

Université de Montréal

Étude du rôle du lipophosphoglycan dans la modification des propriétés de fusion des phagosomes contenant le parasite intracellulaire *Leishmania donovani*

Par
Jean-François Dermine

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en pathologie et biologie cellulaires

Août 1999

© Jean-François Dermine, 1999



2011-2012

Université de Montréal

W
4
U58
1999
V.124

Étude du rôle du lipoprotéinogène dans la modification des propriétés de fusion des phospholipides cationiques intracellulaires (examen doctoral)

Par
Jean-François Darnaud

Département de pathologie et biologie cellulaires
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Maître en Sciences (M.Sc.) en pathologie et biologie cellulaires

1999

Jean-François Darnaud

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Étude du rôle du lipophosphoglycan dans la modification des propriétés de fusion des phagosomes contenant le parasite intracellulaire *Leishmania donovani*

présenté par:

Jean-François Dermine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Guy Doucet

président-rapporteur

Docteur Michel Desjardins

directeur de recherche

Docteur Jacques Paiement

membre du Jury

Mémoire accepté le:.....99-11-11.....

SOMMAIRE

Les protozoaires du genre *Leishmania* sont responsables de maladies appelées leishmanioses qui affectent des millions de personnes à travers le monde. La molécule du lipophosphoglycan (LPG) des promastigotes de *Leishmania*, forme flagellée du parasite présente chez les mouches phlébotomes, joue un rôle essentiel dans la survie du parasite chez les mouches et au début de l'infection chez les mammifères. Une étude a montré que le LPG est probablement impliqué dans l'altération des propriétés fusogéniques des phagosomes de macrophages contenant des *Leishmania* au début de l'infection. Cependant, les mécanismes d'action de cette molécule sont encore méconnus. Dans la présente étude, nous avons utilisé deux espèces, *L. major* et *L. donovani* ainsi que plusieurs mutants de *L. donovani* qui synthétisent des LPG de structure différente afin de comprendre comment cette molécule influence la fusion phagosome-endosome. Pour évaluer le taux de fusion des phagosomes contenant les différents *Leishmania* avec les endosomes, nous avons utilisé un essai de fusion intracellulaire en microscopie électronique qui consiste à mesurer le transfert de particules d'or chargées dans les endosomes vers les phagosomes. La présence de particules d'or dans les phagosomes indique qu'il y a eu fusion avec un ou plusieurs endosomes. Les résultats montrent que les unités disaccharidiques phosphorylées répétitives du LPG (PO_4 -6Gal β 1-4Man) sont responsables de l'inhibition de la fusion des phagosomes. En effet, les promastigotes de *L. donovani* de type sauvage qui expriment un LPG complet sont présents à l'intérieur de phagosomes

qui fusionnent peu avec les compartiments endocytaires. Par contre, les mutants LPG2- et LPG1-, qui synthétisent un LPG incomplet sans unité disaccharidique à cause de mutations chez des protéines impliquées dans la biosynthèse du LPG, se retrouvent à l'intérieur de phagosomes très fusogéniques. Nous avons aussi déterminé que d'autres macromolécules possédant des sous-unités disaccharidiques répétitives n'ont aucun effet sur les propriétés fusogéniques des phagosomes. En effet, les mutants LPG1- de *L. donovani*, qui ajoutent les unités répétitives à toutes les molécules qui en contiennent normalement sauf au LPG, puisque la mutation du gène *lpg1* n'affecte que la synthèse du noyau de cette dernière molécule, résident dans des phagosomes très fusogéniques. Les résultats montrent aussi que l'inhibition de la fusion phagosome-endosome induite par le LPG est environ deux fois plus efficace envers les endosomes tardifs et les lysosomes enrichis d'enzymes dégradatives. Ces résultats suggèrent que les promastigotes arrivent à survivre dans les phagosomes en empêchant l'entrée des hydrolases aptes à les dégrader. Chez *L. major*, les chaînes latérales oligosaccharidiques ne jouent pas de rôle important dans l'inhibition de la fusion, puisque les mutants Spock qui ne synthétisent pas ces chaînes résident dans des phagosomes qui ont le même taux de fusion que les phagosomes contenant le type sauvage. Pour terminer, nous avons évalué si la viabilité des parasites est essentielle à l'inhibition de la fusion phagosome-endosome. Les résultats obtenus montrent que les parasites tués à la chaleur avant leur internalisation dans les cellules sont incapables d'inhiber la fusion, malgré la présence de LPG à leur surface. Par contre, le fait de tuer les parasites par l'ajout d'un colorant vital dans le milieu de

culture, après leur internalisation dans les phagosomes, ne contribue pas à rétablir les propriétés fusogéniques de ces compartiments. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que le LPG des promastigotes permet de moduler activement les propriétés fusogéniques des phagosomes très tôt après l'internalisation des parasites dans les macrophages. L'inhibition préférentielle de la fusion envers les compartiments endocytaires tardifs permet aux parasites d'éviter la dégradation dans le milieu hostile des phagolysosomes.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	I
IDENTIFICATION DU JURY.....	II
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	X
INTRODUCTION.....	1
La phagocytose.....	2
Phagocytes professionnels.....	2
Phagocytes non professionnels.....	3
Mécanismes de la phagocytose.....	4
Biogenèse des phagolysosomes.....	6
Stratégie de survie des pathogènes à l'intérieur des macrophages.....	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10
<i>Shigella</i>	11
Les microorganismes qui inhibent la biogenèse des phagolysosomes.....	12
<i>Mycobacteria</i>	12
<i>Salmonella</i>	14
<i>Legionella pneumophila</i>	16
<i>Brucella</i>	17
<i>Toxoplasma gondii</i>	19
<i>Leishmania</i>	21
Lipophosphoglycan.....	24
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	33

