaux extracellulaires rencontrés par les macrophages. Le LPS est la plus importante composante membranaire des bactéries Gram-négatives et le plus puissant et le mieux caractérisé des activateurs fonctionnels des macrophages (Raetz, 1990). Les macrophages activés par le LPS ont une très grande capacité à détruire les microbes et les tumeurs (Unanue and Allen, 1987) et ils sécrètent une grande variété de médiateurs inflammatoires telle que l'interleukine (IL)-1, IL-6, le facteur nécrosant des tumeurs (TNF)-α (Wright et al., 1990), l'oxyde nitrique (NO) et les métabolites de l'acide arachidonique (Morrison and Ryan, 1987) et une variété d'hydrolases, incluant la métalloprotéinase de type 9 (MMP-9) (Van Ranst et al., 1991). Par contre, une stimulation excessive des macrophages et des autres cellules du système immunitaire par le LPS, rencontrée au cours d'infections bactériennes sévères à Gramnégatives, provoque une importante sécrétion de ces médiateurs, particulièrement le TNF- α , cause des dommages tissulaires importants et peut mener au choc endotoxique (Weinstein et al., 1992). Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes et des événements intracellulaires impliqués dans l'activation des macrophages par le LPS, permettront une meilleure compréhension des voies de signalisation et de la régulation des réponses cellulaires impliquées dans l'inflammation et la défense de l'hôte contre l'infection et apporteront également de nouvelles approches permettant le traitement du choc endotoxique.

3.2 LBP (LPS Binding Protein)

Le LPS peut se lier à une grande variété de protéines du sérum, mais l'interaction la mieux caractérisée est celle entre le LPS et la LBP (LPS Binding Protein). La LBP, une glycoprotéine du sérum de 60 kilodaltons, a la capacité de se lier avec grande affinité à la région conservée du LPS, le lipide A (Tobias *et al.*, 1989), qui est le domaine responsable de la toxicité reliée au LPS (Raetz, 1990; Rietschel and Brade 1992). La LBP ne peut pas se lier aux phagocytes en absence du LPS (Wright *et al.*, 1989). La LBP augmente les effets des différents médiateurs induits par le LPS, comme par exemple la sécrétion de cytokines, la production de NO et des métabolites de l'acide arachidonique (Martin *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1992; Corradin *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1991; Surette *et al.*, 1993).

3.3 Molécules de surface se liant au LPS

Il existe plusieurs récepteurs cellulaires du LPS (Lei and Morrison, 1988 ; Lei *et al.*, 1991 ; Hampton *et al.*, 1991 ; Wright *et al.*, 1990 ; Ingalls and Golenbock, 1995). Parmi ces récepteurs, trois molécules exprimées à la surface des monocytes/macrophages sont connus comme étant capables de se lier au lipide A, soit le CD14, le récepteur «scavenger» (SR) et la famille des β_2 intégrines (CD11a/CD18, CD11b/CD18 et CD11c/CD18) (Fenton and Golenbock, 1998). Le CD14 et le CD11/CD18, sont tous les deux capables d'initier les signaux cellulaires résultant de l'activation du monocyte/macrophage, comme l'internalisation de bactéries (phagocytose et endocytose) et l'activation des défenses bactériennes (Fenton and Golenbock, 1998). Ces récepteurs sont également capables d'interagir avec les protéines du sérum pour augmenter leur capacité dans la signalisation cellulaire (Fenton and Golenbock, 1998). Par contre, il a été démontré que la signalisation induite par CD11c/CD18, est beaucoup moins rapide et

moins importante que celle impliquant le CD14 (Sweet and Hume, 1996). De plus, il existe plusieurs évidences dans la littérature qui confirment que le CD14 est la seule protéine connue, avec sa structure très bien définie, qui est capable de se lier au LPS tout en permettant l'activation cellulaire induite par le LPS (Ulevitch, 1993; Ulevitch and Tobias, 1994). Voici quelques évidences : Hailman et collaborateurs (Hailman et al., 1994) ont établit que le LPS se lie au CD14. Des anticorps monoclonaux directement dirigés contre CD14 inhibent l'habileté du LPS à se lier au CD14 et à stimuler les macrophages, diminuant entre autre la sécrétion de TNF-a induite par le LPS (Wright et al., 1990; Kirkland et al., 1993). De plus, la transfection du CD14 dans la lignée cellulaire pré-B 70Z/3 augmente les réponses de ces cellules au LPS de plus de 1 000 fois. Ainsi, le CD14 est important pour l'induction des réponses au LPS, même chez les lymphocytes B qui n'expriment pas normalement le CD14 (Lee et al., 1992). Et, la transfection du CD14 dans les cellules fibroblastiques CHO (Chinese Hamster Ovary cells) transforme ces cellules hyposensibles au LPS en cellules hypersensibles au LPS (Golenbock et al., 1993; Viriyakosol and Kirkland, 1995). Toutes ces observations physiologiques ont été confirmées par un modèle animal. Des souris déficientes en CD14 (CD14^{-/-}) sont 10 000 fois moins sensibles au LPS comparativement aux souris contrôles exprimant le CD14 (Haziot et al., 1996; Haziot et al., 1995).

3.3.1 CD14

Le CD14 est une glycoprotéine de 55 kilodaltons présente sous deux formes : une forme ancrée dans la membrane des cellules myéloïdes (mCD14), grâce à une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI) et une forme soluble (sCD14) sans l'ancre GPI (Haziot *et al.*, 1988; Simmons *et al.*, 1989; Bazil *et al.*, 1989; Ziegler-Heitbrock and Ulevitch, 1993). La forme soluble, sCD14, est présente dans le sang (Bazil *et al.*, 1989) et facilite l'activation des cellules qui n'expriment pas CD14 à leur surface (Frey *et al.*,

1992; Pugin et al., 1993). Ainsi, l'attachement du complexe LPS/LBP au CD14, représente la principale voie impliquée dans la signalisation induite par le LPS (Manthey and Vogel, 1994). Par contre, une question importante se pose et reste encore à clarifier, à savoir : comment le CD14 induit la transduction du signal suite à son interaction avec le LPS en absence de domaine intracytoplasmique? Pour tenter d'expliquer cette question, trois modèles d'activation du LPS ont été proposés (voir Figure 1) (Ulevitch and Tobias, 1995). Le MODÈLE I est principalement basé sur un seul récepteur, le mCD14. Ce modèle propose que la signalisation est initiée suite à l'interaction du complexe LPS/LBP au mCD14. Par ce modèle, la communication à l'intérieur de la cellule est engendrée par une protéine transmembranaire qui reconnaît la GPI du mCD14. Les MODÈLES II et III suggèrent que le récepteur du LPS, le mCD14, est la principale sous-unité d'attachement au ligand, le LPS, mais qu'une protéine transmembranaire additionnelle permet la transduction du signal. Le MODÈLE II propose que suite à l'attachement au LPS, le mCD14 subit des changements de conformation, lui permettant d'interagir avec la seconde protéine transmembranaire afin d'initier la transduction du signal. Par contre, dans ce modèle, la protéine transmembranaire est incapable, à elle seule, de se lier au LPS. Le MODÈLE III propose que le mCD14 permet la liaison de la seconde protéine transmembranaire au LPS, pour ensuite initier la transduction du signal. Par le MODELE III, il a été démontré qu'en absence du CD14, la molécule transductrice se lie au LPS, mais avec une plus faible affinité, donnant ainsi une signification à la signalisation CD14indépendante (Ulevitch and Tobias, 1995).

3.3 2 Récepteur Toll-like (TLR)

Basé en partie sur ce troisième modèle d'activation du LPS, Yang et collaborateurs ont démontré récemment que le TLR (Toll-like receptor) serait la molécule responsable de l'induction de la signalisation cellulaire par le LPS (Yang *et al.*, 1998).





Modèle III

Figure 1 : Modèles d'activation du LPS

(adapté de Ulevitch and Tobias, 1995)

Le TLR a été d'abord observé chez la Drosophile, et maintenant cinq TLR (TLR1-5) ont été clonés chez l'humain. Le TLR est une protéine transmembranaire, dont la région intracellulaire est similaire à celle du récepteur de IL-1 (Belvin and Anderson, 1996). Le TLR2 est fortement exprimé à la surface des monocytes/macrophages et davantage lorsque ceux-ci sont stimulés au LPS (Yang *et al.*, 1998). Le TLR4 est également présent à la surface de monocytes/macrophages. Il a été démontré que le TLR2 est capable de répondre de façon spécifique et sélective au LPS en présence de la LBP et du CD14. De plus, la région intracellulaire du TLR est essentielle pour la transduction du signal induite par le LPS. La dimérisation de ce récepteur permet l'activation de plusieurs cascades intracellulaires, comme l'activation du facteur de transcription NF- κ B et l'induction de l'expression des cytokines proinflammatoires, suggérant que les TLR, chez l'humain, participent aux réponses immunitaires et à l'activation du signal de l'immunité adaptative (Medzhitov *et al.*, 1997).

4. Signalisation cellulaire induite par le LPS

4.1 LPS induit les protéines tyrosines kinases (PTK)

La liaison du complexe LBP/LPS au récepteur de surface cellulaire engendre une multitude de cascades intracellulaires, incluant la phosphorylation de plusieurs protéines dont les tyrosines ou les sérines/thréonines kinases (Wright *et al.*, 1990 ; Weinstein *et al.*, 1991). Plusieurs études ont mis à profit l'importance des protéines tyrosines kinases (PTK) dans les fonctions du macrophage induites par le LPS. Il a été démontré que des inhibiteurs de PTK, comme l'herbimycine A et la génistéine, inhibent la phosphorylation des PTK et bloquent les fonctions induites par le LPS (Weinstein *et al.*, 1991 ; Shapira *et al.*, 1994). Également, il a été démontré que la phosphorylation des PTK est nécessaire

pour la sécrétion de cytokines comme le TNF- α et IL-1 β (Stefanova *et al.*, 1993). Plusieurs PTK sont activées par le LPS, incluant trois tyrosines kinases de la famille des Src, soient Hck, Fgr et Lyn (Beaty *et al.*, 1994 ; English *et al.*, 1993). Une étude récente a permis de démontrer que l'activation des macrophages induits par le LPS était normale dans des cellules déficientes en Hck, Fgr et Lyn (Hck ^{+/-}, Fgr ^{+/-} et Lyn ^{+/-}). Ceci indique que ces trois Src tyrosine kinases ne sont pas essentielles pour la transduction du signal induit par le LPS (Meng and Lowell, 1997). De plus, une étude récente sur la kinase p72^{syk} a permis de révéler que les réponses reliées au LPS sont aussi normales dans les macrophages de souris déficients en Syk (Syk ^{-/-}) (Crowley *et al.*, 1997). Ainsi, d'autres protéines kinases que les membres de la famille des Src et des Syk sont requises pour la transduction du signal induite par le LPS et il ne faudrait également pas ignorer l'argument que les résultats rapportés pourraient indiquer une certaine redondance dans l'utilisation des PTK (incluant celles étudiées) pour la transduction du signal par le LPS.

4.2 LPS induit les «Mitogen-Actived Protein Kinases» (MAPK)

En plus des PTK, le LPS induit l'activation des MAPK (Mitogen-Actived Protein Kinase). Les MAPK requièrent une double phosphorylation de leurs résidus thréonines et tyrosines pour qu'il y ait activité enzymatique, contrairement aux PTK qui ne requièrent qu'une seule phosphorylation de leurs résidus sérines/thréonines ou tyrosines (Ulevitch and Tobias, 1995). Les MAPK sont un groupe de sérines/thréonines protéines kinases qui est activé par plusieurs stimuli extracellulaires. Le modèle typique d'activation des MAPK consiste en trois protéines kinases qui agissent successivement à l'intérieur d'une même cascade : MEKK (MEK kinase), MEK (MAP kinase activateur) et MAP kinase (aussi connu sous le nom de ERK : extracellular-signal-regulated-kinase). La MAP kinase traduit le signal au noyau, où il y a phosphorylation et activation des facteurs de

transcription qui régulent l'induction des gènes immédiats (Alvarez *et al.*, 1991 ; Seth *et al.*, 1991). Cette cascade donne de l'information à partir de la connexion de la cellule à son récepteur de surface vers les facteurs de transcription spécifiquement impliqués, afin de permettre aux signaux extracellulaires de réguler l'expression de gènes spécifiques. (Cobb and Goldsmith, 1995 ; Seger and Krebs, 1995).

Il existe jusqu'à maintenant trois principales voies d'activation des MAPK (voir Figure 2). La voie des MAPK la plus caractérisée est celle impliquant Raf-1, MEK1 et MEK2, et ERK1 et ERK2 et une grande variété de processus cellulaires, incluant la régulation de réponses induites par le LPS (Reimann et al., 1994; Hambleton et al., 1995). Raf-1, qui interagit directement avec Ras, est un important intermédiaire dans la voie impliquant l'activation de la MAPK ERK1/2 (Howe et al., 1992; Moodie et al., 1993). Raf-1 participe à l'activation de la MAPK ERK1/2 via deux voies : Rasdépendant et Ras-indépendant (Buscher et al., 1995). De plus, Raf-1 est capable de phosphoryler et d'activer in vivo et in vitro MEK1/2, qui est une MAPK-kinase directement en amont de la MAPK ERK1/2 (Van Aelst et al., 1993; Dent et al., 1992; Kyriakis et al., 1992). Le LPS induit également la voie des MAPK impliquant la p38, un important régulateur de la biosynthèse de cytokines inflammatoires (Han et al., 1994; Lee et al., 1994). Plus récemment, Gupta et collaborateurs (Gupta et al., 1995), ont suggérés que le LPS induisait la phosphorylation de la MAPK p38 dans la lignée de macrophage RAW 264.7. Finalement, la troisième voie des MAPK activée par le LPS est celle impliquant les MEKK-1 et MKK4 (aussi connu sous le nom de SEK-1 ou JNKK), qui mène à l'activation de JNK/SAPK (Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (Kyriakis et al., 1994; Hambleton et al., 1996). Les cytokines proinflammatoires (comme le TNF- α) et un environnement de stress cellulaire active les MAPK JNK (Karin and Hunter, 1995) et p38 (Raingeaud et al., 1995). Concernant l'activation des MAPK, on ne connaît pas encore comment le signal généré à partir de l'interaction du LPS à son récepteur cellulaire, permet l'activation de ces trois différentes voies des MAPK, mais, à



Figure 2 : Activation des MAP kinases

(Adapté de DeFranco et al., 1998)

ce jour, on sait que ces trois principales voies d'activation des MAPK existent et que le LPS induit leur activation.

4.3 LPS induit la protéine kinase C (PKC)

En plus des PTK et des MAPK, la stimulation des macrophages au LPS active la protéine kinase C (PKC) (Shapira *et al.*, 1994 ; Fujihara *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 1994). PKC interagit également avec la cascade d'activation des MAPK, particulièrement la voie impliquant Raf-1 (Blobe *et al.*, 1996). L'existence d'une interaction entre la voie Rasindépendante de la MAPK ERK1/2 et PKC a été suggérée par des études basées sur les mécanismes d'activation de Raf-1. Ces études ont permis de révéler que le diacylglycérol régulerait les isoenzymes de PKC, incluant PKC- α , comme activateurs de Raf-1 dans un modèle *in vivo* (Kolch *et al.*, 1993 ; Cai *et al.*, 1997). Par contre, les mécanismes d'activation de PKC- α , dans cette voie Ras-indépendante, suite à la stimulation cellulaire sont encore inconnus (Diaz-Meco *et al.*, 1994b). De plus, il a été démontré que la production de TNF- α et d'IL-1 β par les monocytes en réponse à la stimulation au LPS, requière à la fois la voie intracellulaire des PTK et de PKC. Ces deux voies sont requises pour l'activation de la transcription des gènes de ces cytokines (Shapira *et al.*, 1994).

5. Protéine kinase C (PKC)

5.1 Principales caractéristiques et caractéristiques structurelles de PKC

PKC, une protéine hydrophobique de 77-87 kilodaltons (Blobe et al., 1996), a d'abord été caractérisée comme étant une sérine/thréonine kinase calcium (Ca²⁺)dépendante et phospholipide-dépendante requérant le diacylglycérol (DAG) pour son activité (Nishizuka, 1988; Parker et al., 1986). Par la suite, il a été établit que PKC n'était pas une seule entité, mais plutôt une famille comprenant jusqu'à 12 isoenzymes (Blobe et al., 1996). Cette famille comprend les isoenzymes : α , β I, β II, γ , δ , ε , η , θ , ζ , ι , μ et λ . Structurellement, les isoenzymes de PKC sont composées d'une seule chaîne de polypeptides (voir Figure 3). Cette structure protéique est divisée en deux domaines ; un domaine de régulation à l'extrémité N-terminale et un domaine catalytique à l'extrémité C-terminale. Ces deux domaines sont à leur tour divisés en quatre régions conservées (C1 à C4) et de cinq régions variables (V1 à V5). Ces régions sont variables entre chacune des isoenzymes, mais conservées entre les isoenzymes de la même espèce (Nishizuka, 1988). En se basant sur leur structure et sur leur exigence en cofacteurs, les isoenzymes de PKC peuvent être divisées en deux groupes principaux, soit les PKC Ca2+dépendantes ou PKC conventionnelles (cPKC : α , β I, β II et γ), et les Ca²⁺-indépendantes. Le second groupe comprend les PKC nouvelles (nPKC : δ , ε , η et θ) et les PKC atypiques $(aPKC : \zeta, \iota, \mu \text{ et } \lambda).$




5.2 Activation de PKC

Le DAG, le calcium et les phospholipides (principalement la phosphatidylsérine) sont les trois principales sources d'activation des différentes isoenzymes de PKC. Le DAG peut être produit par deux voies. La voie principale est celle empruntant le clivage de phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) résultant deux seconds messagers : le DAG et l'inositol triphosphate (IP₃). IP₃ interagit avec le réticulum endoplasmique pour augmenter les niveaux de Ca²⁺ intracellulaire (Berridge, 1993). Une augmentation du Ca²⁺-intracellulaire intervient dans la translocation de PKC au niveau membranaire permettant à PKC d'interagir avec le DAG, afin d'être activée. Le DAG active PKC en diminuant les exigences de PKC en phosphatidylsérine (PS) et en Ca²⁺ à des niveaux physiologiques (Kishimoto, 1980). La seconde voie est celle empruntant l'hydrolyse de phosphatidylcholine (PC), la voie des acides gras, produisant à plus long terme du DAG. Alors, cette seconde voie est empruntée dans les phases tardives de la réponse cellulaire et par les PKC atypiques, qui ne requièrent pas le DAG, mais sont plutôt activées par divers phospholipides produits par la voie des acides gras, incluant la phosphatidylsérine (PS) et l'acide arachidonique (Nishizuka, 1992 ; Nishizuka, 1995).

Plusieurs fonctions d'activation sont rattachées aux régions conservées (C1 à C4) des isoenzymes de PKC. La région C1, qui est constituée de deux motifs riches en cystéine, est le domaine d'attachement à la membrane. Cette région est également nécessaire pour l'attachement du DAG et du phorbol ester. La région C2 est responsable de l'exigence en Ca²⁺ de l'isoenzyme. La région C3 contient le site d'attachement à l'ATP, un motif important pour l'activité catalytique de l'isoenzyme. Et la région C4 semble être nécessaire pour la reconnaissance de son substrat afin d'être phosphorylée (Hug and Sarre, 1993 ; Nishizuka, 1992). En résumé, les PKC conventionnelles, qui possèdent ces quatre régions, sont activées par le Ca²⁺, la PS et le DAG. Les PKC

nouvelles, qui ne possèdent pas de région C2, sont Ca²⁺-indépendantes, mais sont activées par la PS et le DAG. Enfin, les isoenzymes atypiques, qui ne possèdent qu'un seul motif riche en cystéine, sont indépendantes du DAG, du phorbol ester et du Ca²⁺ (Nathan, 1987; Nelson *et al.*, 1991), mais sont activées par divers phospholipides produits par la voie des acides gras, incluant la phosphatidylsérine (PS) et l'acide arachidonique (Nishizuka, 1992; Nishizuka, 1995).

5.3 Localisation de PKC

En plus d'avoir des structures différentes, les isoenzymes de PKC sont exprimées dans des tissus et des cellules spécifiques. Par exemple, le tissu où l'on retrouve le plus d'isoenzymes de PKC est le cerveau, alors que la peau et le système musculaire ne contiennent que quelques isoenzymes de PKC. De plus, les isoenzymes α et ζ sont pratiquement exprimées dans tous les tissus, alors que les isoenzymes γ et n sont exprimées que dans certains tissus (Blobe *et al.*, 1996). Ainsi, l'isoenzyme γ est exprimée uniquement dans le cerveau (Nishizuka, 1988). Les monocytes/macrophages expriment les isoenzymes Ca^{2+} -dépendantes α , βI , βII , et les isoenzymes Ca^{2+} indépendantes δ , ε et l'isoenzyme atypique ζ (Fujihara et al., 1994; Liu et al., 1994; Zheng et al., 1995; Mischak et al., 1991). Les isoenzymes de PKC sont également localisées dans des compartiments différents à l'intérieur de la cellule (voir Figure 4). Les sites de localisation intracellulaires où l'on retrouve les isoenzymes de PKC sont la membrane cellulaire, le cytosquelette, le noyau et les organelles (réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi). PKC-α semble être transloquée au niveau du cytosquelette dans plusieurs types cellulaires (Blobe et al., 1996). Dans le macrophage, PKC- α et PKC- β sont exprimées au niveau de la membrane des phagosomes (Allen and Aderem, 1995; Allen and Aderem, 1996; Buchwalow et al., 1997). Étant donné que les isoenzymes de PKC possèdent une structure différente, qu'elles diffèrent au niveau de



Figure 4 : Localisation intracellulaire des isoenzymes de PKC (adapté de Gunning *et al.*, 1998)

leur régulation et que leur localisation dans la cellule et leur substrat leurs sont spécifiques, il a été proposé que dans une cellule donnée, plusieurs isoenzymes de PKC peuvent être exprimées tout en exerçant des fonctions spécifiques et différentes (Nishizuka, 1992 ; Dekker and Parker, 1994).

5.4 Fonctions spécifiques des différentes isoenzymes de PKC

Plusieurs études ont permis de démontrer l'implication de PKC dans le régulation des réponses induites par le LPS chez le macrophage. Entre autre, le LPS active la PKC (Shapira et al., 1994; Fujihara et al., 1994; Liu et al., 1994; Shapira et al., 1997) et le traitement des macrophages avec des inhibiteurs de PKC, comme l'inhibiteur H-7, bloque diverses réponses au LPS, dont la sécrétion de TNF- α , IL-1 et de prostanglandines, la production de NO et l'activité anti-tumorale (Shapira et al., 1994; Novotney et al., 1991; Kovacs et al., 1988; Taniguchi et al., 1989; Burch, 1987). Malgré ces études, très peu est connu concernant l'identité, la régulation et le rôle de chacune de ces isoenzymes de PKC impliquées dans la transduction du signal du macrophage induit par le LPS. Jusqu'à maintenant, les études sur le rôle des isoenzymes de PKC dans les fonctions du macrophage ont été limitées sur l'étude de la régulation de la production de l'oxyde nitrique. Par exemple, une étude basée sur la régulation à la baisse des différentes isoenzymes de PKC induite par le traitement de la lignée de macrophages J774 au phorbol ester, a permis de démontrer que PKC-BII participe à l'expression du gène de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS) et à la production de NO induites par le LPS (Fujihara et al., 1994). Plus récemment, une étude par transfections transitoires des différentes isoenzymes de PKC exprimées dans la lignée de macrophage RAW 264.7 a démontré que l'expression du gène iNOS était également régulé par PKC-ɛ, mais contrairement à PKC-BII, la voie dépendant de PKC-e n'est pas impliquée dans les réponses induites par le LPS, mais plutôt en réponse à l'activation par le phorbol ester (Diaz-Guerra et al., 1996).