RÉSULTATS	4 2
FIGURES ET LÉGENDES.....	52
Figure 1	53
Figure 2	55
Figure 3	57
Figure 4	59
Figure 5	61
Figure 6	63
Figure 7	65
Figure 8	67
Figure 9	69
Figure 10	71
DISCUSSION	7 3
CONCLUSION	8 6
BIBLIOGRAPHIE	8 9
REMERCIEMENTS	1 0 4

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Schéma de la molécule du lipophosphoglycan chez *L. major* et *L. donovani*.
- Figure 2** Micrographie illustrant les propriétés de fusion de phagosomes contenant le parasite *L. major* ou le mutant Spock.
- Figure 3** Analyses quantitatives des essais de fusion intracellulaire en microscopie électronique décrivant les propriétés fusogéniques de phagosomes contenant différentes populations de *Leishmania*.
- Figure 4** Quantification de l'albumine-or présente dans les phagosomes contenant *L. donovani* et *L. major*.
- Figure 5** Immunomarquage en fluorescence du LPG à la surface des *Leishmania*.
- Figure 6** Micrographie illustrant les propriétés de fusion de phagosomes contenant *L. donovani* de type sauvage et les mutants LPG2- et LPG1-.
- Figure 7** Micrographie illustrant les propriétés de fusion de phagosomes contenant un amastigote *in vivo* et un amastigote généré *in vitro* (ALF).
- Figure 8** Analyses quantitatives des essais de fusion intracellulaire décrivant les propriétés de fusion des phagosomes contenant des parasites vivants et morts.

Figure 9 Effet d'un transporteur d'électrons (violet de cristal) sur la survie intracellulaire de *L. donovani*.

Figure 10 Analyses quantitatives des essais de fusion décrivant les propriétés de fusion entre les phagosomes contenant *L. donovani* et différentes populations d'endosomes.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ALF:	Forme amastigote in vitro (<i>Amastigote-like form</i>)
ATP:	Adénosine triphosphate
BSA:	Albumine sérique bovine (<i>Bovine serum albumin</i>)
CI-M6PR:	Récepteur du mannose-6 phosphate cation-indépendant (<i>Cation-independent mannose 6-phosphate receptor</i>)
CD-M6PR	Récepteur à mannose-6 phosphate cation-dépendant (<i>Cation-dependant mannose 6-phosphate receptor</i>)
CR1:	Récepteur C1 du complément (<i>Complement receptor 1</i>)
CR3:	Récepteur C3 du complément (<i>Complement receptor 3</i>)
CV:	Violet de cristal (<i>crystal violet</i>)
DMEM:	Milieu eagle modifié de Dubelcco (<i>Dubelcco modified eagle medium</i>)
EEA1:	Autoantigène de l'endosome précoce (<i>Early endosome autoantigen 1</i>)
Gal:	Galactose
HRP:	Peroxydase du raifort (<i>Horse radish peroxidase</i>)
Ig:	Immunoglobuline
IL-1:	Interleukine-1
LAMP:	Protéine membranaire associée au lysosome (<i>Lysosomal associated membrane protein</i>)
Ld:	<i>Leishmania donovani</i>

Lm:	<i>Leishmania major</i>
LPG:	Lipophosphoglycan
M6PR:	Récepteur du mannose-6 phosphate (<i>Mannose 6-phosphate receptor</i>)
Man:	Mannose
NEM:	N-éthyl maléimide
NSF:	Facteur sensible au N-éthyl maléimide (<i>N-ethyl maleimide sensitive factor</i>)
PBS:	Solution saline tamponnée au phosphate (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PKC:	Protéine kinase C
PMN:	Polymorphonucléaire
RLU:	Unité de lumière relative (<i>Relative light unit</i>)
rpm:	révolution par minute
SNAP:	Protéine soluble de liaison au NSF (<i>Soluble NSF attachment protein</i>)
SNARE:	Récepteur du SNAP (<i>SNAP receptor</i>)
SVF:	Sérum de veau foetal
TFR:	Récepteur de la transferrine (<i>Transferrin receptor</i>)
TNF:	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor necrosis factor</i>)
wt:	Type sauvage (<i>Wild type</i>)

INTRODUCTION

Les multiples interactions entre les humains et les microorganismes au cours de l'évolution leur ont permis d'apprendre à partager plusieurs niches écologiques et même à profiter les uns des autres dans des relations symbiotiques. En effet, on n'a qu'à penser à l'importance qu'ait pour l'humain, les microorganismes qui composent sa flore intestinale. Par contre, certains microorganismes, par exemple les parasites intracellulaires, menacent la santé et peuvent causer de graves maladies comme la tuberculose, la salmonellose et la leishmaniose, pour n'en nommer que quelques-unes. Cette menace est d'autant plus importante que, de nos jours, les traitements antibiotiques et chimiothérapeutiques usuels sont de moins en moins efficaces à cause de l'émergence de souches résistantes. C'est pourquoi, afin de développer de nouvelles thérapies, il devient primordial de comprendre les mécanismes par lesquels ces microorganismes échappent à nos défenses cellulaires naturelles.

D'une façon plutôt paradoxale, certains parasites intracellulaires envahissent et se reproduisent à l'intérieur de cellules du système immunitaire telles les macrophages, qui ont comme fonction première d'ingérer et de détruire les microorganismes. Dans ces cellules, les microbes sont capturés par un processus appelé phagocytose et résident ensuite dans les phagosomes (Rabinovitch, 1995). Après leur formation, les phagosomes entreprennent un processus de maturation très complexe menant à la formation des phagolysosomes (Desjardins et *al.*, 1994a),

compartiments finaux de la phagocytose servant à tuer et à dégrader les microorganismes. Toutefois, les parasites intracellulaires qui infectent les macrophages ont développé des stratégies pour échapper à la dégradation dans leurs cellules hôtes (revue dans: Dermine et Desjardins, 1999; Finlay et Falkow, 1997; Sinai et Joiner, 1997). Avant de discuter de ces stratégies, il est important de décrire la phagocytose et le processus normal de biogenèse des phagolysosomes qui mènent ultimement à la dégradation des agents pathogènes.

La phagocytose

Le terme phagocytose a été utilisé pour la première fois par Metchnikoff en 1883. Ce terme vient du grec *Phagein* qui signifie manger et *kytos* qui signifie cellules. Il signifie donc littéralement "manger des cellules" et fait référence à l'ingestion de cellules apoptotiques par d'autres cellules, telles les macrophages. La définition de la phagocytose a été élargie et fait aujourd'hui référence à la capture et à l'internalisation de larges particules, d'un diamètre supérieur à 0,5 μm dans une cellule (Greenberg et Silverstein, 1993). Plusieurs types de cellules peuvent faire de la phagocytose, mais certaines en font leur spécialité (Rabinovitch, 1995).

Phagocytes professionnels

Les phagocytes dits professionnels sont des cellules spécialisées en phagocytose classées parmi les polymorphonucléaires (PMN). Les

monocytes et les macrophages en sont les principales. Ces cellules s'accumulent aux sites d'infection ou d'inflammation et débarrassent l'organisme des microorganismes envahisseurs. Ces cellules phagocytaires possèdent une multitude de récepteurs de surface qui servent à la phagocytose, tels les récepteurs aux Fc, les récepteurs à complément et les récepteurs à mannose pour n'en nommer que quelques-uns. Elles peuvent aussi sécréter une panoplie de molécules qui jouent un rôle dans l'inflammation ou dans la réponse immunitaire, telles des cytokines qui influencent le comportement des autres cellules immunitaires, des radicaux toxiques qui s'attaquent aux microorganismes, certaines enzymes qui peuvent dégrader la matrice extracellulaire et des médiateurs de l'inflammation (Rabinovitch, 1995).

Phagocytes non professionnels

En plus des PMNs, d'autres types de cellules, par exemple les cellules épithéliales et les fibroblastes, peuvent faire de la phagocytose (Rabinovitch, 1995). Ces cellules sont dites phagocytes non professionnels, puisque la phagocytose ne fait pas partie de leur fonction première. Contrairement aux phagocytes professionnels, elles sont limitées quant aux types de particules qu'elles peuvent ingérer. Cette différence peut être attribuée à l'absence de récepteur à la surface de ces cellules. Par exemple, elles ne possèdent pas les récepteurs aux Fc impliqués dans l'internalisation spécifique de particules opsonisées par les anticorps de type IgG, mais peuvent faire de la phagocytose à l'aide des récepteurs à

fibronectine, à laminine et à l'héparane sulfate (Herrera et al., 1994). De plus, les phagocytes non professionnels ne produisent pas de molécule antimicrobienne toxique comme le font normalement les phagocytes professionnels après l'internalisation d'une particule.

Mécanismes de la phagocytose

Généralement, les mécanismes de la phagocytose sont indépendants de la clathrine, contrairement à l'endocytose, et requièrent la polymérisation de l'actine (Alberts et al., 1993). La phagocytose s'amorce lorsqu'il y a interaction entre des molécules présentes à la surface de la particule et des récepteurs de la cellule phagocytaire (Rabinovitch, 1995). Il existe 3 modèles décrivant la phagocytose: le modèle de la fermeture éclair (zipper model); le modèle du "trigger"; et la phagocytose par enroulement de membrane (coiling phagocytosis).

Le modèle de la fermeture éclair constitue le mécanisme dominant de la phagocytose (Swanson et Baer, 1995). Il s'agit d'un processus contrôlé qui agit de façon sélective sur une particule et cause son internalisation sans pour autant déclencher l'internalisation de particules adjacentes présentes à la surface du phagocyte. Selon ce modèle, la particule s'attache d'abord à la cellule phagocytaire à l'aide de récepteurs. Par la suite, il se produit un recrutement séquentiel de récepteurs afin de faciliter l'interaction entre la membrane plasmique et la surface de la particule (Griffin et al., 1975). Ce recrutement se fait au fur et à mesure que les

pseudopodes, extensions de membrane plasmique du phagocyte, avancent le long de la surface de la particule sur le point d'être internalisée. Une fois le processus terminé, la particule se retrouve enfermée dans un phagosome dont la membrane est juxtaposée à sa surface.

Le modèle du "trigger" peut être comparé à la macropinocytose. Ce mécanisme est mis en œfétuvre lorsque la membrane plasmique se déforme et produit une ondulation qui se referme sur elle-même pour donner naissance à de larges vacuoles contenant du fluide extracellulaire, appelées macropinosomes. Lorsque le processus est enclenché, ces "vagues" de membrane plasmique, non dirigés par des récepteurs spécifiques, englobent toutes les particules se trouvant dans la région. Contrairement au mécanisme de la fermeture éclair, ce processus d'internalisation ne requiert pas le recrutement de récepteurs dans la région et la réponse n'est pas proportionnelle à la taille de la particule, puisqu'il n'y a pas d'interaction récepteur-ligand. Certaines bactéries peuvent provoquer ce type de phagocytose lorsqu'elles interagissent avec la membrane plasmique du phagocyte. C'est le cas par exemple de *Salmonella typhimurium* (Francis et al., 1992) qui se retrouve alors dans des phagosomes spacieux dont la membrane n'est pas juxtaposée à la surface des bactéries (Alpuche-Aranda et al., 1994).

Un troisième mécanisme de phagocytose, appelé phagocytose par enroulement, se produit lorsqu'un pseudopode de la cellule phagocytaire s'enroule plusieurs fois autour d'une particule ou d'un microorganisme,

créant ainsi un compartiment formé par une multitude de couches membranaires superposées les unes sur les autres (Horwitz, 1984). *Legionella* est un des rares microorganismes qui pénètrent les macrophages par ce processus. Certains rapports font état de phagocytose par enroulement de membrane pour d'autres pathogènes (Rittig et al., 1998a et b). Cependant, la fréquence de ces observations est plutôt faible. Par conséquent, il semble que ce type de phagocytose ne constitue pas un mécanisme distinct, mais plutôt une variante du mécanisme de la fermeture éclair dans laquelle il y aurait absence de fusion entre les deux pseudopodes qui englobent un microorganisme (Rittig et al. 1998b). En absence de fusion, un des pseudopodes glisse par dessus l'autre et s'enroule autour du microorganisme.