5.5 Avantages et inconvénients des stratégies et des méthodes d'étude des différentes isoenzymes de PKC

L'utilisation d'activateurs et d'inhibiteurs de PKC est une stratégie d'étude très utilisée qui comporte cependant plusieurs inconvénients. Par exemple, même si le calcium est important pour activer uniquement les isoenzymes Ca²⁺-dépendantes et que le phorbol ester et /ou le DAG n'influencent pas les isoenzymes atypiques, la plupart des activateurs de PKC connus sont incapables de faire la distinction entre chacune des isoenzymes, spécifiquement à l'intérieur des sous-familles. Le même problème s'impose pour les inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de PKC, comme le H-7. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'inhibiteurs assez sélectifs et assez spécifiques pour une isoenzyme de PKC donnée sans avoir d'effet d'inhibition sur d'autres composantes ou constituants cellulaires.

Il existe plusieurs autres stratégies et méthodes afin de déterminer le rôle de chacune des isoenzymes de PKC impliquées dans la régulation des fonctions cellulaires. Tout d'abord, l'utilisation d'oligonucléotides antisens est une approche qui a servi à démontrer le rôle de plusieurs isoenzymes de PKC dans différentes fonctions cellulaires. Cette approche a été utilisée pour démontrer le rôle de PKC- β I et β II dans la différentiation cellulaire (Gamard *et al.*, 1994) et le rôle de PKC- α dans l'induction de la molécule intercellulaire d'adhésion de type 1 (ICAM-1) par le phorbol ester dans les cellules humaines A549 (Dean *et al.*, 1994) et dans l'activation de la phospholipase D dans les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Cells) (Balboa *et al.*, 1994). Et tout récemment, cette approche a été utilisée pour démontrer le rôle des PKC- α , β I, δ et η dans l'expression du gène iNOS et l'implication du facteur de transcription NF- κ B dans la lignée de macrophages RAW 264.7 stimulés au LPS (Chen *et al.*, 1998). Par contre, cette approche peut avoir des conséquences ou peut causer des modifications importantes au niveau de l'expression de certains gènes ou affecter d'autres constituants cellulaires

importants (comme les MAPK). L'oligonucléotide antisens n'agit pas directement sur l'isoenzyme de PKC, mais plutôt au niveau de l'ARNm de cette isoenzyme de PKC. Ainsi, l'oligonucléotide antisens peut s'hybrider de façon aléatoire sur d'autres gènes ayant cette séquence similaire et interagir avec d'autres voies de signalisation. Également, des souris déficientes pour une isoenzyme donnée (fait jusqu'à maintenant pour les isoenzymes β et γ (Leitges *et al.*, 1996; Abeliovich *et al.*, 1993a,b), est un autre type de stratégie utilisée. Par contre, ce dernier type de stratégie pourrait rencontrer des inconvénients ou des obstacles considérables, puisque l'isoenzyme de PKC pourrait être essentielle à la survie de l'animal ou à un type de cellule donné ou même avoir des conséquences considérables sur d'autres isoenzymes de PKC ou sur d'autres voies de signalisation cellulaires. Alors, puisqu'on ne connaît pas encore parfaitement les rôle spécifiques de chacune des isoenzymes de PKC dans la régulation des fonctions cellulaires, cette dernière approche pourrait être tragique pour l'animal ou le type cellulaire déficient. Finalement, la surexpression d'isoenzymes de PKC est une approche fructueuse et qui a déjà été utilisée dans d'autres lignées cellulaires, afin d'analyser le rôle spécifique des différentes isoenzymes de PKC impliquées dans la croissance cellulaire, la différentiation, la sécrétion d'hormones et la transduction des signaux (Baier et al., 1996; Uberall et al., 1997). La surexpression d'un mutant dominant-négatif (DN) d'une isoenzyme de PKC donnée, est aussi une approche fructueuse pour l'étude des fonctions de cette isoenzyme. Un mutant dominant négatif est un mutant catalytiquement inactif qui agit en compétitionnant avec l'isoenzyme endogène correspondante (Dekker and Parker, 1994 ; Jaken, 1996). Alors, la surexpression de la forme sauvage et mutante (DN) d'une isoenzyme de PKC donnée, est une approche profitable, puisque cette stratégie d'étude agit directement sur l'isoenzyme de PKC donnée et donnerait ainsi de l'information directement sur le rôle de cette isoenzyme de PKC dans la régulation des fonctions cellulaires étudiées. Par contre, un inconvénient important pourrait survenir par l'utilisation de cette approche, si la surexpression de la forme sauvage et/ou mutante (DN) d'une isoenzyme donnée de PKC s'avérait toxique pour le type cellulaire d'intérêt.

6. Facteurs de transcription induits par le LPS

Plusieurs études sont basées sur l'élucidation des mécanismes responsables de la transmission nucléaire impliquée lorsque des signaux sont générés à partir de l'interaction de l'activateur (comme par exemple le LPS) à son récepteur cellulaire. L'activation des facteurs de transcription est une étape cruciale dans ce processus. Il existe plus de 20 gènes qui sont induits par le LPS et 19 d'entre eux ont été caractérisés comme étant des gènes possédant des éléments de réponse au LPS, LRE pour LPS-response element (Sweet and Hume, 1996). Les facteurs de transcription qui se lient au LRE sont : NF- κ B/Rel, AP-1, NF-IL6, IL-1β-UNF1, NF-1β, NF-βA, c-Jun/ATF2, la protéine d'attachement-IRSE, NF-M, les membres de la famille de ATF, c-Jun et le nouveau facteur de transcription nommé, protéine d'attachement-LRE_{AA} (Sweet and Hume , 1996 ; Xie, 1997). Parmi tous ces facteurs de transcriptions, NF- κ B est celui qui est le plus étudié et un des plus importants médiateurs intracellulaires impliqués dans les réponses induites par le LPS (Baeuerle and Henkel, 1994).

6.1 NF-κB

6.1.1 Description de NF-KB et de IKB

NF-κB joue un rôle crucial dans la régulation de plusieurs gènes (cytokines, protéines de la phase aiguë et molécules d'adhésion). NF-κB est un hétérodimère composé des sous-unités 50 KDa (p50) et 65 KDa (p65) et NF-κB est un membre de la famille des protéines Rel. Chacun des membres de cette famille possède une région conservée de 300 acides aminées à leur position N-terminale, connue comme étant un

domaine homologue des Rel, RHD (Rel homology domain). Cette région est responsable de l'attachement à l'ADN, la dimérisation et de l'interaction avec les membres de la famille de IκB. NF-κB est présent dans une grande variété de cellules. Dans la plupart des cellules, à l'exception des cellules B matures, NF-κB est localisé dans le cytoplasme sous une forme inactive (Baeuerle and Baltimore, 1988a,b). L'activation de NF-κB est régulée par un inhibiteur cytoplasmique, IκB. IκB est lié à NF-κB et masque son signal de localisation nucléaire et retient NF-κB au niveau du cytoplasme (Verma *et al.*, 1995 ; Hansen *et al.*, 1994). Comme NF-κB, IκB est une membre d'une grande famille de protéines, comprenant IκB-α, IκB-β, IκB-ε, IκB-γ et Bcl-3 (Ghosh *et al.*, 1998). Tous ces membres, à l'exception de Bcl-3, inhibent l'activité de NF-κB (Baeuerle and Baltimore, 1988a,b). Le mieux caractérisé des membres de IκB et le premier cloné est IκB-α (Kopp and Ghosh, 1995). IκB-α est une protéine de 37 KDa et est phosphorylée à son domaine N-terminal en réponse au signal activateur (Verma *et al.*, 1995).

6.1.2 Activation de NF-κB

Un des plus intéressants aspects concernant NF- κ B, est la variété et la nature de ses activateurs. Le signal d'activation peut être dû à un stress cellulaire (intermédiaires de la réaction d'oxygène (ROI), rayons U.V) ou lors d'infection bactérienne ou virale (LPS, particules virales) (voir Figure 5). Certains activateurs sont même leurs propres produits impliqués dans l'activation de la cascade intracellulaire de NF- κ B, comme par exemple, TNF- α et IL-1. La nature des signaux qui mènent à l'activation de NF- κ B, suggère que NF- κ B joue un rôle important dans les réponses immunitaire et inflammatoire (Ghosh *et al.*, 1998).



(Adapté de Ghosh et al., 1998)

Donc, c'est suite à une stimulation cellulaire par l'un de ces trois types d'activateur que la phosphorylation de IkB sur ses résidus sérines spécifiques (Ser-32 et Ser-36 pour $I\kappa B-\alpha$ et Ser-19 et Ser-23 pour $I\kappa B-\beta$) (Verma et al., 1995) dûe à l'activation d'une $I\kappa B$ kinase, IKK- α , est d'abord amorcée. IKK- α est d'une importance cruciale dans l'activation de NF-kB, surtout en réponse aux cytokines proinflammatoires, comme TNFα et IL-1 (DiDonato et al., 1997; Régnier et al., 1997). Le rôle de PKC-ζ dans ce processus menant à l'activation de NF-κB a été proposé en démontrant que PKC-ζ était associée à l'activité ou était capable d'agir comme IKK- α et que la surexpression d'un mutant DN PKC-ζ bloquait l'activation de NF-κB (Diaz-Meco et al., 1993; Diaz-Meco et al., 1994a; Folgueira et al., 1996). Par la suite, la dissociation du complexe cytoplasmique NF-kB/IkB phosphorylé est effectuée. Suivie d'une part, de la polyubiquitination de IkB et de sa dégradation dans les protéasomes et d'autre part, de la translocation de NF- κ B au noyau et de sa fixation sur des séquences consensus d'ADN spécifiques (Baeuerle and Henkel, 1994), où l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires sont générés (Ghosh et al., 1998). Comme par exemple, l'activation de NF- κ B stimule l'expression de certaines cytokines (IL-1, et TNF- α), certaines molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1), certaines protéines impliquées dans la réponse de la phase aiguë (C3 du complément et l'angiotensinogène) et les protéines REL et I κ B α impliquées dans la régulation des réponses de NF- κ B (Ghosh *et al.*, 1998). Des études récentes ont permis de révéler que le promoteur du gène iNOS requière à la fois l'élément d'attachement de NF-kB et de LRE_{AA} pour son activation transcriptionnelle par le LPS (Xie, 1997).

Il a été également démontré que le traitement des cellules avec des inhibiteurs de protéasomes cause une accumulation de I κ B dans les cellules stimulées par l'un des activateurs de NF- κ B et inhibent l'activation de NF- κ B (DiDonato *et al.*, 1995). Les résultats de cette étude suggèrent que la phosphorylation de I κ B à sa partie N-terminale est nécessaire pour sa poly-ubiquitination et sa dégradation dans les protéasomes et que

ces deux étapes sont importantes et essentielles pour l'activation de NF- κ B par ces divers signaux activateurs (Verma *et al.*, 1995).

6.2 AP-1

Le facteur de transcription AP-1 (activator-protein 1) est également induit par le LPS. AP-1 est l'un des principaux facteurs de transcription impliqué dans la régulation du gène de l'IL-2 (Baier *et al.*, 1996). AP-1 est un dimère composé des membres des familles Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2 et FosB2) et Jun (c-Jun, JunB et JunD) (Hambleton *et al.*, 1996). Il a été démontré, par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de PKC (Ioannides *et al.*, 1990 ; Kvanta *et al.*, 1992) ou par le traitement chronique au phorbol ester (Jain *et al.*, 1992 ; Valge *et al.*, 1988), que PKC serait impliquée dans l'activation de AP-1 dans les lymphocytes T. Par contre, l'identification des isoenzymes spécifiques de PKC responsables de la transcription de AP-1 et de son mode d'activation sont encore inconnus. Récemment, il a été démontré de PKC θ , une isoenzyme spécifique de la cascade d'activation des lymphocytes T, induit la transcription du gène de AP-1 (Baier *et al.*, 1996).

Également, l'activité de AP-1 est en partie régulée par l'induction de la transcription des gènes *c-jun* et *c-fos* ou par la modification post-transcriptionnelle de leurs produits (Karin and Hunter, 1995). Tout comme le facteur de transcription NF- κ B, c-Jun est exprimé de façon constitutive et sous la forme inactive dans les cellules. c-Jun est activé par la phosphorylation de ces résidus sérines (Ser-63 et Ser-73) lors de l'interaction de l'activateur cellulaire à son récepteur membranaire (Karin and Hunter, 1995).

Il a été démontré que deux membres de la famille des MAPK, soit JNK et ERK sont transloqués au noyau (Karin and Hunter, 1995), indiquant l'implication des facteurs de transcription. Des études ont permis de démontrer que l'activation de JNK induit la phosphorylation des facteurs de transcription c-Jun et ATF2 (activating transcription factor 2) (Gupta *et al.*, 1995) qui sont impliqués dans la régulation du complexe AP-1 et du promoteur *c-jun* (Karin and Hunter, 1995). L'activation de ERK, quant à elle, est impliquée dans la phosphorylation des facteurs de transcription TCF (ternary complex factor) et de Elk-1/p62^{TCF} qui génèrent à leurs tour l'induction de *c-fos* par l'élément de réponse au sérum (SRE) (Karin and Hunter, 1995). L'activation NF-IL6, qui est impliqué dans l'induction de plusieurs gènes, comme IL-6 et IL-8 (Hambleton *et al.*, 1996). Finalement, il a été également démontré que l'activation de la MAPK p38 induit la phosphorylation du facteur de transcription TCF2 (Karin and Hunter, 1995).

7. Phagocytose et activité microbicide des macrophages

7.1 Description générale des processus de phagocytose et de destruction des microbes

Les macrophages phagocytent et détruisent les micro-organismes, un mécanisme essentiel dans la réponse de l'hôte contre l'infection. La phagocytose, est un processus qui débute lors de la reconnaissance et de l'attachement du ligand, certaines molécules présentes à la surface des microbes, à son récepteur cellulaire spécifique, soit les lectines et autres molécules présentes à la surface des phagocytes (Greenberg and Silverstein, 1993 ; Ofek *et al.*, 1995). Ici, les microbes semblent être reconnus de façon directe par ces récepteurs. La reconnaissance peut également se faire par opsonisation impliquant les

anticorps ou le complément, les micro-organismes étant ainsi reconnus par les récepteurs cellulaires spécifiques (Greenberg and Silverstein, 1993). Les deux récepteurs des macrophages les plus caractérisés dans la phagocytose opsonique, sont le récepteur de la portion Fc des immunoglobulines G (IgG) ou le FcyR et le récepteur du complément 3 ou le CR3 (Greenberg and Silverstein, 1993). En absence du complément ou des immunoglobulines, la phagocytose non-opsonique est engendrée par la présence d'oligosaccharides présents à la surface des micro-organismes qui impliquent les lectines, comme le récepteur du mannose, le récepteur «scavenger» et les intégrines (Ofek *et al.*, 1995).

Après l'interaction du ligand à son récepteur cellulaire spécifique, les microorganismes sont internalisés dans une vacuole, le phagosome, pour être finalement dégradés et détruits dans le phagolysosome. L'internalisation est un processus impliquant la polymérisation de l'actine et l'extension des pseudopodes membranaires entourant la particule phagocytée (Silverstein *et al.*, 1989). Lorsque l'internalisation est complétée, l'actine se dissocie du phagosome et les phagosomes matures fusionnent avec les lysosomes, formant ainsi des phagolysosomes (Silverstein *et al.*, 1989). C'est à l'intérieur des phagosomes matures que le recyclage des protéines membranaires à la surface de la cellule s'effectue (Muller *et al.*, 1980). Le processus de maturation des phagosomes requière plusieurs événements de fusion et de fission entre le phagosome et les divers compartiments des endosomes, menant à l'acidification de la vacuole et l'acquisition d'hydrolases (Desjardins, 1995).

7.1.1 Stratégies d'échappement de certains pathogènes intracellulaires à l'activité microbicide des macrophages

La majorité des microbes ne survivent pas à l'activité microbicide exercée par les macrophages. Cependant, certains pathogènes ont développé des stratégies afin d'échapper aux mécanismes de destruction, leur permettant ainsi de survivre et de se répliquer à l'intérieur du macrophage tout en étant capable de causer ce taines maladies, comme par exemple la tuberculose, la salmonellose et la leishmaniose (Finlay and Falkow, 1997; Finlay and Cossart, 1997; Pizarro-Cerda et al., 1997). Une de ces stratégies, utilisée par Shigella et Listeria monocytogenes, consiste à échapper à la vacuole phagocytaire afin de se rendre directement au cytoplasme et de s'y répliquer en détruisant le phagosome par la synthèse d'une molécule perforante «pore-forming» (Portnoy et al., 1992; High et al., 1992). D'autres pathogènes, incluant Salmonella et la forme amastigote de Leishmania emploient des mécanismes leurs permettant de survivre et de proliférer dans l'environnement acide des phagolysosomes (Hackstadt and Williams, 1981; Chang and Dwyer, 1976; Russel et al., 1992). La forme promastigote de Leishmania modifie la membrane du phagosome, empêchant ainsi sa fusion avec le lysosome, par l'expression de la molécule de surface, lipophosphoglycan (LPG) (Miao et al., 1995; Desjardins and Descoteaux, 1997). Finalement, les micro-organismes comme les mycobactéries, Salmonella, et Legionella pneumophila inhibent la fusion entre les phagosomes et les lysosomes et résident dans les phagosomes non-matures en empêchant leur acidification et leur maturation (Horwitz and Maxfield, 1994; Clemens and Horwitz, 1995 ; Garcia-del Portillo and Finlay, 1995).

7.2 Phagocytose et la transduction des signaux

Jusqu'à maintenant, très peu est connu concernant la transduction des signaux impliquée dans la fonction de phagocytose des macrophages. L'attachement de la particule opsonisée par l'IgG à son récepteur Fc γ semblerait induire la phosphorylation des PTK, dont les membres de la famille des Src-kinases (Greenberg, 1995). Suite à cet événement de phosphorylation des PTK, une augmentation du Ca²⁺-intracellulaire est observée, permettant la formation de la vacuole phagocytaire riche en actine et l'internalisation des particules (Greenberg *et al.*, 1990 ; Greenberg *et al.*, 1994). Des études plus récentes ont permis de démontrer l'importance de plusieurs molécules de la transduction du signal impliquées dans ce processus, comme par exemple Syk, Rho, phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), Rac 1 et Cdc42 (Crowley *et al.*, 1997 ; Ninomiya *et al.*, 1994). De plus, l'activation du récepteur Fc γ permet la production de superoxyde, la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Greenberg and Silverstein, 1993).

Les événements intracellulaires engendrés par le second mécanisme de phagocytose par opsonisation (impliquant le CR3), ne sont pas aussi documentés que ceux du Fc γ R. Les événements comme la réorganisation de l'actine, l'activation de la PI 3-kinase et l'augmentation du Ca²⁺-intracelluaire ont été observés. Mais contrairement au Fc γ R, l'interaction de la particule opsonisée avec le CR3 ne permet pas la phosphorylation des PTK et la production de superoxyde (Greenberg, 1995).

7.2.1 PKC et la phagocytose

Plusieurs molécules sont impliquées dans la régulation du processus de la phagocytose, incluant les membres de la superfamille des PKC. Des études basées sur l'utilisation d'activateurs et d'inhibiteurs de PKC ont permis de révéler que l'activité de PKC était une étape essentielle lors de l'ingestion de particules opsonisées par le complément ou par l'IgG, régulant ainsi les récepteurs CR3 et Fc γ R impliqués dans la phagocytose (Karimi and Lennartz, 1995; Zheleznyak and Brown, 1992). Un étude utilisant l'inhibiteur de PKC, la Staurosporine, bloque de façon non-spécifique la phagocytose, mais n'a aucun effet sur la phagocytose par opsonisation via le récepteur Fc γ (Hishikawa *et al.*, 1991). Donc, il n'est pas encore clairement connu à ce jour, quelles sont les isoenzymes de PKC qui sont activées durant la phagocytose et qui sont impliquées dans l'ingestion de particules.

La régulation de la maturation des phagosomes est un processus qui requiert également l'activité de PKC. Il a été démontré, par immunofluorescence, que PKC- α était associée à la membrane des phagosomes immatures contenant du zymosan (Allen and Aderem, 1995 ; Allen and Aderem, 1996). En plus, il a été démontré que MARCKS (Myristoylated alanine-rich-C-kinase substrat), une protéine de membrane associée à l'actine, est un substrat de PKC- α et que PKC- α et MARCKS sont impliqués dans la maturation des phagosomes (Allen and Aderem, 1995). Donc, ces études suggèrent que PKC- α joue un rôle dans la maturation des phagosomes (Allen and Aderem, 1995). Un rôle similaire a été proposé pour PKC- β , qui est localisé à la membrane des phagosomes contenant *Mycobacterium bovis* (Buchwalow *et al.*, 1997).

7.3 PKC et l'activité microbicide des macrophages

Plusieurs études ont permis de démontrer l'implication de PKC dans le contrôle de la réplication intracellulaire de différents types de microbes. Tel est le cas de l'infection des monocytes humains par *Staphylococcus aureus*. Une étude a permis de démontrer que la destruction intracellulaire de *S. aureus* par les monocytes humains serait induite par l'interaction du récepteur Fc γ (Zheng *et al.*, 1995). De plus cette étude a démontré que PKC serait requise pour ce processus de destruction bactérien impliquant le Fc γ R, puisque l'utilisation d'inhibiteurs de PKC, comme H-7 et la Staurosporine, suppriment de façon considérable la destruction de *S. aureus* (Zheng *et al.*, 1995). Et finalement, l'interaction du récepteur Fc γ cause une augmentation de l'activité des PKC- α , β et ε à la membrane des monocytes (Zheng *et al.*, 1995). Donc, il reste à savoir si ces isoenzymes de PKC seraient impliquées ou non dans la régulation de la destruction de *S. aureus*.

7.3.1 PKC et Leishmania

Également, il a été démontré que plusieurs pathogènes intracellulaires, incluant *Leishmania donovani* et *Legionella pneumophila*, inhibent le mécanisme de respiration oxydative des macrophages en bloquant l'activation de PKC (Jacob *et al.*, 1994 ; Reiner, 1994). *Leishmania* est un parasite protozoaire capable de survire et de se répliquer dans les phagosomes des macrophages infectés. Durant son cycle cellulaire le *Leishmania* fait face à plusieurs environnements défavorables, comme les phagolysosomes riches en hydrolases des macrophages de l'hôte infecté. L'un des mécanismes que ce pathogène intracellulaire a développé, afin d'échapper à cet environnement hostile et de survire et de proliférer dans les phagosomes, est l'expression d'une molécule à la surface de la forme promastigote de ce parasite, connu sous le nom de lipophosphoglycan, LPG. Contrairement aux *Leishmania* de la forme promastigote, les amastigotes sont capables

de proliférer et survivent à l'intérieur des phagolysosomes riches en hydrolases (Alexander and Russel, 1992) et ne synthétisent le LPG que de façon très faible ou même que de façon non-détectable (McConville and Blackwell, 1991; Turco and Sacks, 1991; Moody et al., 1993).

Plusieurs fonctions ont été attribuées au LPG (Descoteaux and Turco, 1993; Sacks *et al.*, 1994; Desjardins and Descoteaux, 1997). Le LPG est essentiel pour la survie intracellulaire de *Leishmania* et pour l'infection des macrophages (Handman *et al.*, 1986; McNeely and Turco, 1990; Beverley and Turco, 1995). Lors de l'infection des macrophages par les *Leishmania* promastigotes, il a été démontré que l'inhibition de la fusion entre les phagosomes et les lysosomes est dû au LPG. Donc, le LPG inhibe la maturation des phagosomes et la biogenèse du phagolysosome (Desjardins and Descoteaux 1997). Le LPG exprimé à la surface des promastigotes de *Leishmania donovani* est un puissant inhibiteur de l'activité *in vitro* de PKC (Descoteaux et al., 1992). De plus il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de PKC, comme H-7, supprime la capacité du macrophage à détruire *Leishmania donovani*, tout en favorisant sa réplication intra-macrophage (Murray, 1982; Descoteaux *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1993).