Une fois la phagocytose terminée, les particules ou les microorganismes se retrouvent dans des compartiments appelés phagosomes. Ces vacuoles constituent les compartiments initiaux de la voie phagocytaire qui mène ultimement à la formation des phagolysosomes où les microorganismes sont normalement dégradés.

Biogenèse des phagolysosomes

Lors de l'internalisation, les particules ou les microorganismes entraînent avec eux une partie de la membrane plasmique qui forme initialement la membrane des phagosomes. Ces phagosomes nouvellement formés ne possèdent pas la machinerie nécessaire à la

dégradation des microbes. Il faut donc qu'ils se transforment afin d'acquérir les enzymes dégradatives et les autres composés toxiques capables de s'attaquer aux microorganismes. Ces substances s'accumulent lors de la maturation des phagosomes, processus aussi appelé biogenèse des phagolysosomes. On a longtemps pensé que la formation du phagolysosome se faisait en un seul événement de fusion entre un phagosome et un lysosome, le compartiment final de la voie endocytaire. (Rabinowitz et *al.*, 1992). Toutefois, on reconnaît aujourd'hui que ce processus est beaucoup plus complexe et implique de nombreuses interactions entre les phagosomes et divers compartiments intracellulaires de la voie endocytaire et biosynthétique (Desjardins et *al.*, 1994a). La biogenèse des phagolysosomes est donc un processus complexe qui nécessite le mouvement des organites le long de microtubules et du réseau d'actine, la reconnaissance des organites, la fusion et le recyclage des protéines (Desjardins, 1995; Blocker et *al.*, 1997; Blocker et *al.*, 1998).

Lors de la maturation des phagosomes, il se produit de nombreuses modifications biochimiques de ces compartiments causées par de multiples interactions entre les phagosomes et différentes populations d'endosomes (Mayorga et *al.*, 1991; Pitt et *al.*, 1992; Desjardins et *al.*, 1994a, 1994b, 1997). D'abord, peu après l'internalisation, certaines protéines de la membrane plasmique recrutées lors de l'internalisation, telles les récepteurs à mannose et aux Fc ainsi que des adaptines, disparaissent graduellement de la membrane phagosomiale. Par contre, certaines protéines comme le récepteur à mannose-6-phosphate (M6PR), la pompe à protons et les

molécules de la famille des LAMP, s'accumulent progressivement à la membrane phagosomiale. De plus, la quantité de plusieurs autres protéines solubles originaires des lysosomes, incluant la cathepsine D et la β -glucuronidase, augmente proportionnellement à l'âge des phagosomes. D'autres études sur des phagosomes contenant des billes de latex ont montré qu'ils acquièrent avec le temps des marqueurs d'endosomes tardifs, tels rab7 et LAMP1 et 2, mais perdent les marqueurs d'endosomes précoces comme rab5 (Desjardins et *al.*, 1994a).

Un modèle pour expliquer les multiples interactions entre les phagosomes et les endosomes a récemment été proposé (Desjardins, 1995). Il s'agit de l'hypothèse du "Kiss and Run". Selon ce modèle, les compartiments endosomiaux et phagosomiaux qui se meuvent le long de microtubules se rencontrent et fusionnent entre eux. Lors de cette rencontre, un pore de fusion transitoire se forme et permet l'échange de membranes et le mélange du contenu des deux compartiments. À ce moment des protéines membranaires ou luminales originaires des endosomes sont ajoutées aux membranes ou au contenu des phagosomes. Parallèlement, les phagosomes perdent certaines de leurs protéines. Ainsi, leur composition biochimique se modifie graduellement. Par la suite, le pore se referme par un processus de fission qui permet aux compartiments de se séparer. Un tel processus fait en sorte que les phagosomes puissent acquérir, par exemple, des hydrolases présentes dans les endosomes tardifs et les lysosomes, sans pour autant que les contenus de ces différentes vacuoles se mélangent complètement. Ce type d'interaction a

aussi été décrit dans d'autres processus biologiques, par exemple dans l'exocytose (Alvarez de Toledo et *al.*, 1993).

Une étude a montré que la fusion entre les phagosomes et les compartiments endocytaires requiert de l'ATP (adénosine triphosphate), du cytoplasme et des protéines associées aux membranes (Mayorga et *al.*, 1991). Il semble aussi que la machinerie de fusion composée des NSF (facteur sensible au N-éthyl-maléimide), SNAP (protéine soluble de liaison au NSF) et SNAREs (récepteur du SNAP) (Rothman et Orci, 1992; Söllner et *al.*, 1993; Rothman et Warren, 1994) joue un rôle dans la fusion entre les éléments de la voie phagocytaire et endocytaire. En effet, le NEM (N-éthyl-maléimide), une molécule inactivant la NSF donc, inhibitrice de la fusion catalysée par la machinerie de fusion énumérée précédemment, peut inhiber la fusion entre les phagosomes et les endosomes. Par ailleurs, certaines données suggèrent que plusieurs molécules régulatrices de la fusion présentes chez les endosomes jouent un rôle dans la fusion phagosome-endosome, telles des petites GTPases hétérotrimériques (Beron et *al.*, 1995). De plus, d'autres GTPases comme rab5, qui participe aux événements de fusion précoces, ainsi que rab7, qui participe aux événements de fusion tardifs, pourraient être impliquées dans la fusion entre les phagosomes et les endosomes (Chavrier et *al.* 1990; Gorvel et *al.* 1991; Méresse et *al.* 1995; Feng et *al.* 1995).

Plusieurs centaines de protéines sont associées aux phagosomes et bon nombre d'entre elles pourraient jouer un rôle dans la fusion (Desjardins

et *al.*, 1994a et b). De toute évidence, d'autres études sont requises afin de décrire avec exactitude le processus de la biogenèse des phagolysosomes.