7.3.2 PKC et Legionella pneumophila

Legionella pneumophila, une bactérie Gram-négative, est un pathogène intracellulaire et le principal agent de la maladie du Légionnaire (Fraser *et al.*, 1977; Horwitz and Silverstein, 1980). L. pneumophila infecte et se réplique dans les macrophages alvéolaires et les monocytes humains par opsonisation dépendante des récepteurs CR1 et CR3 du complément, qui est la façon la plus efficace d'entrer dans ces

cellules (Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1987 ; Horwitz and Silverstein, 1980 ; Payne and Horwitz, 1987). *L. pneumophila* ne peut pas se répliquer dans les macrophages péritonéaux de plusieurs souches de souris comme C57BL/6, C3H/HeN, ARK et BALB/c (Yoshida and Mizuguchi, 1986), mais peut se répliquer uniquement dans les macrophages péritonéaux de la souche de souris A/J (Yamamoto *et al.*, 1988). La permissivité vs la non permissivité de ces macrophages semble être sous le contrôle de mécanismes génétiques. La résistance naturelle des souches de souris à l'infection à *L. pneumophila* est contrôlée par un simple gène dominant, *Lgn*1 (Beckers *et al.*, 1997). La virulence de *L. pneumophila* est déterminée par l'inhibition de fusion entre les phagosomes et les lysosomes que cause cette bactérie, tout en étant capable de survivre et de se répliquer dans les phagosomes (Horwitz, 1983).

Une étude a permis de démontrer que l'infection des monocytes par L. pneumophila active des signaux de phosphorylation nécessaire pour induire le réarrangement de cytosquelette, permettant ainsi l'entrée de la bactérie (Coxon et al., L'entrée de L. pneumophila dans les monocytes peut être supprimée par 1998). l'utilisation d'inhibiteurs de PTK, comme génistéine, tyrphostin et/ou l'utilisation d'inhibiteurs de PKC, comme la Staurosporine, suggérant que ces deux signaux sont impliqués dans le processus de phagocytose de L. pneumophila par les monocytes (Coxon Donc, l'infection des monocytes par L. pneumophila active la et al., 1998). phosphorylation des PTK, de PKC et induit la polymérisation de l'actine (Coxon et al., 1998). De plus, l'infection des monocytes par L. pneumophila inhibe la production de superoxyde, en interférant avec PKC qui est requise pour la phosphorylation NADH oxydase. Une analyse plus approfondie de ce phénomène a indiquée que l'expression de PKC- α et de PKC- β serait inhibée dans les monocytes infectés par *L. pneumophila*. Ces travaux suggèrent que la régulation à la baisse de ces deux isoenzymes de PKC, dû au pré-traitement des monocytes au phorbol ester, seraient responsables de l'inhibition de production de superoxyde et également impliquées dans la survie de L. pneumophila (Jacob et al., 1994).

Ainsi, l'inhibition des voies de signalisation dépendantes de PKC par les produits de ces pathogènes intracellulaires (*Leishmania donovani* et *Legionella pneumophila*) est un important atout pour ces micro-organismes, afin de réduire et de déjouer l'activité microbicide de leur cellule hôte, le macrophage.

Matériel et méthodes

1. ADN complémentaire et vecteurs

1.1 ADN complémentaire

L'ADN complémentaire (ADNc) de type sauvage de PKC- α a été obtenu de l'ATCC (American Type Culture Collection) (Rockville, MD, USA). Le mutant dominant-négatif de cette version du gène, dominant-négatif (DN) de PKC- α (K368D), a été crée par mutagénèse-dirigée utilisant le protocole décrit par le manufacturier «Transformer System» (Clontech, Palo Alto, CA) avec l'oligonucléotide de mutagénèse AD-5 (5'-GTATGCAATC<u>G</u>ATATCCTGAAGAAGG-3'). La séquence de ce mutant a été confirmée par l'analyse de séquence fait au service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier. Le remplacement de la lysine 368 par l'acide aspartique au domaine d'attachement à l'ATP résulte en une enzyme catalytiquement inactive qui agit en un mutant dominant-négatif en compétitionnant avec la protéine- α endogène correspondante (Rosson *et al.*, 1997 ; Baier *et al.*, 1996).

1.2 Vecteurs

Le plasmide, hPKCalpha-GF29 (obtenu de L'ATCC), consiste en un vecteur, pBluescript KS+, de 5,2 kilobases (Kb) contenant dans le site de restriction *Eco*RI, un insert de 2,23 Kb, représentant l'ADNc complet du gène humain de PKC- α .

 $pCIN_4$ est un vecteur d'expression biscistronique de 5,3 Kb, résistant à l'ampicilline, gracieusement obtenu de S. Rees. Biscistronique signifie que l'expression

de deux gènes, le gène d'intérêt (PKC- α sauvage ou mutant (DN)) et le gène de résistance (néomycine) sont sous le contrôle d'un seul promoteur (pCMV) (Rees *et al.*, 1996) (Annexe I).

Le vecteur d'expression pGEM 72f/anealuc de 7 Kb, gracieusement obtenu de Barbara Papadopoulou, est un vecteur qui comprend le gène de la luciférase et le gène de résistance à la néomycine. Ce vecteur a été transfecté dans les *Leishmania donovani* (voir section 5.2). L'expression du gène luciférase étant constitutif, ce vecteur constitue un outil fort utile pour la quantification des niveaux d'infection des macrophages.

2. Purification de l'ADN

2.1 Culture bactérienne

De façon stérile, sous la flamme, une petite quantité de la souche bactérienne hPKC- α -GF29, ainsi que la souche bactérienne DN de PKC- α (k338D), étant la forme mutante (DN) de la version du gène de PKC- α , ont été ensemencées par étalement sur des géloses LB (10 g/1 000 ml de Bactotryptone ; 5 g/1 000 ml d'extrait de levure et 10 g/1 000 ml de NaCl) avec 1,5% d'agar et 100 µg/ml d'ampicilline (Sigma Chemical, CO, MO). Par la suite, les géloses LB-agar ensemencées ont été incubées pour un maximum de 18 heures dans un incubateur bactérien à une température de 37°C. Le lendemain, une colonie isolée sur chacune des géloses LB-agar utilisées a été ensemencée dans 2 ml de milieu LB avec 100 µg/ml d'ampicilline pendant 16-18 heures à 37°C dans un incubateur-agitateur. Suite à la croissance bactérienne en milieu liquide, l'extraction de l'ADN plasmidique a été effectuée.

2.2 Extraction de l'ADN plasmidique de type «mini-preps»

La technique de lyse alcaline de type «mini-preps» a été effectuée afin d'extraire l'ADN plasmidique des bactéries. Sous la flamme, 1,5 ml de chacune des suspensions bactériennes cultivées ont été transférés dans un tube Eppendorf (Sarstedt, Newton, USA) bien identifié et centrifugé à 1 200 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant a été ensuite aspiré et le culot a été resuspendu dans 200 µl de la solution I (50 mM de glucose ; 10 mM de EDTA et 25 mM de Tris-HCl, pH 8,0) froide. Le tube a été ensuite vortexé jusqu'à ce que le culot soit complètement défait et placé sur glace pendant 5 minutes. Puis, 400 µl de la solution II (0,2 M de NaOH et 1% de SDS dans de l'H₂O distillée) fraîchement préparée, ont été ajoutés, mélangés par inversion et le tube a été placé sur glace pour un second 5 minutes. Avant une troisième incubation de 5 minutes sur glace, 400 µl de la solution III (60 ml de potassium acétate 5M; 11,5 ml d'acide acétique glaciale et 28,5 ml d'H₂O distillée) froide ont été ajoutés et mélangés par inversion. Ensuite, le tube a été centrifugé à 1 200 rpm pendant 10 minutes et 700 µl du surnageant ont été transférés dans un nouveau tube Eppendorff bien identifié contenant 700 µl d'isopropanol. Par la suite, l'ADN a été précipité à -20°C pendant un minimum de 20 minutes. Après la précipitation de l'ADN, le tube a été centrifugé à 1 200 rpm pendant 10 minutes et le culot a été lavé avec 600 µl d'éthanol 70% froid. Ensuite, une centrifugation à la même vitesse pendant 5 minutes a suivie. Finalement, le surnageant a été aspiré délicatement, le culot a été séché à 65°C pendant 5 minutes et resupendu dans 50 μ l de TE (Tris-EDTA) contenant 20 μ g/ml de RNAse A pendant 15 minutes à 37°C. L'ADN plasmidique obtenue a été conservée à -20°C avant son utilisation.

2.3 Préparation de cellules compétentes Escherichia coli DH5-a

La compétence des bactéries est nécessaire afin de permettre l'entrée du plasmide dans celles-ci. La compétence des cellules *Escherichia coli* DH5 α a été effectuée d'abord par l'ensemencement par étalement d'une gélose LB-agar avec la souche bactérienne *E. coli* DH5 α . Suite à l'incubation de 18 heures à 37°C de la gélose LB-agar, 3 colonies isolées ont été ensemencées dans 50 ml de milieu LB pendant 2 ½ heures, ou jusqu'à l'obtention d'une densité optique, entre 0,3 et 0,6, quantifiée au spectrophotomètre à 600 nm. La culture bactérienne a été ensuite transférée dans un tube de 50 ml (Falcon, Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA) et centrifugé à 2 500 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été enlevé par inversion et le culot a été resuspendu dans 2,5 ml de milieu TSB (milieu LB avec 10% de PEG ; 5% de DMSO ; 10 mM de MgCl₂ et 10 mM de MgSO₄). Finalement, les cellules DH5- α ont été aliquotées à un volume final de 100 µl par tubes Eppendorff bien identifiés et gelées ensuite rapidement à l'aide d'EtOH 100% à -70°C, pour être ensuite conservées à -70°C avant leur utilisation.

2.4 Transformation bactérienne Escherichia coli DH5-a

Dans deux tubes Eppendorff froids, différents et bien identifiés, 5 μ l des ADN plasmidiques hPKC- α -GF29 et DN PKC- α (K368D) ont été mélangés avec 100 μ l de cellules compétentes DH5- α et les tubes ont été ensuite incubés pendant 30 minutes sur glace. Dans un autre tube, 1 μ l du contrôle positif pUC19 (Gibco BRL, Life Technologies) a été également mélangé avec la même quantité de cellules compétentes DH5- α . Après l'incubation de 30 minutes sur glace, 1 ml de milieu LB a été ajouté dans chacun des tubes et une incubation de 45 minutes à 37°C a suivie. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 1 200 rpm pendant 2 minutes et le surnageant a été enlevé par

inversion. Pour chacun des tubes utilisés, le culot a été ensuite resuspendu avec la dernière goutte du milieu LB présente dans le tube pour être ensuite ensemencée par étalement sur des géloses LB-agar avec 100 ug/ml d'ampicilline. L'utilisation d'un contrôle positif pour cette méthode sert à vérifier si la transformation bactérienne a bien été effectuée. Chacune des géloses utilisées ont été incubées respectant les conditions déjà mentionnées à la section 2.1. Le lendemain, plusieurs colonies isolées présentes sur chacune des géloses LB-agar (pour cette utilisation, un maximum de 6 colonies ont été repiquées) ont été ensemencées dans des tubes contenant 2 ml de milieu LB avec 100 µg/ml d'ampicilline chacun et incubés ensuite pendant 16-18 heures à 37°C dans un incubateur-agitateur. Suite à la croissance bactérienne en milieu liquide, l'extraction de l'ADN plasmidique a été effectuée de la même façon que décrite précédemment (voir section 2.2). À la fin de cette étape, l'ADN plasmidique des souches bactériennes hPKC- α -GF29 et DN PKC- α (K368D) comprenant le vecteur pBluescript KS+ et le gène de PKC-α sauvage ou mutant (DN), sont maintenant transformées dans la souche E. coli DH5a au lieu d'être dans la souche E. coli HB101. Pour vérifier l'intégrité de ces deux plasmides lors de la transformation bactérienne, une digestion enzymatique a été effectuée.

2.5 Digestion enzymatique et analyse sur gel

Afin de vérifier l'intégrité du plasmide lors de la transformation bactérienne, une digestion enzymatique a été effectuée à partir de chacune des ADN plasmidiques obtenus. Le gène de PKC- α a été inséré au site *Eco*RI du vecteur pBluescript KS+. Donc, le résultat de la digestion enzymatique avec *Eco*RI permettra la libération de l'insert (sauvage et mutant) du vecteur, afin d'obtenir un fragment de 2,97 Kb pour le vecteur et un fragment de 2,23 Kb correspondant à l'insert. Pour chacune des digestions enzymatiques effectuées, une règle de digestion a été établie, soit : pour un volume final

de 20 µl de digestion, 5 µl d'ADN plasmidique de chacune des colonies resuspendues ont été incorporés et mélangés dans un tube Eppendorff bien identifié contenant 2 µl de BSA 10X (New England BioLabs, Beverly, MA), 2 µl du tampon 10X correspondant à l'enzyme (ici tampon 10X EcoRI, New England BioLabs), 1 µl de l'enzyme [ici EcoRI (à 2 000 U/ml)]et 10 µl d'H₂O distillée. Les échantillons ont été incubés pendant 2 heures à 37°C (qui est la température de réaction de l'enzyme EcoRI). Après le temps de digestion, 4 µl du tampon de migration 6X (0,25% bromophénol bleu; 0,25% xylène cyanol ; 30% glycérol) ont été ajoutés au volume de digestion et chargés sur gel de 0,7 % d'agarose avec $0,3 \mu g/\mu l$ de EtBr. Le marqueur $\lambda Hind$ III a été utilisé comme contrôle de poids moléculaire. 10 μ l de l'ADN λ de ce marqueur (à une concentration finale de 0,5 μ g/ml) ont été mélangés avec 10 μ l d'H₂O distillée et avec 4 μ l du même tampon de migration 6X. Ce mélange a été incubé pendant 5 minutes à 65°C, afin de linéraliser l'ADN de λ , avant d'être chargé lui aussi sur le gel d'agarose. Les échantillons ont migrés sous un voltage constant de 79 volts (source d'alimentation électrique, modèle EC 105, Apparatus Corporation, Florida, USA) pendant 1 heure 30 minutes. Finalement, le gel a été observé et photographié sous rayons ultraviolets (U.V) à l'aide du Gel DOC 1000 de BioRad.

Une fois que l'intégrité des plasmides a été vérifiée, les ADN plasmidiques de type sauvage et de type mutante (DN) de PKC- α peuvent être maintenant digérés par l'enzyme de restriction *Eco*RI (voir section 2.5) pour débuter le clonage des ADNc sauvage et mutant de PKC- α dans le nouveau vecteur pCIN₄ au site de restriction *Eco*RI (décrite dans la section suivante).

3. Clonage dans le vecteur d'expression pCIN₄

3.1 Linéarisation et déphosphorylation du vecteur d'expression pCIN₄ et préparation des inserts

Un µg de l'ADN du vecteur pCIN₄, gracieusement obtenue de S. Rees, a été d'abord linéarisé par une digestion enzymatique de 2 heures à 37°C avec l'enzyme *Eco*RI (voir section 2.5) pour être ensuite déphosphorylé par un traitement à la phosphatase alcaline. Le traitement à la phosphatase alcaline consiste à incuber le produit de digestion avec 1/10 de volume du tampon 10X (Boehringer Mannheim, Germany) et 1 µl de la phosphatase alcaline (1 U/µl) (Boehringer Mannheim) pendant 30 minutes à 37°C. Par la suite, 2 µl supplémentaires de la phosphatase alcaline ont été ajoutés et une seconde incubation de 30 minutes a suivie, mais cette fois-ci à 55°C. Pour la même occasion, les ADN plasmidiques de type sauvage et de type mutant (DN) de PKC- α ont été digérés avec l'enzyme de restriction *Eco*RI. Les trois produits de digestion (PKC- α , DN PKC- α et pCIN₄ digéré et déphosphorylé) ont été analysés sur un gel à 0,7 % d'agarose (voir section 2.5). Par la suite, les bandes d'ADN de 2,23 Kb correspondantes au gène de PKC- α sauvage et mutant (DN) et la bande de 5,3 Kb correspondante au vecteur pCIN₄, ont été coupées du gel, puis extraites de l'agarose et purifiées à l'aide de la trousse «Gene Clean II» de Bio 101 Inc. (Bio/Can scientific, Mississauga, ON, Canada).

3.2 Purification des fragments d'ADN

Afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN purifié pour le clonage, les produits de digestion doivent être à un volume final de 50 μ l suivant la règle décrite à la section

2.5. Lors de l'observation sous U.V. du gel d'agarose, les bandes d'ADN de la taille appropriée ont été coupées du gel et ensuite déposées dans un tube Eppendorff. La purification des fragments d'ADN a été effectuée en suivant le protocole proposé par le manufacturier «Gene Clean II» de Bio 101 Inc. (Bio/Can scientific, Mississauga, ON, Canada).

3.3 Ligation

Les fragments purifiés de 2,23 Kb des gènes de PKC- α sauvage et mutant (DN) ont été ligués au site de restriction *Eco*RI dans le vecteur pCIN₄ préalablement digéré et déphosphorylé. Pour un volume finale de 10 µl, 1 µl du fragment purifié du vecteur pCIN₄/*Eco*RI et déphosphorylé (5,3 Kb) a été mélangé dans deux tubes Eppendorff différents contenant chacun 2 µl du tampon 5X de ligation (Gibco BRL, Life Technologies), 1 µl de la ligase (5 500 U/ml) (Pharmacia Biotech, USA), 3 µl d'H₂O distillée et 3 µl du fragment purifié de PKC- α de la forme sauvage ou de la forme mutante (DN). Comme contrôle négatif, 1 µl du fragment purifié du vecteur pCIN₄/*Eco*RI et déphosphorylé a été mélangé dans un autre tube Eppendorff contenant les même constituants, mais cette fois-ci sans insert. Par la suite, les trois tubes bien identifiés ont été incubés à la température ambiante pendant un minimum de 3 heures et un maximum 24 heures pour optimiser la réaction de ligation. Après la période de ligation, les trois réactions ont été transformées dans des cellules compétentes DH5 α de Gibco (Life Technologies).

3.4 Transformation bactérienne des produits de ligation

Le protocole de transformation bactérienne des produits de ligation est très similaire à celui décrit à la section 2.4, à l'exception que les cellules compétentes DH5 α sont de la compagnie Gibco et une étape supplémentaire est ajoutée à ce protocole. Pour se faire, 4 µl de chacune des réactions de ligation ont été mélangés avec 50 µl de cellules compétentes DH5a de Gibco dans des tubes Eppendorff froids, différents et bien identifiés et ensuite incubés pendant 30 minutes sur glace. Par la suite, le reste du protocole décrit à la section 2.4 a été effectué, à l'exception d'un choc thermique de 20 secondes à 37°C et suivi d'un refroidissement de 2 minutes sur glace avant l'ajout du milieu LB dans chacun des tubes utilisés. Finalement, après l'incubation de 18 heures à 37°C des géloses LB-agar ensemencées, plusieurs colonies isolées présentes sur chacune des géloses (pour cette utilisation, un maximum de 24 colonies ont été repiquées) ont été ensemencées dans 2 ml de milieu LB avec 100 ug/ml d'ampicilline et l'extraction de l'ADN plasmidique (section 2.2) a été effectuée pour chacune des suspensions bactériennes obtenues. Il est important de noter ici qu'aucune colonie (ou très peu) ne devrait être présente sur la gélose LB-agar 100 ug/ml d'ampicilline ensemencée avec le produit de ligation du vecteur sans insert (contrôle négatif) transformé dans les cellules compétentes DH5a de Gibco., puisqu'un vecteur déphosphorylé ne peut pas se circulariser et de l'ADN linéaire est très difficilement transformable.

3.5 Vérification de l'orientation des inserts par digestion enzymatique

Afin de vérifier l'orientation des inserts ligués au site de restriction *Eco*RI dans le vecteur pCIN₄, préalablement digéré et déphosphorylé, suite à la transformation bactérienne dans les cellules compétentes DH5 α de Gibco, une digestion enzymatique de 2 heures à 25°C avec *Sma*I a été effectuée pour chacun des ADN plasmidiques obtenus

(voir section 2.5). Le choix de l'enzyme Smal a été déterminé en fonction de la connaissance de sa position dans l'insert (0,044 Kb) et dans le vecteur pCIN₄ (1 Kb) et puisque Smal est un site de restriction unique pour l'insert et le vecteur pCIN₄. Donc, si les fragments d'ADN de PKC- α de type sauvage et mutant (DN) ont été insérés de la bonne orientation dans le vecteur pCIN₄, on pourra visualiser sur gel d'agarose des fragments d'ADN de 4,34 Kb pour le vecteur et de 3,26 Kb pour les inserts. De plus, une digestion supplémentaire avec l'enzyme EcoRV a été effectuée, dans le but de vérifier si l'ADN mutant (DN) était bien celui de la construction pCIN-DN PKC-a. Lors de l'exécution du protocole de la mutagenèse dirigée (voir section 1.1), un site de restriction EcoRV a été inséré, afin de vérifier l'identité du mutant. Alors, le résultat sur gel de ce produit de digestion a été deux fragments (un de 2,23 Kb pour l'insert muté (DN) et un fragment de 2,97 Kb pour le vecteur) uniquement pour l'ADN de la construction pCIN-DN PKC- α et non pour l'ADN de la construction pCIN-PKC- α . Puis, suite à une bonne orientation des inserts, les clones bactériens confirmant ce résultats ont été identifiés : pCIN-PKC- α et pCIN-DN PKC- α . Par la suite, une suspension bactérienne de 2 ml en milieu LB avec 100 ug/ml d'ampicilline ont été ensemencée et incubée à 37°C dans un incubateur-agitateur à partir de quelques µl de la suspension bactérienne initiale bien identifiée correspondante au clone bactérien confirmant les résultats respectifs (pCIN-PKC- α et pCIN-DN PKC- α). Suite à la croissance bactérienne en suspension, 500 ml de milieu LB avec 100 ug/ml d'ampicilline ont été ensemencés et l'extraction de l'ADN à grande échelle de type «maxi-preps» a été effectuée pour chacune des constructions clonales obtenues.

3.6 Extraction de l'ADN à grande échelle de type «maxi-preps»

La culture bactérienne en 500 ml a été transférée dans deux bouteilles de 250 ml chacun et les bouteilles ont été centrifugées dans le rotor GSA à 6 000 rpm pendant 10

minutes à 4°C (centrifugeuse Sorvall modèle RC-5B). Après avoir jeté les surnageants par inversion, les culots ont été resuspendus dans 10 ml total de la solution P1 (Quiagen, Inc. Canada) froide et le culot final du mélange des deux bouteilles correspondants à la même souche bactérienne a été ensuite complètement défait à l'aide du vortex. Puis 10 ml de la solution P2 (Quiagen, Inc. Canada) ont été ajoutés et mélangés par rotation. Ensuite, la bouteille a été incubée pendant 5 minutes sur glace. Dix ml de la solution P3 (Quiagen, Inc. Canada) ont été ajoutés et mélangés par inversion, ensuite la bouteille utilisée a été incubée pendant 15 minutes sur glace. Par la suite, une centrifugation à 8 000 rpm pendant 35 minutes à 4°C (centrifugeuse Sorvall modèle RC-5B) a suivie. Le surnageant a été filtré sur colonne Quiagen préalablement équilibrée avec 10 ml de la solution QBT (Quiagen, Inc. Canada). Ensuite, la colonne a été lavée deux fois avec 30 ml de la solution QC (Quiagen). Puis, l'ADN a été élué dans un tube de 50 ml (Falcon, Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA) contenant 10 ml d'isopropanol à l'aide de 15 ml de la solution QF (Quiagen, Inc. Canada). Avant de centrifuger à 4°C le tube de 50 ml à 2 500 rpm pendant 25 minutes, le tube a été incubé à température ambiante pendant 2 heures. Suite à la centrifugation, le surnageant a été enlevé par inversion et le culot a été doucement rincé avec 15 ml d'EtOH 70% froid. Une centrifugation à 4°C pendant 5 minutes à 2 500 rpm a suivie et le culot complètement séché à l'air ambiant a été resuspendu dans 500 µl de TE. L'ADN a été ensuite quantifié au spectrophotomètre à 260 nm où 1 unité de densité optique à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN. Une digestion enzymatique (voir section 2.5) avec 1 µg d'ADN et une analyse sur gel ont été effectuées pour vérifier l'intégrité des plasmides et pour vérifier efficacité de l'extraction de l'ADN à grande échelle. Finalement, c'est à partir de l'ADN quantifié de cette étape, que 15 μ g des constructions (pCIN-PKC- α et pCIN-DN PKC- α) ont été électroporés dans la lignée de macrophage RAW 264.7 (voir section 5.1).