Stratégie de survie des pathogènes à l'intérieur des macrophages

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes est un agent infectieux qui se retrouve dans les aliments et infecte les cellules épithéliales des intestins causant ainsi la listériose, une maladie qui peut affecter aussi les systèmes nerveux et reproducteur (Cooper et Walker, 1998). *L. monocytogenes* s'échappe des phagosomes avant que le milieu ne devienne trop hostile. La bactérie arrive à cette fin en produisant deux phospholipases, qui aident à la dissolution de la membrane phagosomiale (Leimeister-Wacher et al., 1991; Mengaud et al., 1991; Vasquez-Boland et al., 1992), et en synthétisant la listeriolysine O, une enzyme servant à lyser la membrane phagosomiale (Gaillard et al., 1987; Portnoy et al., 1988). La nature des compartiments contenant *Listeria* est très peu connue jusqu'à présent, puisque la lyse rapide des phagosomes par la listeriolysine O rend difficile l'étude de leur composition. Toutefois, le fait que la listeriolysine O soit active à un pH acide (Geoffroy et al., 1987), alors que les phagosomes ont un pH neutre au départ, suggère qu'il doit exister un processus de maturation des phagosomes. Des études récentes faisant appel à des mutants, qui ne possèdent pas l'activité enzymatique de la listeriolysine O, ont fourni

certaines informations sur la composition des phagosomes contenant des *Listeria*. Les résultats ont montré que les phagosomes acquièrent des marqueurs d'endosomes précoces, comme les récepteurs à mannose et à transferrine, ainsi que des protéines nécessaires aux événements de fusion, telles NSF et SNAP (Alvarez-Dominguez et al., 1997). De plus, les phagosomes acquièrent la petite GTPase rab5 (Alvarez-Dominguez et al., 1996), une protéine qui régule les événements de fusion précoces dans la voie endocytique (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992). Par contre, des marqueurs endosomiaux plus tardifs comme le CI-M6PR ainsi que des protéines lysosomiales ne s'accumulent pas sur les phagosomes contenant *Listeria*, ce qui suggère qu'il y a un arrêt dans le processus de maturation. Cet arrêt permettrait aux bactéries de s'échapper d'un compartiment avant qu'il ne devienne trop hostile et aussi, préviendrait la fuite d'enzymes hydrolytiques vers le cytoplasme lors de la lyse des phagosomes.

Shigella

Les *Shigella* sont des bactéries répandues dans les régions tropicales, où elles causent de graves dysenteries. Elles infectent principalement les cellules épithéliales du côlon et pénètrent dans les cellules par un mécanisme qui entraîne une réorganisation des filaments d'actine et la formation d'ondulations dans la membrane (ruffles) (Menard et al., 1996). Tout comme *Listeria*, les *Shigella* s'échappent rapidement vers le cytoplasme après leur internalisation. Ce comportement est associé aux protéines encodées par la famille de gènes *ipa*; dont une possède une

activité lytique (High et *al.*, 1992). Un mécanisme similaire à celui de *Listeria* semble être utilisé par *Shigella* pour s'échapper des phagosomes (High et *al.*, 1992). Malheureusement, la lyse rapide de la membrane phagosomiale restreint beaucoup l'étude de la composition des phagosomes contenant ce pathogène.

Les microorganismes qui inhibent la biogenèse des phagolysosomes

Une autre stratégie utilisée par certains microorganismes pour survivre dans les macrophages consiste à éviter de se retrouver dans les phagolysosomes en altérant la route intracellulaire normale des phagosomes. Dans bien des cas, les microorganismes arrivent à cette fin en inhibant la fusion phagosome-endosome. Cette stratégie est utilisée par *Mycobacteria*, *Salmonella*, *Legionella*, *Toxoplasma gondii*, *Brucella* et les promastigotes de *Leishmania*. Les promastigotes de *Leishmania*, qui est le parasite intracellulaire utilisé au cours des présents travaux, seront décrits plus en détail ultérieurement.

Mycobacteria

Plusieurs études ont montré que les mycobactéries entrent dans les macrophages par phagocytose et résident dans des compartiments qui ne fusionnent pas avec les lysosomes (Armstrong et Hart, 1971; de Chastellier et *al.*, 1993; Xu et *al.*, 1994; Clemens et Horwitz, 1995; Barker et *al.*, 1997).

Toutefois, l'idée voulant que les phagosomes contenant des mycobactéries soient totalement incapables de fusion a été remise en question au cours des dernières années, si bien qu'il est maintenant démontré que ces compartiments sont dynamiques et capables de fusionner avec certains types d'endosomes. En effet, des données morphologiques indiquent que certaines molécules internalisées dans les endosomes précoces peuvent être transférées vers les phagosomes contenant des mycobactéries (de Chastellier et *al.*, 1995). De plus, les phagosomes contenant des mycobactéries acquièrent certains glycosphingolipides originaires de la membrane plasmique autres que ceux déjà présents lors de leur formation, démontrant ainsi qu'il y a fusion entre ces compartiments et des vésicules issues de la membrane plasmique (Russell et *al.*, 1996).

Des données biochimiques ont permis de démontrer que les phagosomes contenant des mycobactéries ont une composition similaire aux endosomes précoces. En effet, ils sont enrichis pour la petite GTPase rab5, un marqueur typique des compartiments précoces, mais dépourvus de rab7, un marqueur typique des endosomes tardifs (Via et *al.*, 1997; Deretic et *al.*, 1997). Étant donné que rab5 est une protéine régulatrice des événements de fusion chez les endosomes précoces, tandis que rab7 régule les événements tardifs (Chavrier et *al.*, 1990; Gorvel et *al.*, 1991; Méresse et *al.*, 1995; Feng et *al.*, 1995), ces résultats expliquent pourquoi les phagosomes contenant des mycobactéries fusionnent avec des endosomes précoces, mais pas avec les tardifs. De plus, il a été démontré que les phagosomes contenant des mycobactéries acquièrent la cathepsine

D, mais sous une forme inactive présente seulement chez des compartiments endocytaires précoces (Sturgill-Koszycki et *al.*, 1996).