4. Culture cellulaire

4.1 Macrophages

La lignée de macrophage RAW 264.7, obtenue de l'ATCC (don gracieux de D. Oth), a été cultivée dans des pétris non-adhérents (Fisher Scientific, CO, PA, USA) et dans un incubateur à une température de 37° C avec 5% de CO₂. Le milieu de culture, DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) avec de la glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), a été utilisé pour la croissance cellulaire. À ce milieu, il a été ajouté un supplément de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone, Logan, UT), inactivé à la chaleur (30 minutes à 65°C) ; 20 mM Hepes à pH 7,0 et 5ml/500ml d'un mélange d'antibiotique comprenant 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL, Life Technologies). Pour faciliter le décollage des ces cellules adhérentes à la paroi des pétris, le milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution (Gibco BRL, Life Technologies) froid, additionné de 20 mM Hepes, pH 7,0 et de 5ml/500ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Life Technologies) a été utilisé.

4.2 Leishmania

Les promastigotes de *Leishmania donovani* (souche Ethiopienne LV9, obtenus de G. Matlashewski) sont dérivés des amastigotes isolés à partir de la rate d'hamster infectés. Les promastigotes de *Leishmania donovani* ont été cultivés dans un incubateur à une température de 26°C dans du milieu à *Leishmania* à pH 5,5. Pour 500 ml de RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) avec de la glutamine (Gibco BRL, Life Technologies), il a été ajouté 5ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Life

Technologies) ; 100 μ M d'adénine 100X (10mM dans H₂O) (Sigma) ; 20 mM de MES (acide 2-[N-Morpholino]ethanesulfonique (Sigma) ; 20% SVF (Hyclone, Logan, UT), inactivé à la chaleur (30 minutes à 65°C) ; 5 μ M d'hémine (0,25% dans 50% triethanolamine) (Sigma) ; 2 ml d'un stock de 6-Bioptérine à 0,25 mg/ml et 1 μ M de Biotine (0,1% dans 95% d'éthanol). Ce milieu complet à pH 5,5 a été filtré et utilisé stérilement. Les *Leishmania donovani* ont été passés à tous les 3-4 jours à une dilution de 1/50, pour obtenir une densité approximative de 3-5 X 10⁷/ml. À cette concentration, les *Leishmania donovani* sont à leur phase stationnaire, un stade idéal pour leur bonne utilisation.

5. Transfections des macrophages et des Leishmania

L'électroporation est le mode de transfection qui a été utilisé. Le principe de l'électroporation est d'introduire de l'ADN dans les macrophages ou dans les *Leishmania* en perméabilisant les membranes grâce à un fort courant électrique (Stacey *et al.*, 1993). Le protocole d'électroporation des macrophages diffère légèrement de celui des *Leishmania*.

5.1 Électroporation des macrophages

Les macrophages (2 X 10⁷ cellules/1 ml de milieu DMEM complet) ont été électroporés à 960 μ F et à 300 volts avec 15 μ g d'ADN du vecteur pCIN₄ seul, ou des deux constructions : pCIN-PKC- α ou pCIN-DN PKC- α . Pour optimiser l'électroporation, une digestion avec l'enzyme *SspI* a été effectuée pour les trois différents types d'ADN (vecteur pCIN₄ seul et les deux constructions : pCIN-PKC- α et pCIN-DN PKC- α), afin de linéariser le vecteur puisqu'il n'y a qu'un site de restriction SspI dans le vecteur (Stacey et al., 1993). Des cuvettes de 0,4 cm (BioRad, Richmond, CA) et l'appareil Gene Pulser de BioRad (BioRad, Richmond, CA) ont été utilisés. Les cellules électroporées ont été resuspendues dans deux pétris non-adhérents, différents et bien identifiés, comprenant chacun 10 ml de milieu DMEM complet. Après 48 heures de croissance, une dilution de 1/10 a été effectuée pour chacun des pétris et 500 µg/ml de généticine, G418, (Life Technologies, Inc.) ont été ajouté au milieu DMEM complet pour débuter la sélection des transfectants. Après 3-4 semaines de sélection, à partir des deux pétris, plusieurs clones ont été repiqués, en notant bien leur provenance. Pour chacun des clones, une colonie a été d'abord resuspendue dans un puit d'une plaque de 6 puits (Falcon, Becton Dickinson and compagny, Franklin Lakes, NJ) comprenant 2 ml/puit de milieu DMEM complet avec 500 µg/ml de G418, pour être ensuite cultivée dans un pétri non-adhérent. Chacun des clones obtenus ont été finalement analysés et la caractérisation par immunobuvardage de type Western Blot a été effectuée dans le but d'analyser leur niveau de surexpression en protéine de PKC- α comparativement à la PKC- α endogène (voir section 6.1.1).

5.2 Électroporation des Leishmania

Pour générer des *Leishmania donovani* de souche LV9 exprimant le gène de la luciférase (LV9-Luc), 4 X 10⁷ promastigotes/0,4 ml de tampon à électroporation (21 mM Hepes, pH 7,0; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na₂PO₄ et 6 mM de glucose) (Descoteaux *et al.*, 1994) ont été électroporés à 500 μ F et à 450 volts avec 10 μ g de l'ADN du vecteur de la luciférase pGEM 72f/anealuc. Des cuvettes de 0,2 cm (BioRad, Richmond, CA) et l'appareil Gene Pulser de BioRad (BioRad, Richmond, CA) ont été utilisés. Pour optimiser l'électroporation des *Leishmania*, les cuvettes, avant et après l'électroporation, doivent être placées sur glace. Les promastigotes électroporés (LV9-

Luc) ont été resuspendus dans un flacon de 25 cm² comprenant 10 ml de milieu à *Leishmania* complet à pH 5,5. Après 24 heures, 50 μ g/ml de G418 ont été ajoutés au milieu à *Leishmania* complet à pH 5,5 pour initier la sélection des transfectants. Après 2 semaines de sélection en suspension, une dilution de 1/5 a été effectuée à partir du flacon initial. Finalement, après 3-4 jours, un lysat de *Leishmania* a été effectué, afin de vérifier si la population de *Leishmania* obtenue exprimait bien une activité en luciférase. L'activité en luciférase a été vérifiée à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB 9507, EG&G Berthold) (voir section 16.1.1). Les amastigotes *in vitro* exprimant le gène de la luciférase ont été obtenus par la croissance des *Leishmania* LV9-Luc à 37°C pendant 48 heures avec 5% CO₂ dans du milieu à *Leishmania* complet à pH 5,5.

6. Préparation des extraits totaux

Différents tampons de lyse et différentes procédures ont été utilisés pour obtenir des lysats cellulaires de macrophages et de *Leishmania*.

6.1 Lysats cellulaires de macrophages

6.1.1 Niveau en protéine de PKC-α pour l'analyse de type Western Blot

Cinq X 10⁶ cellules totales ont été récoltées dans un Eppendorff stérile. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à une vitesse de 5 000 rpm. Le culot cellulaire a été ensuite, lavé une fois avec du PBS 1X froid et finalement lysé avec 250 μ l de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EGTA et 1% de Triton X-100)
contenant des inhibiteurs de protéases (extraits de pancréas, pronase, thermolysine, chymotrypsine, trypsine et papaïne) (Boeheringer Mannheim). Le lysat cellulaire a été d'abord soniqué pendant 6-10 secondes (Wang *et al.*, 1997) et la concentration protéique a été ensuite déterminée par l'utilisation de la trousse «BCA protein» (Pierce, Rockfort, IL) (voir section 7).

6.1.2 Phosphorylation du facteur de transcription NF-κB et des MAPK

Les macrophages à une concentration de 2,5 X 10^6 cellules/puit ont été adhérés sur une plaque de 6 puits comprenant 2 ml/puit de milieu DMEM complet. Après un maximum de 18 heures d'adhérence, les cellules ont été incubées avec 1,5 ml/puit de nouveau milieu DMEM complet, en absence ou en présence de 100 ng/ml de LPS (*Escherichia coli*, souche 0127:B8, Sigma) pendant différentes périodes de temps. Par la suite, le surnageant a été aspiré, les cellules ont été d'abord lavées une fois avec du PBS 1X froid et ensuite, lysées avec 250 µl de tampon de lyse (20mM de Tris-HCl, pH 7,5 ; 150 mM NaCl et 1% de Triton X-100) avec 1,5 mM EGTA et des inhibiteurs de protéases (extraits de pancréas, pronase, thermolysine, chymotrypsine, trypsine et papaïne) (Boeheringer Mannheim) et de phosphatases (50 mM de NaF ; 10 mM de Na₄P₂O₇ et 1 mM de Na₃VO₄). Le lysat cellulaire a été d'abord vortexé pendant quelques secondes, incubé une vingtaine de minutes sur glace et centrifugé pendant 10 minute à 4°C. Le surnageant a été recueilli (lysat protéique sans noyau) et la concentration protéique a été déterminée par l'utilisation de la trousse «BCA protein» (Pierce, Rockfort, IL).

Pour ces deux méthodes de lyse cellulaire (sections 6.1.1 et 6.1.2), le reste des lysats cellulaires, après avoir effectué le dosage des protéines à l'aide de la trousse «BCA

protein» (voir section 7), ont été mélangés avec un volume égal de 2X SDS de tampon de migration (60 mM de Tris-HCl, pH 7,5 ; 2 mM EDTA ; 10 mM de β -mercaptoéthanol ; 20% de glycérol et 2% de SDS), bouillis pendant 5 minutes et conservés pendant quelques jours à -20°C ou pour plusieurs semaines à -70°C avant d'être fractionnés sur mini-gel de SDS-polyacrylamide (voir section 8).

6.2 Lysats cellulaires de Leishmania

Un total de 10^7 *Leishmania* ont été centrifugés pendant 7 minutes à 2 800 rpm. Ensuite, le culot de *Leishmania* a été lavé une fois avec du PBS 1X froid, centrifugé une seconde fois aux même conditions et finalement, le culot de *Leishmania* a été resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse 1X (Promega, Cell Culture Lysis Reagent). Le lysat de *Leishmania* a été conservé à -70°C avant son utilisation.

7. Dosage des protéines BCA (Pierce, Rockfort, IL)

Le protocole (tel que décrit par le manufacturier) utilisant des miroplaques de 96 puits (Sarstedt, Newton, USA) a été utilisé pour déterminer la concentration en protéine des différents lysats cellulaires de macrophages (voir section 6.1). Dix μ l de chacun des constituants de la courbe standard, faite à partir d'un stock de 2 mg/ml en albumine (Pierce, Rockfort, IL) et de chacun des lysats non-dilués et /ou dilués dans H₂O ont été incubés pendant 45 minutes à 37°C en présence de 200 μ l de la solution d'essai (50 parties de la solution A et 1 partie de la solution B) (trousse «BCA protein», Pierce, Rockfort, IL). L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. Finalement, la concentration protéique de chacun des lysats cellulaires de macrophages dosés a été obtenue à l'aide de l'équation de la courbe standard (D.O. à 540 nm en fonction de la concentration protéique en μ g/ml de chacun des constituants de la courbe standard).

8. Électrophorèse sur gel SDS-PAGE et électro-transfert sur membrane de nitrocellulose

Un total de 15 μ g de protéine, préalablement bouilli pendant 5 minutes à 100°C, a été fractionné sur mini-gel de SDS-polyacrylamide de 10% [gel de regroupement (6,1 ml/10 ml d'H₂O déionisée ; 2,5 ml/10 ml de Tris-HCl pH 6,8 à 0,5 M ; 100 µl/10 ml de SDS 10%; 1,33 ml/10 ml d'acrylamide/Bis 30% (37,5 : 1); 50 µl/10 ml de persulfate d'ammonium à 10% et 10 μ l/10 ml de TEMED) coulé sur un gel de séparation (4 ml/10 ml d'H₂O déionisée ; 2,5 ml/10 ml de Tris-HCl pH 8,8 à 1,5 M ; 100 µl/10 ml de SDS 10%; 3,33 ml/10 ml d'acrylamide/Bis 30% (37,5: 1); 50 µl/10 ml de persulfate d'ammonium à 10% et 5 µl/10 ml de TEMED)] à 200 volts pour approximativement 45 minutes utilisant le système électrophorétique Mini-Protean II (Bio-Rad). L'électrophorèse se faisait dans un tampon de migration 1X dilué dans H₂O déionisée d'un stock 5X (15g/L de Tris ; 72 g/L de glycine et 5 g/L de SDS ont été dissous dans de l'H₂Odéionisée). Un électro-transfert, utilisant le tampon de transfert (3,03 g/L de Tris ; 14,4 g/l de glycine et 200 ml de méthanol ont été dissous dans de l'H₂Odéionisée) à 4°C, a été effectué à 4°C pendant 1 heure à 100 volts sur membrane de nitrocellulose Hybond-ECL (Amersham Life Science Inc., ON Canada). Par la suite pour vérifier si les protéines ont été bien transférées sur la membrane, une révélation au rouge de ponceau (0,5% de rouge pouceau (Sigma); 0,1% d'acide acétique dans H₂O) a été effectuée. Ensuite, les membranes ont été bloquées toute la nuit à 4°C dans une solution de blocage à base de PBS-T (PBS 1X/0,1% de Tween-20) contenant, soit, 5% de lait en poudre pour la détermination du niveau en protéine de PKC- α , ou soit, 5% BSA (ICN Biomedicals Inc. Ohio, USA) pour la phosphorylation du facteur de transcription NF- κ B et des MAPK.

9. Immunobuvardage de type Western Blot

L'analyse de type Western Blot se caractérise par deux incubations, subséquentes d'une heure à température ambiante sur plateau basculant, de deux anticorps différents dilués dans une solution de dilution [PBS 1X/0,1% de Tween-20; 5% de BSA et 0,01% de NaN₃ (sodium azide)] intercalées d'une série de plusieurs lavages (1 fois 15 min. et 2 fois 5 min.) avec du PBS 1X/0,1% de Tween-20 (Towbin et al., 1979). Finalement, une immunodétection a été effectuée par chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science). Pour la détermination du niveau en protéine de PKC- α , l'anticorps monoclonal anti-PKCα, provenant de Transduction Laboratories (Lexington, KY) a été utilisé comme premier anticorps. Le deuxième anticorps a été un anti-souris couplé à la peroxydase [anti-mouse Ig, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep)] (Amersham Life Science). La phosphorylation et la dégradation de IkBa ont été analysées par l'utilisation des anticorps anti-phospho-IkBa (SER32) et anti-IkBa de New England BioLabs (Beverly, MA). Les formes phosphorylées et totales des MAP kinases JNK1/2 (Jun Nterminal kinase), p38 et MEK1/2 ont été détectées en utilisant les anticorps suivants : «anti-Active» JNK de Promega (Madison, WI), anti-phospho-p38 (Tyr 182), antiphospho-MEK1/2 (Ser217/221), anti-JNK, anti-p38 et anti MEK1/2 de New England BioLabs. Pour la détermination de la phosphorylation et de la dégradation de I κ B α et de même que pour la détection des formes phosphorylées et totales de chacune des MAP kinases analysées, l'anti-lapin couplé à la peroxydase [anti-rabbit Ig, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey)] (Amersham Life Science) a été utilisé comme deuxième anticorps. Les dilutions effectuées pour chacun de ces anticorps ont été celles conseillées par le manufacturier.

10. Analyse de l'attachement du phorbol ester marqué [³H]PDBu

L'attachement du [³H]phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) a été mesuré pour estimer les niveaux attachement du phorbol ester à la molécule de PKC liée à la membrane, comme il a été décrit par Mizuno et collaborateurs (Mizuno *et al.*, 1991). Les cellules (2,5 X 10⁵), préalablement adhérées 18 heures sur une plaque de 24 puits (Corning Costar, Cambridge, MA USA), ont été lavées deux fois avec du tampon d'attachement (Dulbecco's modified Eagle's medium; 1mg/ml BSA (bovine serum albumine) (ICN Biomedicals Inc.); 10 mM Hepes, pH 7,0) et incubées en présence de 10 nM de [³H]PDBu (DuPont NEN, ON, Canada) pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont été ensuite lavées trois fois avec du PBS 1X froid, lysées avec 0,1 N de NaOH et finalement, l'attachement à [³H]PDBu a été mesuré par un compteur à scintillation liquide. Les déterminations de l'attachement non-spécifique et de l'attachement total ont été effectuées en triplicata en présence de 10 mM de PDBu non-marqué, respectivement (Sigma, St.Louis, MO). L'attachement spécifique est la différence entre l'attachement total et l'attachement non-spécifique.

11. Extraction d'ARN

Quatre millions de cellules/puit ont été adhérées sur une plaque de 6 puits. Après un maximum de 18 heures d'adhérence, les cellules ont été incubées avec 1,5 ml/puit de nouveau milieu DMEM complet, en absence ou en présence de 10 ng/ml ou de 100 ng/ml de LPS (*Escherichia coli*, souche 0127:B8, Sigma) pendant 6 heures. L'extraction de l'ARN ont été ensuite effectuée selon la méthode suggérée par RNAzol B (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX). Afin que les cellules soit complètement lysées, celles-ci ont été passées plusieurs fois à travers d'une seringue de 3 ml avec une aiguille 18G une fois en contact de la solution de RNAzol B. L'ARN obtenu a été resuspendu dans 40 µl d'EDTA 1mM, pH 7,8 et l'ARN a été quantifié au spectrophotomètre à 260 nm, où 1 unité de densité optique à 260 nm correspond à 40 μ g/ml d'ARN.

12. Analyse de type Northern Blot

Quinze µg d'ARN ont été dénaturés à 50°C pendant 1 heure utilisant 7 M de glyoxal déonisé (Sigma) (Descoteaux and Matlashewski, 1990). Vingt-cinq µl des échantillons dénaturés avec 5 µl de tampon de migration (50% de glycérol ; 0,05% de bleu de bromophénol et 0,2 µg/µl bromure d'éthidium dans 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,0) ont migrés à 90 volts sur gel d'électrophorèse de 1% d'agarose contenant 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 pendant 1 heure 30 minutes. Ensuite, un transfert par capillarité sur membrane de Nylon (Hybond-N, Amersham Life Science), utilisant un tampon de transfert 20X SSC (3 M de NaCl et 300 mM de citrate de sodium, pH 7,0) a été effectué. La membrane a été immergée ensuite dans une solution de 20mM de Tris-HCl, pH 8,0 à 100°C pour enlever les résidus de glyoxal. Puis, la membrane a été d'abord pré-hybribée pendant 4 heures dans un tampon de pré-hybribation [2X SSPE ; 0,5% SDS ; 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon (Sigma) dans une solution de 5X Denhart's] dans un four à hybribation (Tek Star, Bio/Can Scientific) à 68°C et ensuite hybridée toute la nuit à 68°C dans une solution d'hybridation (2X SSPE ; 0,5% SDS ; 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dans une solution de 1X Denhart's) contenant la sonde radioactive respective du gène désiré et mesuré. Celle-ci a été préparée préalablement en dénaturant 2 µl d'ADN, correspondant au gène désiré, dans 28 µl H₂O à 100°C pendant 5 minutes. Ensuite, sur glace, ont été ajouté 10 µl de tampon OLB ; 2 µl de BSA 100X ; 0,5 µl de Klenow et 7 µl ³²P dCTP (DuPont) et une réaction de 24 heures à température ambiante a suivie. La sonde de TNF-α est un fragment PstI de 1,5 kb du vecteur pmTNF-1 (Fransen et al., 1985) obtenu de W. Fiers ; la sonde IL-1a est un fragment BamHI-HindIII de 2,0 kb du vecteur pmIL1A (Lomedico et al., 1984) obtenu de l'ATCC et la sonde de l'oxyde

nitrique synthétase inductible (iNOS) est un fragment *HincII-Eco*RI de 817bp du vecteur piNOSL3 (Xie *et al.*, 1992) obtenu de D. Radzioch. Après l'hybribation de chacune des membranes avec leur sonde radioactive respective, une série de lavages à 68°C de 15 minutes chacun a été effectuée, une fois dans une solution de 2X SSC, deux fois dans une solution 1X SSC/0,1% SDS et deux fois dans une solution de 0,1X SSC/0,1% SDS. Puis, les membranes ont été fixées sous U.V. Et finalement, le signal des sondes marquées, correspondant au gène désiré et mesuré, a été visualisé par autoradiographie et quantifié par image analyse (BioRad, modèle GS-670 Densitomètre). Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires.

13. Détermination des nitrites

Les macrophages (2,5 X 10^5 cellules/puit) ont été adhérés sur une plaque de 24 puits comprenant 0,5 ml/puit de milieu DMEM complet. Après un maximum de 18 heures d'adhérence, les cellules ont été incubées avec 0,5 ml/puit de nouveau milieu DMEM complet, en absence ou en présence de 10 ng/ml ou de 100 ng/ml de LPS (*Escherichia coli*, souche 0127:B8, Sigma) pendant 18 heures. La concentration des nitrites libérés dans les surnageants a été déterminée par l'utilisation de microplaques de 96 puits, d'une courbe standard, faite à partir d'un stock de 100 mM de NaNO₂ (Sigma) et des réactifs de Griess (Green *et al.*, 1990b). À la fin de la période d'incubation de 18 heures, 100 µl des surnageants de chacun des puits ont été incubés pendant 30 minutes à l'obscurité en présence de 50 µl d'un mélange 1:1 des réactifs de Griess [1% de sulfanilamide (Sigma)]. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. Finalement, la concentration des nitrites libérés dans chacun des surnageants dosées a été obtenue à l'aide de l'équation de la courbe standard (D.O. à 540 nm en fonction de la concentration des nitrites en µM de chacun des constituants de la courbe standard). Et chacune des concentrations en nitrites obtenues ont été normalisées comme suit : 100 µl du tampon de lyse (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 1 mM EGTA et 1% de Triton X-100) contenant des inhibiteurs de protéases (extraits de pancréas, pronase, thermolysine, chymotrypsine, trypsine et papaïne) (Boeheringer Mannheim), a été ajouté dans certains puits, préalablement lavés une fois avec du PBS 1X froid ; et la concentration protéique a été déterminée comme décrit plus haut (voir section 7). Le reste des surnageants ont été conservés à -70°C et ont été utilisés ultérieurement pour la quantification des cytokines (voir section 14)

14. Quantification des cytokines

La quantité des cytokines, TNF- α et IL-1 α , libérée dans les surnageants a été déterminée par ELISA, suivant le protocole du manufacturier. Pour les niveaux de TNF- α , un anticorps monoclonal de hamster anti-TNF- α murin et un anticorps monoclonal de lapin anti-TNF- α murin couplé à la biotine (les deux anticorps provenant de Genzyme, Cambridge, MA) ont été utilisés. Pour l'IL-1 α , un anticorps monoclonal de hamster anti-IL-1 α murin (Genzyme, Cambridge, MA), un sérum d'anticorps polyclonal de lapin antisouris d'IL-1α (Cerdarlane, ON, Canada) et un sérum de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Calbiochem, San Diego, CA) ont été utilisés. Afin de déterminer la concentration en cytokine de chacun des surnageants dosés, des courbes standards, utilisant des cytokines recombinantes de souris pour le TNF- α (Genzyme, Cambridge, MA) et pour IL-1a (R & D System, Minnesapolis, MN), ont été effectuées. De plus, un substrat (solution de pNPP) mélangé dans du tampon diethalolamine (97 ml de diethalolamine et 100 mg MgCl₂ x 6H₂O , à pH 9,8 et à volume final de 1 000 ml), suivi d'une incubation de 40 minutes à la noirceur et à la température ambiante ont été effectués dans le but de réaction et de détection des niveaux en cytokines. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 405 nm. Finalement, la concentration des

cytokines libérées dans chacun des surnageants dosés a été obtenue à l'aide de l'équation de la courbe standard (D.O. à 540 nm en fonction de la concentration de chacun des constituants de la courbe standard, faite à partir des cytokines recombinantes de TNF- α et d'IL-1 α en ng/ml et pg/ml respectivement). Et chacune des concentrations en cytokines obtenues ont été normalisées, à partir des concentrations protéiques obtenue préalablement pour la détermination des nitrites (voir section 13).

15. Détermination de MMP-9

Les cellules ont été adhérées à la même concentration et aux même conditions que décrit à la section 13, à l'exception que la stimulation au LPS a été effectuée dans du milieu DMEM sans sérum. La sécrétion de MMP-9 dans les surnageants a été déterminée par gélatine-zymographie comme décrit par Tremblay et collaborateurs (Tremblay *et al.*, 1995). Des aliquots des surnageants cellulaires ont été fractionnés par électrophorèse sur gel de 8% de SDS-polyacrylamide contenant 1% de gélatine (Sigma). Le gel a été lavé pour enlever le surplus de SDS et incubé pendant 18 heures à 37°C dans un tampon renaturant (50 mM de Tris ; 5 mM de CaCl₂ ; 0,02% de NaN₃ et 1% de Triton-X-100). L'activité de MMP-9 a été visualisée sur gel de Cromassie-bleu brillant G-250 et quantifiée par image analyse (BioRad, modèle GS-670 Densitomètre). Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires.

16. Infection des macrophages

Les macrophages ont été infectés avec les *Leishmania* LV9-Luc, obtenus par électroporation de l'ADN du vecteur pGEM 72f/aneluc (voir section 5.2) et avec des

bactéries (*Legionella pneumophila* et un mutant thermosensible (Tsm) de *Pseudomonas aerusinosa*). Il existe deux protocoles d'infection concernant ces deux types de microbes.

16.1 Infection des macrophages avec Leishmania LV9-Luc

Les macrophages (2,5 X 10⁵ cellules/puit) ont été adhérés sur une plaque de 24 puits comprenant 0,5 ml/puit de milieu DMEM complet. Après un maximum de 18 heures d'adhérence, les macrophages ont été infectés à un ratio Leishmania LV9-Luc/macrophages de 10 : 1 pendant 1 heure à 37°C. Les promastigotes de Leishmania ont été resuspendus dans un volume de milieu DMEM complet, afin d'obtenir 0,5 ml/puit. Après 1 heure d'infection, chacun des puits ont été lavés une fois rapidement, suivie de trois fois de 10 minutes chacune avec du milieu DMEM sans sérum sur plateau basculant. Après la série de lavages, certains puits (servant à l'étude de la survie du parasite), de deux plaques différentes, ont été incubés pendant 24 heures et 48 heures à 37°C avec 0,5 ml/puit de milieu DMEM complet avec 200 µg/ml de G418. Alors que d'autres puits (servant à l'étude de la phagocytose du parasite), d'une autre plaque, ont été immédiatement lavés une fois avec du PBS 1X froid et lysés avec 100 μl/puit de tampon de lyse 1X (Promega). Cette étape de lyse des cellules infectées a été également effectuée pour les autres puits des deux autres plaques après leur temps d'incubation supplémentaire. Les lysats cellulaires infectés ont été récoltés et conservés à -70°C avant que leur activité en luciférase ne soit dosée par luminomètre (voir section suivante).

16.1.1 Mesure de l'activité en luciférase

L'activité en luciférase a été mesurée dans les extraits de Leishmania LV9-Luc (obtenus de la façon décrite à la section 6.2) et des macrophages infectés par les Leishmania LV9-Luc (obtenus à la section précédente) en utilisant la trousse de luciférase de Promega (Promega Luciferase assay system), en suivant le protocole recommandé par le manufacturier. Vingt µl des lysats de Leishmania LV9-Luc et des macrophages infectés par les Leishmania LV9-Luc ont été mélangés avec 100 µl du substrat de luciférase (Promega), tous les deux étant à température ambiante, puisqu'à une température entre 0°C et 4°C, l'activité de l'enzyme est diminuée de 10%. Ensuite, la réaction a été immédiatement placée dans un luminomètre, puisque l'intensité lumineuse de la réaction est constante pour les 20 premières secondes et par la suite, décroît lentement jusqu'à sa demi-vie qui est de 5 minutes. Finalement, les résultats ont été exprimés en unité lumineuse relative par secondes (RLU/s) en fonction des heures d'infection. De plus, une courbe standard (RLU/s en fonction du nombre de Leishmania LV9-Luc) a été effectuée à partir d'un lysat Leishmania LV9-Luc (obtenus de la façon décrite à la section 6.2) de la suspension initiale. D'abord pour vérifier si les transfectants de Leishmania LV9-Luc exprimaient vraiment le gène de luciférase et pour vérifier l'exactitude des résultats de chacune des expériences d'infection effectuées (voir Figure 12 de la section Résultats).

16.2 Infection bactérienne des macrophages

16.2.1 Macrophages contrôles utilisés

Les macrophages péritonéaux des lignées de souris C57BL/6 et A/J ont été obtenus par des lavages péritonéaux avec 10 ml de RPMI 1640 complet froid comprenant de la gentamycine et ont servis de contrôles lors des expériences d'infection bactérienne. La suspension cellulaire de ces macrophages a été centrifugée et resuspendue dans du milieu RPMI 1640 complet sans antibiotiques.

16.2.2 Souches bactériennes et préparation des suspensions bactériennes

16.2.2.1 Legionella pneumophila

Trois jours avant l'infection, deux géloses BCYE (buffered charcoal yeast extract) avec agar (Difco Laborarories, Detroit, Mich.) ont été ensemencées par étalement avec 500 μ l d'un stock de la souche de *Legionella pneumophila*, dilués dans 900 μ l de PBS 1X et ces pétris ont été incubés dans un incubateur-bactérien à une température de 37°C pendant trois jours. Au troisième jour, à partir d'un des pétris, une loupe entière de bactéries a été resuspendue dans 10 ml de PBS 1X, bien vortexer et l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre programmé à 600 nm. Les dilutions dans le PBS 1X ont été effectuées jusqu'à obtenir une absorbance entre 0,195 et 0,200 nm (équivalant à une concentration de 1 X 10⁸ bactéries/ml). La suspension bactérienne utilisée pour l'infection a été de 2 X 10⁶ bactéries/ml, soit une dilution de 1/50 dans du

milieu RPMI 1640 complet sans antibiotiques à partir de la suspension initiale obtenue (1 X 10⁸ bactéries/ml).

16.2.2.2 Tsm de Pseudomonas aeruginosa

La suspension bactérienne du mutant thermosensible (Tsm) de *Pseudomonas* aeruginosa a été obtenue comme suit. Une journée avant l'infection, une colonie isolée sur gélose TSA (Tripticase Agar Broth, bactoagar) du Tsm de *Pseudomonas aeruginosa* a été resuspendue dans du milieu de TSB (Tryticase Soy Broth; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) à une température entre 28°C et 30°C sur un incubateur-agitateur pendant 16 heures. Le lendemain, des dilutions dans du PBS 1X ont été effectuées de la même façon que pour *L. pneumophila*, afin d'obtenir une concentration près de 1 X 10⁸ bactéries/ml (correspondant à une absorbance de 0,125 nm). La suspension bactérienne utilisée pour l'infection à Tsm de *P. aeruginosa* a été de 5 X 10⁶ bactéries/ml, soit une dilution de 1/20 dans du milieu RPMI 1640 complet sans antibiotiques à partir de la suspension initiale obtenue (1 X 10⁸ bactéries/ml).

16.3 Protocole d'infection bactérienne des macrophages

Un million de cellules/ml [macrophages contrôles (section 16.2.1) et des macrophages RAW 264.7 transfectés (obtenus à la section 5.1] ont été adhérées en triplicata dans deux plaques de 48 puits (Costar), l'une servant à mesurer la phagocytose et l'autre à mesurer l'activité bactéricide des macrophages utilisés. Chacune des plaques contenaient 0,5 ml/puit de milieu RPMI 1640 complet sans antibiotiques et ont été incubées pendant 90 minutes à 37°C. Après l'adhérence, les surnageants de chacun des

puits utilisés ont été aspirés et les puits ont été lavés deux fois avec du milieu RPMI 1640 sans sérum et sans antibiotiques. Ensuite, les cellules ont été infectées avec 500 µl de la suspension bactérienne préalablement préparée (1/50 pour L pneumophila et 1/20 pour le Tsm de P. aeruginosa, obtenus respectivement aux sections 16.2.2.1 et 16.2.2.2) à 37°C pendant 90 minutes pour L pneumophila et 30 minutes pour le Tsm de P. aeruginosa. Après l'infection, les surnageants cellulaires ont été aspirés et les puits ont été lavés deux fois avec du milieu RPMI 1640 sans sérum et sans antibiotiques. La plaque servant à mesurer l'activité bactéricide a été incubée, dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂, avec 0,5 ml/puit de milieu RPMI 1640 complet sans antibiotiques pendant trois jours pour L pneumophila et pendant 90 minutes pour le Tsm de P. aeruginosa. Alors que, 0,5 ml/puit d'une solution H₂O déionisée stérile avec 0,01% de BSA ont été ajoutés dans chacun des puits de la seconde plaque (servant à mesurer la phagocytose). Ensuite, les puits de la seconde plaque, servant à mesurer la phagocytose, ont été grattés et les lysats des cellules infectées ont été recueillis, afin d'effectuer pour chacun, des dilutions de 1/10 dans du PBS 1X. Chacune de ces dilutions ont été ensemencées par étalement sur géloses BCYE agar pour L pneumophila pendant trois jours à 37°C et sur géloses TSA pour le Tsm de P. aeruginosa, pendant 16 heures à une température entre 28°C et 30°C. Ces étapes, d'extraction des lysats cellulaires infectés et d'ensemencement par étalement sur géloses, ont également été effectués pour la plaque servant à mesurer l'activité bactéricide, après son temps d'incubation supplémentaire. Une fois la croissance sur géloses effectuée, les CFU (dilution ayant plus de 50 bactéries et moins de 100 bactéries) ont été comptés et compilés, afin d'exprimer les résultats en log moyens de bactéries/macrophages en fonctions de chacun des types de macrophages infectés.

Résultats

1. Génération de lignées stables de macrophages RAW 264.7 surexprimant le dominant-négatif (DN) de PKC-α

Les transfectants stables de deux populations indépendantes de la lignée de macrophages RAW 264.7 électroporés avec la construction pCIN-DN PKC-α ont été sélectionnés en présence de 500 µg/ml de G418 dans le milieu de culture complet. Un immunobuvardage de type Western Blot a été effectué pour trois clones DN PKC-a sélectionnés à partir de chacune des deux populations indépendantes de transfectants, afin de déterminer leurs niveaux d'expression en protéines PKC- α , comparativement à la protéine PKC- α endogène. Trois clones DN PKC- α de la première population de transfectants (clones DN PKC- α B1, C2 et D1) et un clone DN PKC- α provenant de la seconde population de transfectants (clone DN PKC-a A2) ont été sélectionnés et leurs niveaux de surexpression ont été supérieurs à celui de la protéine PKC-a endogène. Par la suite, afin de déterminer l'effet de la surexpression du DN PKC- α sur les réponses de ces macrophages induites par le LPS, l'habileté des ces quatre clones surexprimant le DN PKC- α à produire de l'oxyde nitrique (NO) par la stimulation au LPS a été mesurée. Les résultats présentés au Tableau 1 démontrent que la production de NO induite par le LPS est inhibée pour les quatre clones surexprimant le DN PKC- α (clones DN PKC- α B1, D1, A2 et C2) comparativement aux macrophages uniquement transfectés avec le vecteur pCIN₄. L'inhibition de la production de NO induite par le LPS est uniquement une conséquence de la surexpression du DN PKC- α , puisque la production de NO induite par le LPS pour trois clones de macrophages RAW 264.7 transfectés avec une construction de l'ADNc de souris de la forme sauvage de PKCζ (Goodnight et al., 1992) (clones PKCZ A1, A2 et B1) est similaire aux cellules RAW 264.7 transfectées uniquement avec le vecteur pCIN₄ (Tableau 1).

Tableau 1. Inhibition de la sécrétion de NO induite par le LPS chez les macrophages surexprimant le DN PKC- α . Les cellules adhérentes (2,5 X 10⁵ cellules/puit) ont été incubées en absence ou en présence de 10 ng/ml ou de 100 ng/ml de LPS pendant 18 heures. Les niveaux de nitrites ont été mesurés comme décrit à la section 13 du Matériel et méthodes. Dans l'expérience 1, les clones de cellules RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α ont été comparées aux cellules RAW 264.7 transfectées uniquement avec le vecteur pCIN₄ pour la production de nitrites. Dans l'expérience 2, les clones de cellules RAW 264.7 transfectées avec la construction de PKC- ζ ont été comparées aux cellules RAW 264.7 transfectées uniquement avec le vecteur pCIN₄ pour la production de nitrites. Dans l'expérience 2, les clones de cellules RAW 264.7 transfectées avec la construction de PKC- ζ ont été comparées aux cellules RAW 264.7 transfectées uniquement avec le vecteur pCIN₄.

^a Ces valeurs représentent la moyenne <u>+</u> l'écart-type pour une expérience dont les échantillons étaient en triplicata.

Cellules	Stimulation au LPS (ng/ml)		
	0	10	100
	Nitrites (mM) ^a		
EXP :1			
pCIN-4 DN PKC-α A2 DN PKC-α C2 DN PKC-α B1 DN PKC-α D1 EXP : 2	$\begin{array}{c} 2,1 \pm 0,5 \\ 3,0 \pm 0,6 \\ 2,1 \pm 0,1 \\ 2,3 \pm 0,2 \\ 1,7 \pm 0,1 \end{array}$	$44,5 \pm 2,8 \\ 12,3 \pm 1,0 \\ 5,0 \pm 0,8 \\ 5,0 \pm 0,6 \\ 10,6 \pm 0,5$	$48,0 \pm 2,4 \\ 17,5 \pm 3,2 \\ 8,1 \pm 0,9 \\ 8,1 \pm 1,9 \\ 15,6 \pm 3,6$
pCIN-4 ΡΚC-ζ Α1 ΡΚC-ζ Α2 ΡΚC-ζ Β1	$\begin{array}{c} 2,9 \pm 0,7 \\ 3,2 \pm 0,2 \\ 3,0 \pm 0,5 \\ 3,2 \pm 0,2 \end{array}$	14,5 ± 4,3 15,6 ± 1,9 10,4 ± 1,1 11,8 ± 1,2	19,4 ± 2,5 20,4 ± 5,2 17,4 ± 2,9 19,1 ± 1,4

Le clone DN PKC- α A2, qui surexprime deux fois plus la protéine PKC- α comparativement au niveau endogène, et le clone DN PKC- α C2, qui surexprime dix fois plus la protéine PKC- α comparativement au niveau endogène (Figure 6A), ont été sélectionnés pour des analyses ultérieures. L'augmentation du niveau de surexpression de ces deux clones DN PKC- α a été également démontrée par la mesure de l'attachement spécifique au phorbol ester marqué, [³H]PDBu (Knopf *et al.*, 1986). Ces niveaux d'attachement au [³H]PDBu sont supérieurs pour les deux clones DN PKC- α (1,3 fois plus pour le clone A2 et 2 fois plus pour le clone C2) comparativement à la lignée parentale contrôle (RAW 264.7 transfectées uniquement avec le vecteur pCIN₄) (Figure 6B). Finalement, les caractéristiques morphologiques et de croissance des clones DN PKC- α A2 et C2 sont identiques aux cellules parentales. Il est important de noter que le niveau de surexpression de la forme sauvage de PKC- α dans la lignée de macrophage RAW 264.7 s'est avérée toxique pour ces cellules.

2. Effet de la surexpression du DN PKC-α sur l'expression des gènes TNF-α, IL-1α et iNOS induits par le LPS

Le LPS induit, chez les macrophages stimulés, l'expression des gènes de TNF- α , d'IL-1 α et de iNOS. Pour déterminer le rôle de PKC- α dans ce processus, les niveaux d'expression de ces trois gènes (TNF- α , IL-1 α et de iNOS) dans les cellules contrôles RAW 264.7 (uniquement transfectées avec le vecteur pCIN₄) et dans les deux clones (A2 et C2) surexprimant le DN PKC- α après avoir été stimulés au LPS (10 et 100 ng/ml) pendant 6 heures ont été analysés. Pour les cellules contrôles RAW 264.7, le LPS induit l'expression de ces trois gènes en fonction de la dose (Figure 7, lignes 1-3). La surexpression du DN PKC- α a un effet inhibiteur mineur sur l'induction de l'expression du gène de TNF- α (Figure 7, en haut). Une réduction de 20 à 25% pour le clone A2 (lignes 5 et 6) et une réduction de 45 à 55% pour le clone C2 (lignes 8 et 9) ont été **Figure 6.** Surexpression du DN PKC- α dans la lignée de macrophages RAW 264.7. (A) Les niveaux de surexpression en protéine PKC- α des macrophages RAW 264.7 électroporés uniquement avec le vecteur pCIN₄ (contrôle cellulaire, ligne 1), ou avec la construction pCIN-DN PKC- α (clone A2, ligne 2 ; clone C2, ligne 3) ont été déterminés par immunobuvardage de type «Western Blot» à partir des lysats cellulaires, comme décrit aux sections 6.1.1 et 9 du Matériel et méthodes. (B) Les niveaux d'attachement au [³H]PDBu ont été déterminés pour les cellules adhérentes (contrôle cellulaire, ligne 1 ; clone A2, ligne 2 ; clone C2, ligne 3), comme décrit à la section 10 du Matériel et méthodes et normalisés par le niveau en protéine, comme décrit à la section 7 du Matériel et méthodes. Cette expérience a été faite en triplicata et répétée deux fois avec des résultats similaires.



Figure 7. Effet de la surexpression du DN PKC- α sur l'expression des gènes TNF- α , IL-1 α et iNOS induits par le LPS. Les cellules adhérentes (le vecteur seul, le clone A2 et le clone C2) ont été incubées en absence (lignes 1, 4 et 7) ou en présence de 10 ng/ml (lignes 2, 5 et 8) ou de 100 ng/ml (lignes 3, 6 et 9) de LPS pendant 6 heures. L'ARN totale a été extraite et l'analyse de type «Northern Blot» ont été effectuées comme décrits aux sections 11 et 12 du Matériel et méthodes. En haut, les résultats correspondent à l'utilisation de la sonde radioactive du gène de TNF- α , au milieu, du gène de l'IL-1 α et en bas, du gène iNOS. L'intégrité de l'ARN et du chargement du gel peuvent être visualisés par le gel au bromure d'éthide complètement en bas. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres expériences effectuées séparément.



remarquées, comparativement aux cellules contrôles (lignes 2 et 3). Par contre, l'induction du LPS sur l'expression du gène de IL-1 α est réduit de 50 à 70% pour le clone A2 (Figure 7, au centre, lignes 5 et 6) et complètement inhibée pour le clone C2 (lignes 8 et 9), comparativement aux cellules contrôles (lignes 2 et 3). Finalement, l'expression du gène de iNOS est réduit de 50 à 60% pour le clone A2 (Figure 7, en bas, lignes 5 et 6) et réduit de 65 à 75% pour le clone C2 (lignes 8 et 9), comparativement aux niveaux d'expression du gène de iNOS pour les cellules contrôles (lignes 2 et 3). Les pourcentages d'inhibition sont en corrélation avec les niveaux de surexpression des DN PKC- α .

3. Effet de la surexpression du DN PKC-α sur la sécrétion de cytokines et sur la production de NO induites par le LPS

Par la suite, la comparaison des habiletés des cellules contrôles RAW 264.7 avec les clones A2 et C2 surexprimant le DN PKC- α à sécréter les cytokines TNF- α et IL-1 α et à produire du NO ont été vérifiées. En présence de 10 et de 100 ng/ml de LPS, les macrophages contrôles RAW 264.7 sécrètent de haut niveaux de TNF- α et d'IL-1 α et produisent également fortement du NO en fonction de la dose (Figure 8A, B et C). La sécrétion de la cytokine TNF- α (Figure 8A) pour le clone A2 est similaire aux cellules contrôles RAW 264.7 et elle est réduite de 40 à 50 % pour le clone C2. Des résultats similaires ont été observés pour deux autres surexprimant le DN PKC- α (les clones B1 et D1). Des réductions de 55% pour le clone B1 et de 40% pour le clone D1 en réponse à une stimulation de 100 ng/ml de LPS ont été observées comparativement à la sécrétion de TNF- α des cellules contrôles RAW 264.7 (résultats non représentés graphiquement). Les résultats de la Figure 8B démontrent que les clones A2 et C2 surexprimant le DN PKC- α ne sécrètent pas la cytokine IL-1 α en réponse à une concentration de 10 ng/ml de LPS, suivant la logique d'inhibition de l'expression du gène de IL-1 α (Figure 7B). À une **Figure 8.** Effet de la surexpression du DN PKC- α sur la sécrétion de TNF- α , IL-1 α et sur la production de NO. Les cellules adhérentes (le vecteur seul, les barres blanches ; le clone A2, les barres hachurées et le clone C2, les barres noires) ont été incubées en absence ou en présence de 10 ng/ml ou de 100 ng/ml de LPS pendant 18 heures. Les niveaux de TNF- α (A), IL-1 α (B) et de nitrites (C) libérés dans les surnageants cellulaires ont été déterminés et normalisés par le niveau en protéine, comme décrits aux sections 13 et 14 du Matériel et méthodes. Chacune des déterminations (en cytokines et en NO) ont été effectuées en triplicata et des résultats similaires ont été obtenus dans quatre expériences différentes.



concentration de 100 ng/ml de LPS, la sécrétion de IL-1 α est très légèrement augmentée pour le clone A2 et est à peine plus forte que le niveau basal du clone C2 (Figure 8B). Des résultats similaires ont été obtenus pour les clones B1 et D1, où ces deux clones ne sécrètent pas d'IL-1 α à une concentration de 100 ng/ml de LPS. La production de NO (Figure 8C) a été réduite de 60 à 70% pour le clone A2 et de 80 à 90% pour le clone C2, comparativement aux cellules contrôles RAW 264.7. Ainsi, la surexpression du DN PKC- α à un effet inhibiteur majeur sur la sécrétion de la cytokine IL-1 α et sur la production de NO.

4. La surexpression du DN PKC-α augmente la sécrétion de MMP-9 induite par le LPS

En plus de sécréter les cytokines proinflammatoires comme le TNF- α et IL-1 α et de produire du NO, les macrophages stimulés au LPS sont capables de sécréter une variété d'hydrolases, incluant MMP-9 (Van Ranst et al., 1991). Basé sur des d'études antérieures utilisants une variété d'inhibiteurs de PKC, il a été proposé que PKC exerce à la fois une régulation négative et positive sur la sécrétion de MMP-9 dans les macrophage stimulés au LPS (Tremblay et al., 1995). Afin de déterminer le rôle de PKC- α dans ce processus, la sécrétion de MMP-9 dans les surnageants des cellules contrôles RAW 264.7 et dans les deux clones (A2 et C2) surexprimant le DN PKC-a après une stimulation de 18 heures aux concentrations de 10 et de 100 ng/ml de LPS a été mesurée. Les résultats de la Figure 9 démontrent que les niveaux de sécrétion de MMP-9 sont significativement plus hauts pour les surnageants des clones A2 (2 fois plus, lignes 7 à 10) et C2 (4 fois plus, lignes 12 à 15), comparativement aux surnageants stimulés des cellules contrôles RAW 264.7 (lignes 2 à 5). On note également, une réduction de la sécrétion de MMP-9 pour les cellules normales RAW 264.7 stimulées à une concentration de 100 ng/ml de LPS 5) qui n'est pas observée pour les clones (lignes 4 et

Figure 9. Effet de la surexpression du DN PKC- α sur la sécrétion de la MMP-9. Les cellules adhérentes (le vecteur seul, lignes 1-5 ; le clone A2, lignes 6-10 ; et le clone C2, lignes 11-15) ont été incubées en absence (lignes 1, 6 et 11) ou en présence de 10 ng/ml de LPS (lignes 2, 3, 7, 8, 12 et 13) ou de 100 ng/ml de LPS (lignes 4, 5, 9, 10, 14 et 15) pendant 18 heures. L'activité en MMP-9 a été déterminée par zymographie, comme décrite à la section 15 du Matériel et méthodes. Les résultats représentés sur cette figure sont des résultats représentatifs de deux expériences effectuées différentes.