Jusqu'à présent, les mécanismes qu'utilisent les mycobactéries pour inhiber la fusion phagosome-lysosome demeurent méconnus, mais il pourrait s'agir d'une production de chlorure d'ammonium qui interférerait avec le mouvement des lysosomes (Gordon et *al.*, 1980; Hart et *al.*, 1983). De plus, certains facteurs de virulence comme les glycolipides présents à la surface des bactéries, qui se retrouvent en contact avec la membrane interne des phagosomes après leur internalisation, pourraient affecter les propriétés de fusion des phagosomes (Ehlers et Daffe, 1998).

Salmonella

Les salmonelles sont les agents étiologiques des salmonelloses. Ces bactéries infectent des phagocytes non professionnels de l'épithélium intestinal par un mécanisme comportant des ondulations dans la membrane plasmique (membrane ruffles) (Finlay, 1994), ce qui donne lieu à la formation de phagosomes très spacieux apparentés aux macropinosomes (Alpuche-Aranda et *al.*, 1995). Elles peuvent aussi infecter des macrophages en entrant par phagocytose classique, donnant lieu à la formation de phagosomes dont la membrane est juxtaposée aux bactéries. Plusieurs laboratoires ont étudié le trafic intracellulaire des phagosomes contenant *Salmonella*. Toutefois, leurs résultats, souvent conflictuels ne permettent pas de proposer un modèle clair à ce sujet. Certaines études

chez les macrophages ont montré que les phagosomes contenant *Salmonella* fusionnent très peu avec les lysosomes (Ishibashi et Arai, 1990; Buchmeier et Heffron, 1991). Par conséquent, les phagosomes n'acquièrent pas le M6PR, un marqueur endosomal tardif, ni la cathepsine D (Rathman et al., 1997). Une inhibition partielle chez des cellules épithéliales a aussi été montrée (Garcia-del Portillo et Finlay, 1995). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que les salmonelles sont internalisées dans des phagosomes qui interagissent peu avec les endosomes tardifs contenant le M6PR. Par contre, le groupe de Oh et collaborateurs (1996) a démontré que les phagosomes contenant *Salmonella* fusionnent avec les lysosomes et se transforment en phagolysosomes. Ces phagosomes sont positifs pour LAMP1 et la cathepsine L, deux marqueurs lysosomiaux. L'utilisation de cellules différentes et de techniques diverses pourrait expliquer pourquoi autant de résultats différents ont été obtenus (Rathman et al., 1997).

Quoique les résultats de plusieurs études n'aient pas permis d'établir un modèle de la route intracellulaire des phagosomes contenant *Salmonella*, ces compartiments initient leur maturation en fusionnant avec certains compartiments endocytaires. En effet, il a été démontré que ces phagosomes s'acidifient rapidement après leur formation (Alpuche-Aranda, 1992; Rathman et al., 1996). Ce processus est essentiel à l'activation de gènes qui permettent la survie des salmonelles .

Legionella pneumophila

Les *Legionella pneumophila*, responsables d'une pneumonie connue aussi sous le nom de maladie du légionnaire, sont des parasites intracellulaires facultatifs qui infectent les macrophages alvéolaires (McDade et al., 1977). Ces bactéries pénètrent leurs cellules hôtes par phagocytose par enroulements de membrane (Horwitz, 1984) et résident dans des phagosomes qui ne s'acidifient pas et ne fusionnent pas avec les lysosomes (Horwitz, 1983a; Horwitz et Maxfield, 1984). Après leur formation, les phagosomes contenant *Legionella* s'associent séquentiellement à des vésicules lisses, à des mitochondries et au réticulum endoplasmique pour être ensuite relocalisés autour du noyau où ils ressemblent à des vacuoles couvertes de ribosomes (Horwitz, 1983b; Swanson et Isberg, 1995). Ces compartiments finaux, appelés phagosomes réplicatifs, montrent des similarités avec les vacuoles autophagiques (Swanson et Isberg, 1995). Ils ne possèdent pas de marqueurs tardifs tels LAMP1, LAMP2, CD63 et cathepsine D, ni de marqueurs des endosomes précoces, comme le récepteur à la transferrine (Clemens et Horwitz, 1995). Ces données démontrent que la maturation de ces vacuoles vers les phagolysosomes est inhibée très tôt après la phagocytose, ce qui peut être expliqué par un mécanisme d'inhibition de la fusion phagosome-endosome (Clemens et Horwitz, 1995).

Des études récentes effectuées dans plusieurs laboratoires ont permis d'identifier une famille de gènes associés à la virulence des

Legionella. On appelle ces gènes *icm/dot* (voir Segal et Shuman, 1998; Kirby et Isberg, 1998). Il a été montré que le gène *dotA*, qui code pour une protéine membranaire interne, est essentiel à l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome (Roy et Isberg, 1997; Roy et *al.*, 1998). Le mécanisme précis par lequel les *Legionella* inhibent la fusion n'est pas encore connu, mais il semble que le complexe *icm/dot* permet à la bactérie de former des pores dans les membranes de cellules eukaryotes pour y transférer de l'ADN ou certaines macromolécules (Kirby et *al.*, 1998; Vogel et *al.*, 1998) qui pourraient interférer avec la fusion phagosome-lysosome (Segal et Shuman, 1998). D'autres gènes de la famille *icm/dot*, c'est-à-dire, *dotH*, *dotI* et *dotO*, ont été récemment identifiés comme étant essentiels à la croissance et à l'évitement de la voie phagocytaire normale (Andrews et *al.*, 1998). Bien que la fonction de ces gènes soit encore inconnue, des mutants pour ces gènes ont été retrouvés dans des phagosomes positifs pour LAMP1, marqueur des lysosomes qui normalement, ne se retrouvent pas associé aux phagosomes contenant des *Legionella* de type sauvage. Ce résultat suggère qu'il y a une altération du trafic intracellulaire des phagosomes contenant de tels mutants.

Brucella

Les *Brucella* causent une maladie connue sous le nom de fièvre de Malte. Ces bactéries infectent surtout les cellules du système réticuloendothélial, en particulier les macrophages. Tout comme les autres parasites mentionnés précédemment, l'inhibition de la fusion phagosome-

lysosome semble être essentielle à leur survie à l'intérieur de leurs cellules hôtes (Frenchick et al., 1985; Pizarro-Cerdá et al., 1998a). En effet, une étude récente effectuée chez des phagocytes non professionnels a fait état d'une inhibition de la fusion phagosome-lysosome par des souches virulentes, alors que des souches atténuées n'inhibent pas ce processus (Pizarro-Cerdá et al., 1998a). La caractérisation des phagosomes contenant *Brucella* indique qu'ils possèdent une composition similaire à des endosomes précoces, puisque l'on détecte la présence du marqueur précoce EEA1 peu de temps après l'internalisation de cette bactérie (Pizarro-Cerdá et al., 1998b). Toutefois, les phagosomes contenant *Brucella* n'acquièrent pas les marqueurs endosomiaux tardifs comme le CI-M6PR, le CD-M6PR, rab7 et la protéase lysosomiale cathepsine D, mais accumulent graduellement les marqueurs LAMP1 et LAMP2. Tous ces résultats suggèrent que les *Brucella* résident dans des compartiments qui peuvent fusionner avec des organites endocytaires précoces alors qu'ils sont incapables de fusionner avec des compartiments tardifs, comme les lysosomes. Cependant, il est difficile d'expliquer l'acquisition des marqueurs LAMP1 et LAMP2 retrouvés normalement chez les lysosomes. Il est possible que les phagosomes contenant *Brucella* acquièrent ces protéines par la voie biosynthétique (Rohrer et al., 1996).

Bien que les résultats décrits précédemment proviennent d'études faites sur des cellules non phagocytaires, il est probable que *Brucella* utilise la même stratégie chez les phagocytes professionnels. Le fait que des extraits solubles de *Brucella abortus* soient capables d'inhiber la fusion

phagosome-lysosome chez les macrophages, est une bonne indication que le même mécanisme d'inhibition fonctionne chez différents types de cellules (Frenchick et *al.*, 1985).

Mis à part leurs faibles propriétés fusogéniques, les phagosomes contenant *Brucella* ont la caractéristique unique d'être dirigés vers le réticulum endoplasmique en utilisant la machinerie autophagique de la cellule hôte (Pizarro-Cerdá et *al.*, 1998b). En effet, des observations en microscopie électronique ont permis de démontrer que la morphologie de compartiments contenant *Brucella* ressemble à celle des vacuoles autophagiques (Pizarro-Cerdá 1998a). Ces vacuoles autophagiques, aussi appelées autophagosomes, proviennent, vraisemblablement, du réticulum endoplasmique rugueux pauvre en ribosomes (Dunn 1990, a et b). Une association avec le réticulum endoplasmique pourrait fournir un environnement favorable à la réplication des *Brucella*.

Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii cause la toxoplasmose, une maladie pouvant affecter plusieurs organes, mais que l'on retrouve principalement chez les individus immunodéficients. Ces parasites entrent dans les macrophages et autres cellules nucléées par un processus actif différent de la phagocytose classique. L'internalisation se fait sous l'action de l'ATP et du cytosquelette du parasite, tandis que le réseau d'actine de la cellule hôte ne semble jouer aucun rôle dans ce processus (revue dans Sinai et Joiner, 1997). Cette

méthode d'internalisation induit la formation de vacuoles incapables de fusionner avec les organites endocytaires (Jones et Hirsch, 1972; Sibley et al., 1985; Joiner et al., 1990). Ces vacuoles n'ont rien en commun avec les phagosomes normaux, puisqu'elles sont formées par un mécanisme qui ne fait pas appel aux récepteurs spécifiques de la phagocytose (Jones et Hirsch, 1972; Sibley et al., 1985; Joiner et al., 1990) et exclut les protéines associées à la membrane plasmique des cellules hôtes (de Carvalho et de Souza 1989; Pacheco-Soares et De Souza 1998). Cette exclusion pourrait expliquer l'incapacité à fusionner des vacuoles en raison de l'absence de la machinerie requise pour la fusion. Par contre, lorsque les parasites sont opsonisés avec des IgG pour les forcer à entrer dans les macrophages par phagocytose classique médiée par les récepteurs Fc, les phagosomes formés sont alors aptes à fusionner et se transforment normalement en phagolysosomes (Joiner et al., 1990; Mordue et Sibley, 1997). Ces résultats suggèrent que le destin des parasites dans les macrophages est déterminé par le mécanisme d'entrée (Joiner et al., 1990).

Les vacuoles contenant *T. gondii* ne possèdent pas de marqueur de la membrane plasmique, ni de marqueur des endosomes précoces, comme le TFR, ni de marqueur des endosomes tardifs, comme le M6PR (de Carvalho et de Souza, 1989; Joiner, 1992; Joiner et al., 1990; Mordue et Sibley, 1997). Ces résultats indiquent clairement que ces vacuoles ne suivent pas la voie normale de biogenèse des phagolysosomes. Les vacuoles contenant *T. gondii* s'associent plutôt avec du réticulum endoplasmique et des mitochondries (Sinai et al., 1997). L'importance de

cette association demeure inconnue. Elle pourrait servir de système de livraison de nutriments ou fournir les matériaux nécessaires à l'expansion des vacuoles lors de la réplication des parasites. La participation du réticulum endoplasmique et des mitochondries à la synthèse des lipides rend probable cette possibilité (Trotter et Voelker, 1994; Vance et Shiao, 1996).