A2 (lignes 9 et 10) et C2 (lignes 14 et 15). Ainsi, l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 dans les clones surexprimant le DN PKC- α suggère que PKC- α régule de façon négative la sécrétion de MMP-9 dans la lignée de macrophages RAW 264.7 stimulés au LPS.

5. La phosphorylation et la dégradation de IκBα sont normales dans les macrophages surexprimants le DN PKC-α

Le traitement des macrophages au LPS induit une rapide dissociation du complexe NF- κ B et I κ B phosphorylé, de même qu'une rapide translocation de NF- κ B au noyau, afin de se lier à des séquences consensus d'ADN spécifiques (Sweet and Hume, 1996; Baeuerle and Henkel, 1994). Ce processus est d'abord initié par une phosphorylation de IkB par la IkB kinase, IKK- α , sur des résidus spécifiques en sérine (Régnier *et al.*, 1997; DiDonato et al., 1997), suivi par la suite de la poly-ubiquitination et de la dégradation de IkB phosphorylé dans les protéasomes. Afin de déterminer l'effet de la surexpression du DN PKC- α dans l'activation de NF- κ B, les mesures de la phosphorylation et la dégradation de IkBa par immunobuvardage de type Western Blot pour les cellules contrôles RAW 264.7 et pour le clone C2 stimulées à différentes périodes de temps au LPS ont été effectuées. Pour les deux, les cellules contrôles RAW 264.7 (Figure 10A, lignes 1 à 5) et le clone C2 (lignes 6 à 10), la phosphorylation de I κ B α est maximale entre 10 et 20 minutes suite à l'addition du LPS. Par la suite les niveaux de phosphorylation de IkB α diminuent à des temps de stimulation au LPS entre 20 et 30 minutes. La cinétique de dégradation de IkBa est également similaire pour les cellules contrôles RAW 264.7 (Figure 10B, lignes 1 à 5) et pour le clone C2 (lignes 6 à 10) avec une diminution aux temps de stimulation au LPS entre 10 et 20 minutes. Ainsi, la surexpression du DN PKC- α n'interfère pas avec la phosphorylation et la dégradation de IkB α induites par le LPS.

Figure 10. Effet de la surexpression du DN PKC- α sur l'activation de NF- κ B. Les cellules adhérentes (le vecteur seul, lignes 1-5; et le clone C2, lignes 6-10) ont été incubées en absence (lignes 1 et 6) ou en présence de 100 ng/ml de LPS pendant 5, 10, 20 et 30 minutes. Les extraits cellulaires ont été préparés et les niveaux de phosphorylation de I κ B α (membrane du haut) et de dégradation de I κ B α (membrane du bas) ont été déterminés par immunobuvardage de type «Western Blot», comme décrits aux sections 6.1.2 et 9 du Matériel et méthodes. Des résultats similaires ont été obtenus dans une expérience indépendante.



6. La phosphorylation des MAP kinases p38, JNK et MEK1/2 sont normales pour les macrophages surexprimants le DN PKC-α

Le LPS induit plusieurs voies de signalisation, incluant l'activation des MAP kinases ERK1/2, p38 et JNK (Han et al., 1994; Geppert et al., 1994). De plus, l'activation de p38 et JNK induite par le LPS sont requises pour l'expression de TNF- α et de IL-1 (Lee et al., 1994; Swantek et al., 1997). Donc, c'est pourquoi la détermination de l'effet de la surexpression du DN PKC-a impliquée dans ces voies de signalisation était importante à vérifier. La phosphorylation des MAP kinases JNK, p38 et MEK1/2 a été mesurée par cinétique de stimulation au LPS et analysée par immunobuvardage de type Western Blot. Pour les deux, les cellules contrôles RAW 264.7et le clone C2, la phosphorylation de p38 (Figure 11A) est détectée après une stimulation de 15 minutes et maximale à un temps de stimulation de 30 minutes, mais est quand même détectable après 60 minutes. Des résultats similaires ont été observés pour la phosphorylation de JNK (Figure 11B), détectée après une stimulation de 10 minutes et maximale à un temps de stimulation de 30 minutes. Et la phosphorylation de MEK1/2 (Figure 11C) est détectée et maximale à 30 minutes, mais est toujours détectable après 60 minutes. Ainsi, la phosphorylation des MAP kinases p38, JNK et MEK1/2 ne sont pas inhibées par la surexpression du DN PKC- α .

Figure 11. Effet de la surexpression du DN PKC- α sur la phosphorylation des MAP kinases. Les cellules adhérentes (le vecteur seul, et le clone C2) ont été incubées en absence (lignes1 et 6) et en présence de 100 ng/ml de LPS pendant différentes périodes de temps. L'extraction cellulaire a été effectuée et un immunobuvardage de type «Western Blot» a été fait, comme décrit aux sections 6.1.2 et 9 du Matériel et méthodes. (A) Niveaux de phosphorylation (en haut) et totaux (en bas) de p38. (B) Niveaux de phosphorylation (en haut) et totaux (en bas) de p38. (C) Niveaux de phosphorylation (en haut) et totaux (en bas) de JNK. (C) Niveaux de phosphorylation (en haut) et totaux (en bas) de MEK1/2. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux autres expériences similaires.



7. Augmentation de la survie intracellulaire de *Leishmania donovani* dans les macrophages surexprimant le DN PKC- α

Des études antérieures ont démontré que la baisse de la régulation ou l'inhibition de l'activité de PKC dans les macrophages, par l'utilisation d'inhibiteurs de PKC, bloquent complètement la capacité du macrophage à détruire le parasite Leishmania donovani et favorise ainsi sa réplication intracellulaire (Murray, 1982; Descoteaux et al., 1992; Moore et al., 1993). Ces études suggèrent donc la possibilité que PKC régule l'habileté du contrôle de réplication intracellulaire exercé par les macrophages contre L. donovani. Afin de déterminer le rôle de PKC- α dans ce processus, la comparaison de la survie des promastigotes de L. donovani entre les cellules contrôles RAW 264.7 et les deux clones (A2 et C2) surexprimant le DN PKC-α a été d'abord effectuée. Pour faciliter la quantification des niveaux d'infection, la génération de promastigotes (de la souche sauvage LV9) de L. donovani exprimant le gène de la luciférase a été effectuée (nommés LV9-Luc) (comme décrit à la section 5.2 du Matériel et méthodes). En utilisant cette approche, un nombre aussi bas que 100 parasites peuvent être détectés, et l'activité en luciférase mesurée à partir de lysats de parasite de concentrations se situant entre 10² à 10⁸ peuvent être détectées à l'intérieur d'une courbe linéaire (Figure 12). Après 1 heure d'infection, la quantité de promastigotes de L. donovani est similaire pour les trois lignées de macrophages (cellules contrôles RAW 264.7, clone A2 et clone C2), indiquant que la surexpression du DN PKC-a n'a aucun effet sur la phagocytose de Leishmania donovani (Figure 13A). Après 24 heures d'infection, une réduction du nombre de parasite est plus prononcée pour les cellules contrôles RAW 264.7, comparativement aux clones (A2 et C2) surexprimant le DN PKC-α (Figure 13A). Et après 48 heures d'infection, les cellules contrôles RAW 264.7 possèdent 8 fois moins de parasites que le clone A2 et 18 fois moins de parasites que le clone C2 (Figure 13A). Des résultats similaires ont été obtenus pour les clones B1 et D1 surexprimant le DN PKC- α (Figure 13C). Par la suite, les résultats concernant l'infection des macrophages avec les amastigotes in vitro de L.
donovani LV9-Luc ont présentés également une augmentation de la survie pour les clones (A2 et C2) surexprimant le DN PKC- α , comparativement aux cellules contrôles RAW 264.7 (Figure 13B). Les niveaux de production de NO libérés dans les surnageants des macrophages des cellules contrôles RAW 264.7 et dans les clones (A2 et C2) surexprimant le DN PKC- α infectés par les *L. donovani* LV9-Luc, démontrent que le parasite *Leishmania*, lui-même, ne stimule pas la production de NO par les macrophages non stimulés à l'IFN γ , confirmant ainsi des observations antérieures (Figure 14B) (Carrera *et al.*, 1996). Par conséquent, l'augmentation de la survie de *L. donovani* pour les clones (A2 et C2) surexprimant le DN PKC- α n'est pas une conséquence affectant la production de NO. Cette augmentation marquée de la survie des *L. donovani* pour les macrophages RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α , suggère que PKC- α joue un rôle dans le contrôle de la réplication intracellulaire du parasite *Leishmania donovani*.

8. Les macrophages surexprimant le DN PKC-α stimulés à l'IFNγ possèdent une activité anti-*Leishmania*

Le pré-traitement des macrophages à l'IFN γ induit une puissante activité anti-Leishmania (Murray et al., 1985). Ce processus a été vérifié, afin de déterminer si la surexpression du DN PKC- α avait un effet sur la capacité à détruire *L. donovani* pour ces macrophages stimulés à l'IFN γ . Pour se faire, les cellules contrôles RAW 264.7 et les clones A2 et C2 ont été incubés avec 100 U/ml de IFN γ pendant 24 heures avant l'infection avec les *Leishmania* LV9-Luc de la forme promastigotes. Les résultats de la Figure 14A démontrent que la quantité initiale de *L. donovani* est similaire pour les trois lignées de macrophages (cellules contrôles RAW 264.7, clone A2 et clone C2). Après 48 heures d'infection, la plupart des parasites sont tués, indiquant que l'activité anti-*Leishmania* des cellules surexprimant le DN PKC- α peut être activée par l'IFN γ . Figure 12 Courbe standard de l'activité en luciférase (RLU/s) en fonction du nombre de *Leishmania*. Les extraits totaux de *Leishmania* LV9-Luc de la forme promastigotes se situent à des concentrations totales en *Leishmania* entre 10^2 et 10^8 et ont été obtenus comme décrit à la section 6.2 du Matériel et méthodes. La mesure de l'activité en luciférase en RLU/s de ces lysats a été effectuée suivant le protocole décrit à la section 16.1.1 de Matériel et méthodes. Ce type de courbe linéaire a été effectué pour chacune des expériences d'infection des macrophages avec les *Leishmania* LV9-Luc.



y = 30,296 * x^0,85130 R^2 = 0,991

Figure 13. Effet de la surexpression du DN PKC- α sur la survie de *Leishmania donovani*. Les cellules adhérentes (le vecteur seul, représenté par le carré ; le clone A2, représenté par le losange ; le clone C2, représenté par le cercle) ont été infectées pendant différentes périodes de temps (1, 24 et 48 heures) et l'activité en luciférase a été mesurée pour chacun des lysats de macrophages infectés, afin d'exprimer les résultats en RLU/s, comme décrits aux sections 16.1 et 16.1.1 du Matériel et méthodes. (A) Infection avec la forme promastigotes des *Leishmania donovani* luciférase (LV9-Luc) et en (B) l'infection avec la forme amastigotes *in vitro* de ce parasite. (C) Infection avec la forme promastigotes des *Leishmania donovani* luciférase (LV9-Luc) pour les clones B1 et D1 surexprimant le DN PKC- α , où le vecteur seul est représenté par le carré ; le clone B1 est représenté par la croix; le clone D1, représenté par l'étoile. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois autres expériences similaires et distinctes pour les expériences A et B et qu'une seule fois supplémentaire pour l'expérience C.



Figure 14. Effet de l'IFN γ sur les macrophages surexprimant le DN PKC- α avant l'infection à *Leishmania donovani*. (A) Les cellules adhérentes (le vecteur seul, représenté par le carré ; le clone A2, représenté par le losange ; le clone C2, représenté par le cercle) ont été pré-incubées avec 100 U/ml IFN γ pendant 24 heures avant l'infection avec la forme promastigotes de LV9-Luc (suivant le protocole d'infection décrit à la section 16.1 du Matériel et méthodes). (B) Niveaux de NO libérés dans les surnageants de macrophages infectés pendant 48 heures ont été mesurés et normalisés par le niveau en protéine, comme décrit à la section 13 du Matériel et méthodes. Les niveaux de NO en blanc, correspondent à l'expérience représentée à la Figure 13A après 48 heures d'infection et les niveaux de NO en noirs correspondent à l'expérience représentée à la Figure 14A après 48 heures d'infection, où les macrophages ont été pré-traités à l'IFN γ 24 heures avant l'infection. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois autres expériences similaires et distinctes pour ces deux types d'expériences.



contrôles RAW 264.7 et des clones A2 et C2 permet la sécrétion de hauts niveaux de NO suite à l'infection (Figure 14B). L'IFN γ est le principal activateur de l'arsenal des macrophage pour leur l'activité anti-*Leishmania* (Green *et al.*, 1990a,b). Les hauts niveaux de production de NO libérés dans les surnageants des trois lignées de macrophages pré-stimulés à l'INF γ suite à l'infection de 48 heures (différence observée entre les trois lignées de macrophages est non significative), ainsi corrèlent avec l'activité anti-*Leishmania*.

9. La surexpression du DN PKC-α rend les macrophages permissifs à la réplication intracellulaire de Legionella pneumophila

Afin de déterminer l'effet de la surexpression du DN PKC- α sur la survie d'autres pathogènes intracellulaires, les trois lignées de macrophages (contrôles RAW 264.7 et les clones A2 et C2 surexprimant le DN PKC- α) ont été infectés avec Legionella pneumophila. Comme contrôles génétiquement résistants et susceptibles à l'infection, les macrophages péritonéaux des lignées de souris C57BL/6 et A/J respectivement ont été utilisés (Beckers, 1997). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules contrôles RAW 264.7 et les clones (A2 et C2) surexprimant le DN PKC- α après 1 heure 30 minutes d'infection (Figure 15A). Ainsi, tout comme L. donovani, le processus de phagocytose de L. pneumophila n'est pas affectée par la surexpression du DN PKC-α. Similaire aux macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 génétiquement résistants à l'infection, les cellules contrôles RAW 264.7, qui dérivent de la lignée de souris BALB/c génétiquement résistante, sont également non permissives à la réplication intracellulaire de L. pneumophila (Figure 15A). Par contre, après 72 heures d'infection, la réplication intracellulaire de L. pneumophila est augmentée de 35 fois pour le clone A2, de 145 fois pour le clone C2 et de 310 fois pour les macrophages péritonéaux de la lignée de souris A/J (Figure 15A), suggérant que les deux clones DN PKC-a sont

permissifs à réplication intracellulaire de *L. pneumophila*, puisque leurs résultats ressemblent beaucoup au contrôle (A/J) susceptible à l'infection. Afin de déterminer si la production de NO serait reliée à l'incapacité des clones A2 et C2 à contrôler la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*, la production de NO a été mesurée dans les surnageants des macrophages infectés pendant trois jours avec *L. pneumophila*. Aucune différence significative n'a été observée concernant la production de NO pour les trois lignées de macrophages infectées avec *L. pneumophila* (14,1 ± 3,1 μ M pour les cellules contrôle RAW 264.7, 12,4 ± 2,4 μ M pour le clone A2 et 12,6 ± 3,5 μ M pour le clone C2). Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que PKC- α joue une rôle dans le contrôle de la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*, par un mécanisme NO-indépendant.

10. Effet de la surexpression du DN PKC-α sur l'activité microbicide

Afin de déterminer si la surexpression de DN PKC- α affecte l'habileté des macrophages à détruire les microbes ingérés, l'activité bactéricide des macrophages surexprimants le DN PKC- α (clones A2 et C2) a été mesurée, en infectant ces macrophages avec un mutant thermosensible (Tsm) de Pseudomonas aeruginosa. Un mutant thermosensible ne peut pas croître à une température de 37°C, permettant ainsi de mesurer uniquement l'habileté de destruction bactéricide des macrophages. Comme le démontre la Figure 15B, les clones A2 et C2 exercent des fonctions de phagocytose et de bactéricidie normales contre l'infection au Tsm de *P. aeruginosa*. Dans leur ensemble, les résultats de la Figure 15B indiquent que la surexpression du DN PKC- α n'inhibe pas l'habileté des macrophages RAW 264.7 à phagocyter et à détruire *P. aeruginosa*.

Figure 15. Effet de la surexpression du DN PKC- α sur la phagocytose et l'activité microbicide. Les cellules adhérentes ont été infectées avec *Legionella pneumophila* (A), et unTsm de *Pseudominas aeruginosa* (B) pour des temps courts d'infection (en blanc) et pour des temps plus longs d'infection (en noir), comme décrit à la section 16.3 du Matériel et méthodes. Deux contrôles supplémentaires ont été utilisés, soient les macrophages péritonéaux de souris qui sont connus comme étant susceptibles (A/J) et résistants (C57BL/6) à *Legionella pneumophila*. Le nombre moyen de bactéries retrouvées en fonction de chaque type de macrophages utilisés a été exprimé en log. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois autres expériences similaires et distinctes pour ces trois expériences d'infection bactérienne.





Discussion

Des études antérieures ont permis de démontrer le rôle de PKC dans la régulation des fonctions des macrophages par l'activation des macrophages au LPS (Shapira et al., 1994; Liu et al., 1994), et par le pré-traitement des macrophages avec des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de PKC (comme le H-7) ou avec le phorbol ester qui inhibent la sécrétion des cytokines TNF- α et IL-1 α , la sécrétion de MMP-9, la production de NO et l'activité à détruire les tumeurs qui sont toutes des activités induites par le LPS (Shapira et al., 1994; Novotney et al., 1991; Kovacs et al., 1988; Taniguchi et al., 1989; Tremblay et al., 1995). Par contre, la contribution spécifique des différentes isoenzymes de PKC dans la régulation des fonctions spécifiques du macrophage est peut connue et basée uniquement sur des évidences indirectes. Dans la présente étude, les efforts ont été centrés sur le rôle de l'isoenzyme α de PKC dans la régulation des fonctions du macrophage. L'approche expérimentale utilisée consiste à surexprimer un mutant dominant-négatif de cette isoenzyme de PKC dans la lignée de macrophage RAW 264.7. La première conclusion importante concernant cette approche est que la surexpression d'un mutant DN PKC-a a des effets sélectifs sur les signaux de transduction induits par le LPS, suggérant que l'activité de PKC- α est requise pour des fonctions spécifiques du macrophage induites par le LPS. Particulièrement pour la production de IL-1 α et de NO, qui sont significativement inhibées dans les macrophages RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α (Figures 7 et 8).

Des études antérieures faites sur l'expression du gène iNOS ont permis de révéler que deux des isoenzymes de PKC réguleraient l'expression de ce gène. Une étude basée sur la régulation à la baisse des isoenzymes de PKC induite par le phorbol ester, a proposée que PKC-βII participerait à l'expression du gène iNOS et à la production de NO dans la lignée de macrophages J774 stimulés au LPS (Fujihara *et al.*, 1994). Plus récemment, une étude basée sur des transfectants transitoires de différentes isoenzymes de PKC dans la lignée de macrophages RAW 264.7, a démontrée que PKC-ε régulerait également l'expression du gène iNOS, mais plutôt en réponse au phorbol esters que par la voie dépendante au LPS (Diaz-Guerra et al., 1996). Par cette présente étude, les résultats des Figures 7 et 8 ont démontré que la surexpression du DN PKC- α inhibe la sécrétion de NO et l'expression génique de iNOS, suggérant que PKC- α est une autre isoenzyme de PKC qui régule la production de NO. Toutes ces observations mises ensembles, suggèrent la possibilité que l'expression du gène iNOS est régulé par plusieurs voies dépendantes de PKC activées par différents stimuli. De plus, considérant que l'expression du gène iNOS est régulé and Nathan, 1994; MacMicking and Nathan, 1997), il est donc possible que chacune des isoenzymes de PKC agissent à des étapes différentes dans la voie de signalisation menant à la production de NO.

La régulation de la production des cytokines IL-1 α et TNF- α dans les macrophages par des isoenzymes de PKC spécifiques n'est pas encore bien connu jusqu'à maintenant. Kovacs et collaborateurs (Kovacs et al., 1988) ont rapporté que la pré-incubation des macrophages péritonéaux de souris avec l'inhibiteur de PKC H-7 réduit, en fonction de la dose, l'expression génique de IL-1 α après la stimulation au LPS. La puissante inhibition de l'expression génique de IL-1 α par les macrophages RAW 264.7 surexprimant le DN PKC-α stimulés au LPS, démontré par les résultats de la Figure 7, suggère que PKC-α est l'une des isoenzymes de PKC qui régule l'expression du gène IL-1a. L'effet de la surexpression du DN PKC- α sur la production de TNF- α induite par le LPS est beaucoup moins importante au sujet des niveaux de sécrétion de la protéine TNF- α et de l'expression du gène TNF- α , qui est seulement réduit de 50% pour le clone C2, qui présente les plus hauts niveaux de surexpression du DN PKC- α (Figure 7 et 8). Ainsi, l'étude antérieure a permis de démontrer que l'inhibiteur de PKC H-7 inhibe fortement l'expression du gène TNF-a dans les macrophages de souris stimulés au LPS (Kovacs et al., 1988), nos résultats suggèrent que d'autres isoenzymes que PKC- α réguleraient l'expression génique de TNF- α .

Les macrophages sécrètent une variété d'hydrolases, incluant la MMP-9, dont leur principale fonction est le remodelage de la matrice extracellulaire (Nagase and Fields, 1996). L'expression de la MMP-9 (Van Ranst *et al.*, 1991) dans la lignée de macrophage RAW 264.7 est induite par le LPS et est régulée de façon négative ou de façon positive par les PKC (Tremblay *et al.*, 1995). C'est pourquoi l'effet de la surexpression du DN PKC- α sur la sécrétion de MMP-9 a été vérifiée. Contrairement à la sécrétion d'IL-1 α , de TNF- α et à la production de nitrites (Figure 7 et 8), les résultats de la Figure 9 démontrent que la surexpression du DN PKC- α augmente la sécrétion de MMP-9 dans les macrophages stimulés au LPS. Cette observation suggère que PKC- α est l'une des isoenzymes qui régule de façon négative la sécrétion de MMP-9 dans les macrophage stimulés au LPS. Grâce à ce résultat, nous pouvons conclure que la surexpression du DN PKC- α n'inhibe pas toutes les réponses au LPS.

Le facteur de transcription NF-kB est l'un des principaux médiateurs intracellulaires des réponses induites au LPS (Sweet and Hume, 1996; Baeuerle and Henkel, 1994). Lors de stimulation cellulaire, le complexe NF-KB et IKBa phosphorylé est dissocié, suivie d'une rapide dégradation dans les protéasomes de IkBa phosphorylé. Au même moment, une rapide translocation au niveau du novau de NF- κ B et sa liaison à des séquences consensus d'ADN spécifiques (Baeuerle and Henkel, 1994) sont observées. Le rôle de PKC dans la régulation de l'activation de NF-kB a été mis en évidence par l'étude démontant que PKCζ serait associée à l'IKK-α, et dont le DN PKCζ bloquait l'activation de NF-KB (Diaz-Meco et al., 1993; Diaz-Meco et al., 1994a; Folqueira et al., 1996). Les résultats de la Figure 10 démontrent que la phosphorylation et la dégradation de I κ B α , et par conséquent l'activation de NF- κ B, sont normales dans les macrophages surexprimant le DN PKC- α stimulés au LPS, suggérant que PKC- α n'est pas une isoenzyme de PKC impliquée dans l'activation de NF-kB. Considérant que NF-kB joue un rôle important dans l'activation transcriptionnelle de l'expression du gène de TNF- α (Sweet and Hume, 1996), les résultats (Figure 7) concernant la surexpression du DN PKC- α sur l'expression génique de TNF- α induite par le LPS sont donc comparables à cette étude, mais avec un effet mineur. Par contre l'identification de d'autres facteurs de transcription défectueux par l'induction au LPS dans les clones surexprimant le DN PKC- α contribuera certainement à mieux comprendre la régulation de l'expression du gène IL-1 α .

Les résultats de la Figure 11 démontrent que les phosphorylations des MAPK p38, JNK et MEK1/2 sont normales dans les clones surexprimant le DN PKC- α , suggérant ainsi que PKC-α n'est pas impliquée dans phosphorylation de ces trois MAP kinases. De plus, ces résultats démontrent une évidence supplémentaire concernant le fait que ce ne sont pas toutes les réponses induites au LPS qui sont inhibées dans les macrophages RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α . Alors, des études additionnelles sont requises afin d'élucider les voies de signalisation du LPS et les facteurs de transcription impliqués dans la régulation des fonctions dépendantes de PKC-a. Basé sur des observations d'études antérieures, il a été démontré que le LPS active la voie impliquant Raf-1/MAP kinase dans les macrophages et que Raf-1 participe à l'induction de l'expression des gènes IL-1 β et TNF- α (Hambleton *et al.*, 1995; Geppert *et al.*, 1994; Reimann *et al.*, 1994). Et que les études sur les mécanismes d'activation de Raf-1 dans les cellules COS et NIH 3T3 révèlent que le diacylglycérol régulerait les isoenzymes de PKC, incluant PKC-α, comme activateurs de Raf-1 dans un modèle in vivo (Kolch et al., 1993; Cai et al., 1997). C'est pour cette raison, qu'à plus long terme, il serait intéressant de vérifier si PKC- α serait l'une des isoenzymes de PKC requise pour l'activation de Raf-1 dans les macrophages stimulés au LPS.

Le rôle de PKC dans le contrôle de la réplication intracellulaire de différents types de microbes a déjà été suggéré par le pré-traitement des monocytes/macrophages avec des inhibiteurs de PKC, comme la Staurosporine ou le H-7, avant l'infection. Par ce type d'expérience, il a été démontré que PKC serait requise dans le contrôle de la réplication intracellulaire et pour le processus de destruction des microbes, comme par exemple contre Staphylococcus aureus, Leishmania donovani et Legionella pneumophila (Zheng et al., 1995; Murray, 1982; Descoteaux et al., 1992; Moore et al., 1993; Jacob et al., 1994). Par contre, par l'utilisation d'inhibiteurs de PKC, la contribution spécifique des différentes isoenzymes de PKC dans le contrôle de la réplication intracellulaire de différents microbes est peut connue et basée uniquement sur des évidences indirectes. Donc, par cette présente étude, par l'utilisation de cette approche expérimentale, utilisant des clones de macrophages RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α , des évidences claires et précises sur le rôle de PKC- α dans le contrôle de la réplication de deux pathogènes intracellulaires, comme L. donovani et L. pneumophila, ont pu être obtenues.

Des études antérieures ont permis de démontrer que le LPG, exprimé à la surface du parasite Leishmania de la forme promastigote, avait plusieurs rôles à jouer concernant la survie intracellulaire de ce parasite. Par exemple, il a été démontré que le LPG de L. donovani est un puissant inhibiteur de l'activité in vitro de PKC (Descoteaux et al., 1992). De plus, l'inhibition de l'activité de PKC dans les macrophages, par l'utilisation d'inhibiteurs de PKC, bloquent complètement la capacité du macrophage à détruire le parasite, L. donovani, et favorise sa réplication intracellulaire (Murray, 1982; Descoteaux et al., 1992; Moore et al., 1993). Donc, c'est pour ces raisons, qu'il était intéressant de vérifier ces observations et de déterminer si PKC- α avait un rôle à jouer dans le contrôle de la réplication intracellulaire de L. donovani. Les premiers résultats (Figure 13A), concernant cette deuxième partie de la présente étude, ont permis de démontrer aucune différence significative concernant la phagocytose de L. donovani (LV9-Luc) de la forme promastigote entre nos clones surexprimant le DN PKC- α et le contrôle de macrophages RAW 264.7, suggérant ainsi que PKC-α n'est pas une isoenzyme de PKC impliquée dans la phagocytose de ce parasite. Par contre, la survie de ce parasite est beaucoup plus favorisé pour les clones surexprimant le DN PKC- α comparativement au contrôle RAW 264.7, suggérant que PKC- α est impliquée dans le contrôle de la réplication intracellulaire de L. donovani. Des résultats similaires ont été observés concernant l'infection des trois lignées de macrophages avec la forme amastigote in vitro de L.

donovani (Figure 13B). Ces résultats, confirment que PKC- α est l'une des isoenzyme de PKC impliquée dans le contrôle de la réplication intracellulaire de *L. donovani*.

Par la suite, basé sur deux observations tirées d'études antérieures différentes démontrant d'une part que L. donovani n'induit pas à lui seul la production de NO dans les macrophages non-traités à l'IFN γ (Cerrera *et al.*, 1996) et d'autre part que le prétraitement à l'IFNy des macrophages, avant l'infection, induit une puissante activité anti-Leishmania (Murray et al., 1985), il était donc intéressant de vérifier ces phénomènes dans nos clones surexprimant le DN PKC- α . Les résultats de la Figure 14, confirment ces travaux. L. donovani, à lui seul, ne stimule pas la production de NO dans les trois lignées de macrophages infectés par ce parasite (Figure 14B, colonnes en blanc). Par conséquent, l'augmentation de la survie de L. donovani pour les clones A2 et C2 surexprimant le DN PKC-a (Figure 13A), n'est pas une conséquence affectant la production de NO. De plus, la surexpression du DN PKC-a dans la lignée de macrophages RAW 264.7 n'a pas affecté la capacité à tuer ce parasite, puisqu'aucune différence de survie n'est remarquée entre les trois lignées de macrophages lorsqu'elles sont pré-stimulées à l'IFNy (Figure 14A) et que les clones surexprimant le DN PKC-a pré-traitées à l'IFNy avant l'infection produisent de hauts niveaux de NO (Figure 14B, colonnes en noire), des résultats sensiblement comparables au contrôle de macrophages RAW 264.7. Les mécanismes reliés à l'augmentation de la survie de L. donovani chez le macrophage (en situations indépendantes de l'IFNy / NO) sont présentement inconnus et feront l'objet d'études subséquentes.

Une étude antérieure a permis de démontrer que l'infection des monocytes à L. *pneumophila* inhibe la production du superoxyde en interférant avec PKC, qui est requise pour la phosphorylation de NADH oxydase. De plus cette étude suggère que la régulation à la baisse des isoenzymes α et β de PKC seraient responsables de l'inhibition de la production du superoxyde et impliquées dans la survie de *L. pneumophila* (Jacob *et* al., 1994). Afin de vérifier l'exactitude de ces affirmations, la mesure des fonctions de phagocytose et de réplication intracellulaire de nos clones de macrophages RAW 264.7 surexprimant le DN PKC-α infectés par L. pneumophila ont été effectuées (Figure 15A). Aucune différence significative n'a été remarquée concernant la phagocytose de L. pneumophila pour chacun des types de macrophages infectés, suggérant ainsi que PKC- α n'est pas impliquée dans le processus de phagocytose de L. pneumophila. Par contre, ces résultats ont démontré que les clones surexprimant le DN PKC-a agissent de façon similaire aux macrophages péritonéaux de souris susceptibles A/J. Cette observation supporte clairement le fait que les clones surexprimant le DN PKC- α sont permissifs et susceptibles à l'infection de L. pneumophila, et suggérant ainsi que PKC- α est l'une des isoenzymes de PKC impliquée dans le contrôle de réplication intracellulaire de L. pneumophila. De plus, l'incapacité des clones surexprimant le DN PKC-a à contrôler la réplication intracellulaire de L. pneumophila n'est pas une conséquence à la non production de NO (voir section 9 des Résultats), puisque les trois lignées de macrophages, incluant les cellules contrôle RAW 264.7, les clones A2 et C2 surexprimant le DN PKC- α , produisent faiblement du NO.

Il est important de noter que l'effet de la surexpression du DN PKC- α est spécifique à la réplication intra-macrophages des deux pathogènes intracelluaires utilisés, soit *L. donovani* et *L. pneumophila*, puisqu'aucune différence significative n'a été remarquée au sujet de la phagocytose et de la réplication intracellulaire de *P. aeruginosa* pour les différents types de macrophages utilisés, incluant les clones surexprimant le DN PKC- α (Figure 15B). Ces derniers résultats suggèrent que la surexpression du DN PKC- α dans la lignée de macrophages RAW 264.7 n'a pas affectée le pouvoir de destruction et l'activité microbicide de ces macrophages infectés par *P. aeruginosa*.

Conclusion

Par ce projet de recherche, nous avons pu démontrer que la surexpression d'un mutant dominant-négatif (DN) de l'isoenzyme de PKC- α dans la lignée de macrophages RAW 264.7 est une approche expérimentale profitable et utile. Grâce à cette approche expérimentale nous avons pu obtenir plusieurs informations concernant l'implication de la PKC- α dans la régulation des fonctions du macrophage reliées aux maladies infectieuses.

Cette étude nous a permis de déterminer que l'activité de PKC- α est requise pour des fonctions spécifiques du macrophages induites par le LPS. Particulièrement pour la production de l'IL-1 α et de l'oxyde nitrique. Par contre, d'autres isoenzymes que PKC- α réguleraient l'expression génique de TNF- α . Également, cette étude nous a permis de démontrer que la surexpression du DN PKC- α dans la lignée de macrophages RAW 264.7 n'inhibe pas toutes les réponses induites par le LPS, puisque PKC- α est l'une des isoenzymes qui régule de façon négative la sécrétion de MMP-9. De plus, PKC- α n'est pas impliqué dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B et dans la phosphorylation des MAPK p38, JNK1/2 et MEK1/2. Cependant d'autres expériences supplémentaire seront nécessaire, afin d'élucider les voies de signalisation dépendantes de PKC- α induites par le LPS et d'autres facteurs de transcription impliqués dans la régulation des fonctions dépendantes de PKC- α .

Ce travail a également permis de démontrer que PKC- α a un rôle important à jouer concernant le contrôle de la réplication de deux pathogènes intracellulaires, soit *Leishmania donovani* et *Legionella pneumophila*. Et que la surexpression du DN PKC- α dans la lignée de macrophages RAW 264.7 n'a pas affectée la capacité de destruction et l'activité microbicide de ces macrophages, puisqu'ils sont capables de tués *Pseudomonas aeruginosa*.

Finalement, la surexpression du DN PKC- α dans la lignée de macrophages RAW 264.7 est un outil de travail profitable, puisqu'il a permis d'apporter plusieurs évidences importantes concernant le rôle de PKC- α dans l'inflammation et dans la défense de l'hôte contre l'infection.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Albert Descoteaux, qui m'a permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire. De plus, je le remercie pour sa grande disponibilité et pour ses nombreux conseils judicieux, qui m'ont permis de répondre à toutes mes interrogations. Enfin, je le remercie pour m'avoir donné la chance d'aller présenter mes résultats dans plusieurs congrès, me permettant ainsi d'avoir un premier vrai contact avec le monde de la recherche scientifique.

Je remercie également Pascale Duplay pour ses précieux conseils et ses critiques constructives, surtout lors des réunions de laboratoire.

Je remercie Francine Gervais, de l'Hôpital Générale de Montréal, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors de projets de collaboration, et sa technicienne, Vassiliki Carouas, pour sa grande amabilité et d'avoir fait les expériences d'infection bactérienne en ma compagnie. Je remercie Barbara Papadopoulou, du CHUL à Québec, pour nous avoir offert gracieusement le vecteur pGEM 72f/anealuc, afin de faciliter la quantification des niveaux d'infection à *Leishmania donovani*. Je remercie également, Yves St-Pierre et Pierre Tremblay pour les résultats sur la MMP-9, ainsi que Mireille Varin, technicienne du laboratoire, spécialement pour la mise au point et les résultats en ELISA.

En terminant, je voudrais dire un gros merci à ma famille et à tous mes amis du laboratoire et de l'Institut Armand-Frappier, qui ont su m'encourager et me supporter (dans tous les sens du mot) tout au long de ma maîtrise, surtout cette dernière année, qui a été une année très difficile, et rempli d'émotions.

Bibliographie

- Abeliovich, A., Chen, C., Goda, Y., Silva, A. J., Stevens, C. F., and Tonegawa, S. 1993a.
 Modified hipocampal long-term potentiation in PKCγ-mutant mice. *Cell.* 75: 1253-1262.
- Abeliovich, A., Paylor, R., Chen, C., Kim, J. J., Wehner, J. M., and Tonegawa, S. 1993b. PKCγ-mutant mice exhibit moderate defects in spatial and contextual learning. *Cell.* 75 : 1263-1272.
- Adams. D. O., and Hamilton. T. A. 1984. The cell biology of macrophage activation. Annu. Rev. Immunol. 2: 283-318.
- Adams, D.O., and Hamilton, T.A. 1987. Molecular transductional mechanisms by wich IFN gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol. Rev.* 97: 5-27.
- Alexander, J., and Russell, D. G. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* **31** : 175-254.
- Allen, L. H., and Aderem, A. 1995. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. J. Exp. Med. 182: 829-840.
- Allen, L. H., and Aderem, A. 1996. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. J. Exp. Med. 184 : 627-637.

- Alvarez, E., Northwood, I. C., Gonzalez, F. H., Latour, D. H., Seth, A., Abate, C., Curran, T., and Davis, R. J. 1991. Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation: characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor thr 699 kinase. J. Biol. Chem. 266: 15277.
- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. 1988a. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-κB trancription factor. *Cell.* 53 : 211-217.
- Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. 1988b. $I\kappa B$: a specific inhibitor of the NF- κB trancription factor. *Science*. 242: 540-546.
- Baeuerle, P. A., and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-179.
- Baier, B. G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G.,
 Altman, A., and Baier. G. 1996. Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol. Cell. Bio.* 16 : 1842-1850.
- Balboa, M. A., Firestain, B. L., Godson, C., Bell, K. S., and Insel, P. A. 1994. Protein kinase C_{α} mediates phospholipase D activation by nucleotides and phorbol ester in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **269** : 10511-10516.
- Bancroft, G. J., Schreiber, R. D., Bosma, G. C., Bosma, M. J., and Unanue, E. R. 1987.
 A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon gamma.
 J. Immunol. 139 : 1104-1107.

- Bancroft, G. J., Schreiber, R. D., and Unanue, E. R. 1992. Natural immunity, a T cellindependant pathway of macrophage activation in the SCID mouse. *Immunol. Rev.* 124 : 5-24.
- Bancroft, G. J., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., and Unanue, E. R. 1989. Tumor necrosis factor is involved in the T cell-independant pathway of macrophage activation in scid mice. J. Immunol. 143 : 127-130.
- Basham, T. Y., and Merigan, T. C. 1983. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. J. Immunol. 130 : 1492-1494.
- Basham, T. Y., Nickoloff, B. J., Merigan, T. C., and Morhenn, V. B. 1985. Recombinant gamma interferon differentially regulates class II antigen expression and biosynthesis on cultured normal human keratinocytes. J. interferon Res. 5: 23-32.
- Bazil, V., Baudys, M., Hilgert, I., Stefanova, I., Low, M. G., Zbrozek, J., and Horejsi, V.
 1989. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. *Mol. Immunol.* 26: 657-662.
- Beaty, C. D., Franklin, T. L., Uehara, Y., and Wilson, C. B. 1994. Lipopolysaccharideinduced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J. Immunol.* 24: 1278-1284.
- Beckers, M. C., Ernst, E., Diez, E., Morissette, C., Gervais, F., Hunter, K., Housman, D.,
 Yoshida, S., Skamene, E., and Gros. P. 1997. High-resolution linkage map of
 mouse chromosome 13 in the vicinity of the host resistance locus Lgn1.
 Genomics. 39: 254-263.

- Bellinger- Kawahara, C. G., and Horwitz, M. A. 1987. Complement component C3 fixes selectively to major outer membrane protein (momp) of *L. pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* 172 : 1201-1210.
- Belvin, M. P., and Anderson, K. V. 1996. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **12**: 293-416.
- Berridge, M. J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. **361** : 315-325.
- Beverley, S. M., and Turco, S. J. 1995. Identification of genes mediating lipophosphoglycan biosynthesis by functional complementation of *Leishmania donovani* mutants. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **89** (Suppl 1) : 11-17.
- Blobe, G. C., Stribling, S., Obeid, L. M., and Hannun. Y. A. 1996. Protein kinase C isoenzymes : regulation and function. *In Cancer Surveys.* 27 : 213-248.
- Buchmeier, N. A., and Schreiber, R. D. 1985. Requirement of endogenous interferongamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 7404-7408.
- Buchwalow, I. B., Brich, M., and Kaufmann. S. H. 1997. Signal transduction and phagosome biogenesis in human macrophages during phagocytosis of *Mycobacterium bovis* BCG. Acta Histochem. 99: 63-70.
- Burch, R. M. 1987. Protein kinase C mediates endotoxin and zymosan-induced prostaglandin synthesis. *Eur. J. Pharmacol.* 142: 431-435.

- Buscher, D., Hipskind, R. A., Krautwald, S., Reimann, T., and Baccarini, M. 1995. Rasdependent and independent pathways target the Mitogen-Activated Protein Kinase network in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 15: 466-475.
- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., Rapp, U., and Cooper, G. M. 1997. Role of diacyglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol. Cell. Bio.* 17:732-741.
- Carrera, L., Gazzinelli, R. T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R., and Sacks,
 D. L. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. J. Exp. Med. 183: 515-526.
- Chang, K. P., and Dwyer, D. M. 1976. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages *in vitro*. Science. 193: 678-680.
- Chen, C.-C., Wang, J.-K., and Lin, S.-B. 1998. Antisens oligonucleotides targeting protein kinase C- α , β I, or - δ but not - η inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages : involvement of a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *J. Immunol.* 161 : 6206-6214.
- Clemens, D. L., and Horwitz, M. A. 1995. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. J. Exp. Med. 181 : 257-270.
- Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. 1995. How MAP kinases are regulated. J. Biol. Chem. 270: 14843-14846.

- Corradin, S. B., Manuel, J., Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. 1992. Enhancement of murine macrophage binding of and response to bacterial lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein. J. Leukocyte Biol. 52 : 363-368.
- Coxon, P. Y., Summersgill, J. T., Ramirez, J. A., and Miller, R. D. 1998. Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes. *Infect. Immun.* 66 : 2905-2913.
- Crowley, M. T., Costello, P. S., Fitzer, A. C., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V., and DeFranco. A. 1997. A critical role for syk in signal transduction and phagocytosis mediated by fc gamma receptors on macrophages. J. Exp. Med. 186 : 1027-1039.
- Dean, N. M., McKay, R., Condon, T. P., and Bennett, C. F. 1994. Inhibition of protein kinase C-α expression in human A549 cells by antisens oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. J. Biol. Chem. 269 : 16416-16424.
- DeFranco, A. L., Crowley, M. T., Finn, A., Hambleton, J., and Weinstein, S. L. 1998. The role of tyrosine kinases and MAP kinases in LPS-induced signaling. *Progress in Clinical and Biological Research.* 397 : 119-136.
- Dekker, L. V., and Parker, P. J. 1994. Protein kinase C-α question of specificity. Trends Biochem. Sci. 19: 73-77.
- Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A., Vincent, L. A., Roberts, T M., and Sturgill, T. W. 1992. Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase-kinase by v-Raf in NIH3T3 cells and *in vitro*. Science. 257 : 1404.

- Descoteaux, A., Garraway, L. A., Ryan, K. A., Garrity, L. K., Turco, S. L., and Beverley,
 S. M. 1994. Identification of genes by functional complementation in protozan parasite *Leishmania*. *Methods in Molecular Genetics*. 3: 22-48. Academic Press.
- Descoteaux, A., and Matlashewski, G. 1990. Regulation of tumour necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumour necrosis factor. J. Immunol. 145 : 846-853.
- Descoteaux, A., Matlashewski, G., and Turco, S. J. 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Immunol.* **149** : 3008-3015.
- Descoteaux, A., and Turco, S. J. 1993. The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol. Today.* **9**: 468-471.
- Desjardins, M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes : the kiss and run hypothesis. *Trends Cell Biol.* 5 : 183-186.
- Desjardins, M., and Descoteaux, A. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. J. Exp. Med. 185: 2061-2068.
- Diaz-Guerra, M. J. M., Bodelon, O. G., Velasco, M., Whelan, R., Parker, P. J., and Bosca. L. 1996. Up-regulation of protein kinase C-epsilon promotes the expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 cells. J. Biol. Chem. 271 : 32028-32033.

- Diaz-Meco, M. T., Berra, E., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M. T., Alcami, J., Paya, C. V., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.-L., and Moscat J. 1993. A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 4770-4775.
- Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M. M., Berre, E., Hay, R. T., Sturgill, T. W., and Moscat. J. 1994a. Zeta PKC induces phosphorylation and inactivation of I kappa B-alpha in vitro. *EMBO J.* 13: 2842-2848.
- Diaz-Meco, M. T., Lozabo, J., and Municio, M. M. 1994b. Evidence for the *in vitro* and *in vivo* interaction of Ras with protein kinase C. J. Bio. Chem. 269 : 31706-31710.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. 1997. A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. *Nature*. **388** : 548-554.
- DiDonato, J. A., Mercurio, F., and Karin, M. 1995. Phosphorylation of IκBα precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-κB. *Mol. Cell. Biol.* **15** : 1302-1311.
- Dong, Z., O'Brian, C. A., and Fidler, I. J. 1993. Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein-tyrosine kinase activity. J. Leukoc. Biol. 53: 53-60.
- English, B. K., Ihle, J. N., Myracle, A., and Yi, T. 1993. Hck tyrosine kinase activity modulates tumor necrosis factor production by murine macrophages. J. Exp. Med. 178: 1017-1022.

- Fenton, M. J., and Golenbock, D. T. 1998. LPS-binding proteins and receptors. J. Leukocyte Biol. 64 :25-32.
- Finlay, B. B., and Cossart, P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. Science. 276 : 718-725.
- Finlay, B. B., and Falkow, S.. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 : 136-169.
- Folgueira, L., McElhinny, J. A., Bren, G. D., MacMorran, W. S., Diaz, M. M., Moscat, J., and Paya. C. V., 1996. Protein kinase C-zeta mediates NF-kappa B activation in human immunodeficiency virus-infected monocytes. J. Virol. 70 : 223-231.
- Fransen, L., Muller, R., Marmenout, A., Tavernier, J., Van der Herden, J., Kawashima,
 E., Chollet, A., Tizard, R., Van Heuverswyn, H., Van Vliet, A., Ruysschaert, M.
 R., and Fiers, W. 1985. Molecular cloning of mouse tumour necrosis factor
 cDNA and its eukaryotic expression. *Nucleic Acids Res.* 13: 4417-4429.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Pardin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDadej, E., Shepard, C. C., Brachman, P. S., and the Field Investigation Teem. 1977. Legionnaires' disease : description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 297 : 1189-1197.
- Frey, E. A., Miller, D. S., Jahr, T. G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., Finley, B. B., and Wright, S. D. 1992. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 176 : 1665-1671.
- Fujihara, M., Connolly, N., Ito, N., and Suzuki, T. 1994. Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. J. Immunol. 152 1898-1906.

- Gamard, C. J., Blobe, G. C., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. 1994. Specific role for protein kinase C β in cell differentiation. *Cell Growth and Differentiation*. 5: 405-409.
- Garcia-del Portillo, F., and Finlay, B. B. 1995. Targeting of Salmonella typhimurium to vesicle containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. J. Cell Biol. 129: 81-97.
- Geppert, T. D., Whitehurst, C. E., Thompson, P., and Beutler, B. 1994. Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/Raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol Med.* 1 : 93-103.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. 1998. NF-κB and Rel proteins : evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16** : 225-260.
- Golenbock, D., Liu, Y., Millham, F., Freeman, M., and Zoeller R. 1993. Surface expression of human CD14 in Chinese hamster ovary fibroblasts imparts macrophage-like responsiveness to bacterial endotoxin. J. Biol. Chem. 268: 22055-22059.
- Goodnight, J., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Mushinski, J. F., and Mischak, H. 1992. The cDNA sequence, expression pattern and protein characteristics of mouse protein kinase C-zeta. *Gene.* 122 : 305-311.
- Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S., Nacy, C. A. 1990a. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. J. Immunol. 145 : 4290-4297.

- Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs, J. B. Jr, and Nacy, C. A. 1990b. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an Larginine-dependent killing mechanism. J. Immunol. 144 : 278-283.
- Greenberg, S. 1995. Signal transduction of phagocytosis. Trends Cell Biol. 5: 93-99.
- Greenberg, S., Burridge, K., and Silverstein, S. C. 1990. Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. J. Exp. Med. 172: 529-534.
- Greenberg, S., Chang, P., and Silverstein, S. C. 1994. Tyrosine phosphorylation of the gamma subunit of Fc gamma receptors, p72syk, and paxillin during Fc receptormediated phagocytosis in macrophages. J. Biol Chem. 269 : 3897-3902.
- Greenberg, S., and Silverstein, S. C. 1993. Phagocytosis. *In* Fundamental Immunology.W. E. Paul, W. E. Paul Editor. Raven Press Ltd., New York. pp. 941-964.
- Gunning, P., Weinberger, R., Jeffrey, P., and Hardeman, E. 1998. Isoform sorting and the creation of intracellular compartments. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 14: 339-372.
- Gupta, D., Jin, Y. P., and Dziarski, R. 1995. Peptidoglycan induces transcription and secretion of TNF- α and activation of lyn, extracellular signal-regulated kinase, and rsk signal transduction proteins in mouse macrophages. *J. Immunol.* 155 : 2620-2630.
- Hackstadt, T., and Williams, J. C. 1981. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella Burnetii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 3240-3244.

- Hailman, E., Lichenstein, H. S., Wurfel, M. M., Miller, D. S., Johnson, D. A., Kelley, M., Busse, L. A., Zukowski, M. M., and Wright, S. D. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. J. Exp. Med. 179 : 269-277.
- Hambleton, J., M. McMahon, and A. L. DeFranco. 1995. Activation of Raf-1 and Mitogen-Activated Protein Kinase in murin macrophages partially mimics lipopolysaccharide-induced signaling events. J. Exp. Med. 182 : 147-154.
- Hambleton, J., Weinstein, S. L., Lem, L., and DeFranco, A. L. 1996. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 2774-2778.
- Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M., and Raetz, C. R. 1991.
 Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*.
 352 : 342-344.
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch R. J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. **265** : 808-811.
- Handa, K., Suzuki, R., Matsui, H., Shimizu, Y., and Kumagai, K. 1983. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL-2-induced interferon gamma production. J. Immunol. 130: 988-992.
- Handman, E., Schnur, L. F., Spithill, T. W., and Mitchell, G. F. 1986. Passive transfer of *Leishmania* lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. J. *Immunol.* 137 : 3608-3613.
- Hansen, S. K., Baeuerle, P. A., and Blasi, F. 1994. Purification, reconstitution, and IkB association of the c-Rel-p65 (RelA) complex, a strong activator of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 14 :2593-2603.
- Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C. L., and Goyert, S. M. 1996. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity.* 4: 407-414.
- Haziot, A., Ferrero, E., Lin, X. Y., Stewart, C. L., and Goyert, S. M. 1995. CD14deficient mice are exquisitively insensitive to the effects of LPS. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392 : 349-351.
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R., and Goyert, S. M. 1988. The monocyte differitation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. J. Immunol. 141 : 547-552.
- High, N., Mounier, J., Prevost, M. C., and Sansonetti, P. J. 1992. IpaB of Shigella flexneri causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuoles. EMBO J. 11 : 1991-1999.
- Hishikawa, T., Cheung, J. Y., Yelamarty, R. V., and Knutson D. W. 1991. Calcium transients during Fc receptor-mediated and nonspecific phagocytosis by murine peritoneal macrophages. J. Cell. Biol. 115: 59-66.
- Horwitz, M. A. 1983. The Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J. Exp. Med. 158: 2108-2126.

- Horwitz, M. A., and Maxfield, F. R. 1994. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* **99** : 1936-1943.
- Horwitz, M. A., and Silverstein, S. C. 1980. Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) multiplies intracellularly in human monocytes. J. Clin. Invest. 66: 441-450.
- Howe, L. R., Leevers, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., and Marshall, C. J. 1992. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase Raf. *Cell.* 71 :335-342.
- Hug, H., and Sarre, T. F. 1993. Protein kinase C isoenzymes : divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 291 : 329-343.
- Ingalls, R. R., and Golenbock, D. T. 1995. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 181 : 1473-1479.
- Ioannides, C. G., Freedman, R. S., Liskamp, R. M., Ward, N. E., and O'Brian, C. A. 1990. Inhibition of IL-2 receptor induction and IL-2 production in Jurkat cells by a novel peptide inhibitor of PKC. *Cell. Immunol.* 131 : 242-248.
- Jacob, T., Escallier, J. C., Sanguedolce, M. V., Chicheportiche, C., Bongrand, P., Capo, C., and Mege, J. L. 1994. Legionella pneumophila inhibits superoxide generation in humans monocytes via the down-modulation of alpha and beta protein kinase C isotypes. J. Leukoc. Biol. 55: 310-312.
- Jain, J., Valge-Archer, V. E., Sinskey, A. J., and Rao, A. 1992. The AP-1 site at -150 bp, but not the NFκB site, is likely to represent the major target of PKC in the IL-2 promoter. J. Exp. Med. 175: 853-862.

- Jaken, S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. Curr. Opin. Cell. Biol. 8: 168-173.
- Karimi, K., and Lennartz, M. R. 1995. Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J. Immunol.* **155** : 5786-5794.
- Karin, M., and Hunter, T. 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation : signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology.* 5 : 747-757.
- Kirkland, T. N., Finley, F., Letureq, D., Moriarty, A., Lee, J.-D., Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. 1993. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. J. Biol. Chem. 268 : 24818-24823.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. 1980. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. J. Bio. Chem. 255 : 2273-2276.
- Knopf, J. L., Lee, M. H., Sultzman, L, A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M., and Bell, R. M. 1986. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. Cell. 46: 491-502.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., and Rapp U. R. 1993. Protein kinase C alpha activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature*. 364 : 249-252.
- Kopp, E. B., and Ghosh, S. 1995. NF-κB and Rel proteins in innate immunity. Adv. Immunol. 58: 1-27.

- Kovacs, E. J., Radzioch, D., Young, H. A., and Varesio L. 1988. Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. J. Immunol. 141 : 3101-3105.
- Kvanta, A., Kontny, E., Jondal, M., Okret, S., and Fredholm, B. B. 1992. Mitogen stimulation of T cells increases c-Fos and c-Jun protein levels, AP-1 binding and AP-1 trancriptional activity. *Cell. Signalling.* 4 : 275 282.
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. -F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., and Avruch, J. 1992. Raf-1 activates MAP-kinase-kinase. *Nature*. 340: 417.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 369 : 156-160.
- Lee, J.-D., Kato, K., Tobias, P. S., Kirkland, T. N., and Ulevitch, R. J. 1992. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. J. Exp. Med. 175: 1697-1705.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., and Yong P. R. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 372 : 739-746.
- Lei, M. G., and Morrison, D. C. 1988. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. I. Detection of lipopolysaccharide-binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulation. J. Immunol. 141 : 996-1005.

- Lei, M. G., Stimpson, S. A., and Morrison, D. C. 1991. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding receptors on murine splenocytes. III. Binding specificity and characterization. J. Immunol. 147 : 1925-1932.
- Leitges, M., Schmedt, C., Guinamard, R., Davoust, J., Schaal, S., Stabel, S., and Tarakhovsky, A. 1996. Immunodeficiency in protein kinase cβ-deficient mice. *Science*. **273** : 788-791.
- Liu, M. K., V. P. Herrera, R. W. Brownsey, and N. E. Reiner. 1994. CD14-dependent activation or protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. J. Immunol. 153 : 2642-2652.
- Lomedico, P. T., Gubler, U., Hellmann, C. P., Dukovich, M., Giri, J. G., Pan, Y. C., Collier, K., Semionow, R., Chua, A. O., and Mizel, S. B. 1984. Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in Escherichia coli. *Nature.* 312 : 458-462.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage functions. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.
- Manthey, C. L., and Vogel, S. N. 1994. Interactions of lipopolysaccharide with macrophages. *Immunol. Ser.* **60** : 63-81.
- Martin, T. R., Mathison, J. C., Tobias, P. S., Maunder, R. J., and Ulevitch, R. J. 1992. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide : implications for cytokine production in normal and injured lungs. J. Clin. Invest. 90 : 2209-2219.

- Martin, T. R., Tobias, P. S., Mathison, J. C., and Ulevitch, R. J. 1994. Interactions between endotoxin and endotoxin binding protein. *In* Endotoxin and the Lungs, ed. K. Brigham, 77: 45-67. New York : Marcel Dekker.
- McConville, M. J., and Blackwell, J. M. 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. : Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J. Biol. Chem.* **266** : 15170-15179.
- McNeely, T. B., and Turco, S. J. 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. J. *Immunol.* 144 : 2475-2750.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A. Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388. : 394-397.
- Meng, F., and Lowell C. A. 1997. Lipopolysaccharide(LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. J. Exp. Med. 185: 1661-1670.
- Miao, L., Stafford, A., Nir, S., Turco, S. J., Flanagan, T. D., and Epand R. M. 1995. Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of Leishmania donovani. *Biochemistry.* 34: 4676-4683.
- Mischak, H., Kolch, W., Goodnight, J., Davidson, W. F., Rapp, U., Rose, J. S., and Mushinski, J. F. 1991. Expression of protein kinase C genes in hemopoietic cells is cell-type and B cell-differenciation stage specific. J. Immunol. 147: 3981-3987.

- Mizuno, K., Kubo, K., Saido, T. C., Akita, Y., Osada, S., Kuroki, T., Ohno, S., and Susuki, K. 1991. Structure and properties of a ubiquitously expressed protein kinase C, nPKC delta. *Eur. J. Biochem.* 202 : 931-940.
- Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., and Wolfman, A. 1993. Complexes of Ras. GTP with Raf-1 and Mitogen-Activated Protein Kinase-kinase. Science.
 260: 1658-1661.
- Moody, S. F., Handman, E., McConville, M. J., and Bacic, A. 1993. The structure of Leishmania major amastigote lipophosphoglycan. J. Biol. Chem. 268: 18457-18466.
- Moore, K. J., Labrecque, S., and Matlashewski, G. 1993. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *J. Immunol.* **150** : 4457-4465.
- Morrison, D. C., and Ryan, J. L. 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* **38**: 417.
- Muller, W. A., Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. 1980. The membrane proteins of the vacuolar system II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane. J. Cell Biol. 86 : 304-314.
- Murray, H. W. 1982. Pretreatment with phorbol myristate acetate inhibits macrophage activity against intracellular protozoa. J. *Reticuloendothel. Soc.* **31** : 479-487.
- Murray, H. W., Spitany, G. L., and Nathan, C. F. 1985. Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon-γ. J. Immunol. 143 : 1619-1622.

- Nagase, H., and Fields, G. B. 1996. Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides. *Biopolymers*. **40** : 399-416.
- Nasen, A., Christensen, J. P., Ropke, C., Marker, O., Scheynius, A., and Thomsen, A. R. 1998. Role of interferon-gamma in the pathogenesis of LCMV-induced meningitis : unimpaired leucocyte recruitment, but deficient macrophage activation in interferon-gamma knock-out mice. J. Neuroimmunol. 86 : 202-212.
- Nathan, C. F. 1987. Secretory produts of macrophages. J. Clin. Invest. 79: 319-326.
- Nathan, C. F, Murray, H. W., Wiebe, M. E., and Rubin, B. Y. 1983. Identification of interferon-γ as the lymphokine which activates human macrophage oxidation metabolism and antimicrobial activity. J. Exp. Med. 158 : 670.
- Nelson, B. J., Ralph, P., Green, S. J., and Nacy, C. A. 1991. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1. J. Immunol. 146 : 1849-1857.
- Ninomiya, N., K. Hazeki, Y. Fukui, T. Seya, T. Okada, O. Hazeki, and M. Ui. 1994. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. J. Biol. Chem. 269 : 22732-22737.
- Nishizuka, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*. **334** : 661-665.
- Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. **258** : 607-614.
- Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**: 484-496.

- Novotney, M., Chang, Z. L., Uchiyama, H., and Suzuki T. 1991. Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines. *Biochemistry*. **30** : 5597-5604.
- Ofek, I., Goldhar, J., Keisari, Y., and Sharon, N. 1995. Nonopsonic phagocytosis of micoorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49** : 239-276.
- Parker, P. J., L. Coussens, N. Totty, L. Rhee, S. Young, E. Chen, S. Stabel, M. D. Waterfield, and A. Ullrich. 1986. The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science*. 233 : 853-859.
- Payne, N. R., and Horwitz, M. A. 1987. Phagocytosis of Legionella pneumophila is mediated by human monocyte complement receptors. J. Exp. Med. 166 : 1377-1389.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Desjardins, M., and Gorvel, J. P. 1997. When intracellular pathogen invade the frontiers of cell biology and immunology. *Histol. Histopathol.* 12: 1027-1038.
- Portnoy, D. A., Chakraborty, T., Goebel, W., and Cossart, P. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60 : 1263-1267.
- Puddu, P., L. Fantuzzi, P. Borghi, B. Varano, G. Rainaldi, E. Guillemard, W. Malorni, P. Nicaise, S. F. Wolf, F. Belardelli, and S. Gessani. 1997. IL-12 induces IFN-γ expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. J. Immunol. 159: 3490-3497.

- Pugin, J., Schurer, M. C., Letureq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. 1993. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **90** : 2744-2748.
- Raetz, C. R. H. 1990. Biochemistry of endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 59: 129-170.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis,
 R. J. 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38
 Mitogen-Activated Protein Kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and thréonine. *J. Biol. Chem.* 270 : 7420-7426.
- Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S., and Lee, M. G. 1996. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques*. 20 : 102-104, 106, 108-110.
- Régnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., and Rothe, M. 1997.Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell.* 90 : 373-383.
- Reimann, T., Buscher, D., Hipskind, R. A., Krautwald, S., Lohann-Matthes, M. -L., and Baccarini, M. 1994. Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 beta and the TNF-alpha genes. J. Immunol. 153 : 5740-5749.
- Reiner, N. E. 1994. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol. Today.* **15**: 374.
- Rietschel, E. T., and Brade, H. 1992. Bacterial endotoxins. Scientific American. 267: 26-31.

- Rosson, D., O'Brien, T. G., Kampherstein, J. A., Szallasi, Z., Bogi, K., Blumberg, P. M., and Mullin, J. M. 1997. Protein kinase C-alpha activity modulates transepithelial permeability and cell junctions in the LLC-PK1 ephithelial cell line. *J. Biol. Chem.* 272 : 14950-14953.
- Russell, D. G., Xu, S., and Chakraborty, P. 1992. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. J. Cell Sci. 103 : 1193-1120.
- Sacks, D. L., Saraiva, E. M., Rowton, E., Turco, S. J., and Pimenta, P. F. 1994. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitol.* 108 : Suppl., S55-S62.
- Schreiber, R. D. 1986. Validation of a role for endogenously produced IFNγ in resolution of *Listeria monocytogenes* infection in mice. *In* Host Defenses and Immunomodulation to Intracellular Pathogens, ed. T. K. Eisenstein, N. Hana, W. E. Bullock. Philadelphia : Plenum.
- Schreiber, R. D., and Celada. A. 1985. Molecular characterization of interferon gamma as a macrophage activating factor. *Lymphokines*. 11:87-118.
- Serger, R., and Krebs, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. FASEB J. 9: 726-735.
- Seth, A., Alvarez, E., Gupta, S., and Davis, R. J. 1991. A phosphorylation site located in the NH2-terminal domain of c-myc increases transactivation of gene expression. J. Biol. Chem. 266 : 23521.

- Shapira, L., Sylvia, V. L., Halabi, A., Soskolne, A. W., Van, D. T., Dean, D. D., Boyan, D., and Schwartz, Z. 1997. Bacterial lipopolysaccharide induces early and late activation of protein kinase C in inflammatory macrophages by selective activation of PKC-epsilon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 : 629-634.
- Shapira, L., Takashiba, S., Champagne, C., Amar, S., and Van, D. T. 1994. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. J. Immunol. 153: 1818-1824.
- Silverstein, S. C., Greenberg, S., Di Virgilio, F., and Steinberg, T. H. 1989. Phagocytosis. In Fundamental Immunology. W. E. Paul, W. E. Paul Editor. Raven Press Ltd., New York. pp. 703-720.
- Simmons, D. L., Tan, S., Tenen, D. G., Nicholson-Weller, A., and Seed, B. 1989.
 Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood*.
 73: 284-289.
- Stacey, K. J., Ross, I .L., and Hume, D. A. 1993. Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages. *Immunol. Cell. Biol.* 71: 75-85.
- Stefanova, I., Corcoran, M. L., Horak, E. M., Wahl, L. M., Bolen, J. B., and Horak, I. D. 1993. Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. J. Biol. Chem. 268 : 20725-20728.
- Stern, A. S., Podlaski, F. J., Hulmes, J. D., Pan, Y. E., Quinn. P. M., Wolitzky, A. G., Familletti, P. C., Stremlo, D. L., Truitt, T., Chizzonite, R., and Gately, M. K. 1990. Purification to homogeneity and partial characterization of cytokines lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6808-6812.

- Surette, M. E., Palmantier, R., Gosselin, J., and Borgeat, P. 1993. Lipopolysaccharides prime whole human blood and isolated neutrophils for the increased synthesis of 5-lipoxygenase products by enhancing arachidonic acid availability : involvement of the CD14 antigen. J. Exp. Med. 178 : 1347-1355.
- Swantek, J. L., Cobb, M. H., and Geppert, T. D. 1997. Jun N-terminal kinase/stressactivated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell. Biol.* 17 : 6274-6282.
- Sweet, M. J., and Hume, D. A. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. J. Leukoc. Biol. 60 : 8-26.
- Taniguchi, H., Sakano, T., Hamasaki, T., Kashiwa, H., and Ueda, K. 1989. Effect of protein kinase C inhibitor (H-7) and calmodulin antagonist (W-7) on pertussis toxin-induced IL-1 production by human adherent monocytes. Comparaison with lipopolysaccharide as a stimulator of IL-1 production. *Immunology*. 67: 210-215.
- Tobias, P. S., Soldau, K., Ulevitch, R. J. 1989. Identification of a lipid A binding site in the acrute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. J. Biol. Chem. 264 : 10867-10871.
- Towbin, H., Staechelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 4350.

- Tremblay, P., Houde, M., Arbour, N., Rochefort, D., Masure, S., Mandeville, R.,
 Opdenakker, G., and Oth, D. 1995. Differential effects of PKC inhibitors on
 gelatinase B and interleukin 6 production in the mouse macrophage. *Cytokine*.
 7:130-136.
- Trinchieri, G., and Perussia. B. 1985. Immune interferon : a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol. Today.* **6** : 131-136.
- Turco, S. J., and Sacks, D. L. 1991. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in Leishmania major amastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 45: 91-100.
- Uberall, F., Giselbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H. H., and Baier G. 1997. Conventional PKC-alpha, novel PKCepsilon and PKC-theta, but not atypical PKC lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. J. Biol. Chem. 272 : 4072-4078.
- Ulevitch, R. J. 1993. Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv. Immunol.* 53 : 267-289.
- Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. 1994. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signalling. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 125-130.
- Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 437-457.
- Unanue, E. R., and Allen, P. M. 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*. **236** : 551-557.

- Valge, V. E., Wong, J. G. P., Datlof, B. M., Sinskey, A. J., and Rao, A. 1988. PKC is required for responses to TCR ligands but not to IL-2 in T cells. *Cell.* 55 : 101-109.
- Van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A., and Wigler, M. 1993. Complex formation between Ras and Raf and protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 6213.
- Van Ranst, M., Norga, K., Masure, S., Proost, P., Vandekerckhove, F., Auwerx, J., Van Damme, J., and Opdenakker, G. 1991. The cytokine-protease connection : identification of a 96-KD THP-1 gelatinase and regulation by interleukine-1 and cytokine inducers. *Cytokine*. 3 : 231-239.
- Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. 1995. Rel/NF-κB/IκB family : intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9 : 2723-2735.
- Vilcek, J., Gray, P. W., Rinderknecht, E., and Sevastopoulos, C. G. 1985. Interferon gamma : a lympokine for all seasons. *Lymphokines*. 11 : 1-32.
- Viriyakosol, S., and Kirkland, T. N. 1995. A region of human CD14 required for lipopolysaccharide binding. J. Biol. Chem. 270: 361-368.
- Wang, Q. J., Acs, P., Goodnight, J., Giese, T., Blumberg, P. M., Mischak, H., and Mushinski, J. F. 1997. The catalytic domain of protein kinase C-δ in reciprocal δ and ε chimeras mediates phorbol ester-induced macrophage differenciation of mouse promyelocytes. J. Biol. Chem. 272 : 76-82.

- Weinstein, S. L., Gold, M. R., and DeFranco, A. L. 1991. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 4148-4152.
- Weinstein, S. L., Sanghera, J. S., Lemke, K., DeFranco, A. L., and Pelek, S. L. 1992. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. J. Biol. Chem. 267 : 14955-14962.
- Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R. M., Kelleher, K., Herrmann, S. H., Trinchieri, G., and Perussia, B., 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. J. Immunol. 146 : 3074-80.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Hermanowski-Vosatka A., Rockwell, P., and Detmers P. A. 1991. Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin : dependence on lipopolysaccharide binding-protein and CD14. J. Exp. Med. 173 : 1281-1286.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 249 : 1431-1433.
- Wright, S. D., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Ramos, R. A. 1989. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. J. Exp. Med. 170 : 1231-1241.
- Xie, Q. 1997. A novel lipopolysaccharide-response element contributes to induction of nitric oxide synthase. J. Biol. Chem. 272 : 14867-14872.

- Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T., and Nathan, C. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256 : 225-228.
- Xie, Q., and Nathan, C. 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. J. Leukoc. Biol. 56: 576-582.
- Yamamoto, Y., Klein, T. W., Newton, C. A., Widen, R., and Friedman, H. 1988. Growth of Legionella pneumophila in thioglucolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. Infect. Immun. 56 : 370-375.
- Yang, R.-B., Mark, M. R., Gray, A., Huang, A., Xie, M. H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W. I., Gurney, A. L., and Godowsi, P. J. 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature*. 395 : 284-288.
- Yoshida, S., and Mizuguchi, Y. 1986. Multiplication of Legionella pneumophila
 Philadelphia-1 in cultured peritoneal macrophages and its correlation to susceptibility of animals. Can. J. Microbiol. 32 : 438-442.
- Zheleznyak, A., and Brown, E. J. 1992. Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. J. Biol. Chem. 267 : 12042-12048.
- Zheng, L., Zomerdijk, T. P., Aarnoudse, C., Van Furth, R., and Nibbering, P. H. 1995. Role of protein kinase C isozyme in Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *J. Immunol.* 155 : 776-784.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L., and Ulevitch, R. J. 1993. CD14 : cell surface receptor and differenciation marker. *Immunol. Today.* 14 : 121-125.

Annexe I

Vecteurs d'expression





- vecteur eucaryotique
- gène de sélection : néomycine
- vecteur biscistronique :
 - le gène de résistance et
 - le gène d'intérêt sont sous
 - le contrôle d'un seul promoteur

(adapté de Rees et al., 1996)

Annexe II