Leishmania

Les parasites du genre *Leishmania* sont les agents étiologiques des leishmanioses. Il existe 3 types de leishmanioses: le type cutané causé par *L. major*, *L. tropica*, et *L. mexicana*; le type mucocutané causé par *L. braziliensis braziliensis*; et le type viscéral causé par *L. donovani*. La maladie viscérale, qui est mieux connue sous le nom de Kala-azar, atteint le foie et la rate et est souvent mortelle. Jusqu'à présent, il existe peu de traitements efficaces contre la leishmaniose viscérale. De plus ces traitements sont toxiques et provoquent de graves effets secondaires.

Les *Leishmania* ont un cycle de vie comprenant deux stades. Ils existent sous une forme flagellée, appelée promastigote, que l'on retrouve chez les mouches phlébotomes, et sous une forme aflagellée, appelée amastigote, que l'on retrouve chez les mammifères. Lors d'une morsure de la mouche, les promastigotes sont injectés sous le derme d'un mammifère et pénètrent ensuite dans les macrophages par phagocytose médiée par des

récepteurs (Mosser et Rosenthal, 1993). Toutefois, une étude récente suggère que la phagocytose par enroulement de membrane pourrait être impliquée (Rittig et *al.*, 1998b). Une fois à l'intérieur de phagosomes, les promastigotes doivent s'adapter afin de survivre dans le nouvel environnement fort différent de celui présent chez la mouche. L'augmentation de la température et la baisse de pH à l'intérieur des phagosomes, provoquent la différenciation des promastigotes en amastigotes mieux adaptés pour se reproduire dans de telles conditions (Zilberstein et Shapira, 1994).

Plusieurs études ont montré que les amastigotes résident dans des phagosomes possédant certaines caractéristiques des phagolysosomes. En effet, les phagosomes contenant *L. mexicana* et *L. amazonensis* maintiennent un pH acide (Antoine et *al.*, 1990), ont accès à des traceurs chargés dans les endosomes et possèdent une activité enzymatique d'acide phosphatase, une activité présente surtout chez les lysosomes (Alexander and Vickerman 1975; Chang and Dwyer 1976; Shepherd et *al.*, 1983; Brazil 1984; Rabinovitch et *al.*, 1985). De plus, des études plus récentes ont montré que les phagosomes contenant *L. donovani* possèdent des marqueurs des endosomes tardifs et des lysosomes (Prina et *al.*, 1990; Russell et *al.*, 1992; Lang et *al.*, 1994). Toutes ces données suggèrent que les amastigotes prolifèrent à l'intérieur de phagolysosomes. La machinerie moléculaire qui intervient dans la survie des amastigotes dans l'environnement hostile des phagolysosomes reste méconnue jusqu'à présent, mais il semble que ces parasites peuvent résister à l'action des

hydrolases. Cette résistance n'est pas due à la présence d'une enveloppe protectrice puisque, contrairement aux promastigotes, les amastigotes ne produisent pas de glycocalix capable de les protéger des hydrolases (Pimenta et *al.*, 1991). Il est possible que les amastigotes synthétisent des protéases, comme la gp63 (Chaudhuri et *al.*, 1989; Seay et *al.*, 1996) impliquées dans la dégradation de molécules de l'hôte (Pupkis et *al.* 1986). De plus, les amastigotes possèdent des activités enzymatiques, comme la glutathione peroxidase, la catalase et la superoxyde dismutase, capables de neutraliser les composés oxydatifs toxiques dont sont enrichis les phagolysosomes des macrophages (Channon et Blackwell, 1985).

Contrairement aux amastigotes, les promastigotes de *Leishmania* résident à l'intérieur de compartiments qui ne possèdent pas les caractéristiques des phagolysosomes (Scianimanico et *al.*, 1999). Une étude de notre laboratoire a montré que c'est probablement en inhibant la fusion phagosome-endosome, un processus essentiel à la formation des phagolysosomes, que les *Leishmania* arrivent à survivre dans des compartiments moins hostiles. L'environnement favorable de ces compartiments permet aux promastigotes d'initier leur transformation en amastigotes à l'abri de l'attaque des enzymes lytiques présentes dans les phagolysosomes (Desjardins et Descoteaux, 1997). Il apparaît donc évident que la stratégie de survie des promastigotes est liée à leur habileté à moduler les propriétés de fusion des phagosomes. Il a été démontré que l'inhibition de la fusion est probablement due à la présence de

lipophosphoglycan (LPG) à la surface des promastigotes (Desjardins et Descoteaux, 1997).

Lipophosphoglycan

Le LPG est le glycoconjugué majeur des différentes espèces de *Leishmania*. Chez *Leishmania donovani*, il consiste en une longue chaîne d'unités disaccharidiques phosphorylées répétitives ($\text{PO}_4\text{-6Gal}\beta\text{1-4Man}$) (jusqu'à 16 unités selon le stade de développement du parasite) qui se termine au bout par une structure ("cap") composée du trisaccharide $\text{Gal}(\beta\text{1,4})\text{Man}(\alpha\text{1,2})\text{Man}\alpha\text{1}$ (Thomas et al., 1992). Ce polymère d'unités disaccharidiques est attaché par l'autre extrémité à un noyau hexasaccharidique qui consiste en une unité glucosamine non acétylée, deux résidus mannoses, un résidu galactose 6-phosphate, un résidu galactopyranose et un résidu galactofuranose (Turco et al., 1989). Ce noyau est lui-même fixé à une ancre lipidique, 1-*O*-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(*myo*)inositol insérée dans la membrane plasmique (Orlandi et Turco, 1987; Turco et al., 1987, 1989). Cette structure est essentiellement la même chez toutes les espèces de *Leishmania*. Les différences entre les espèces se retrouvent principalement chez les chaînes saccharidiques latérales. Ainsi, *L. major* contient des chaînes oligosaccharidiques latérales formées de résidus galactoses et arabinoses liés à la position 3 du résidu galactose des unités répétitives du LPG (McConville et al., 1990). La figure

1 (section Figures et Légendes) décrit de façon schématique la structure du LPG chez *L. donovani* et *L. major*.

Le polymorphisme structural du LPG permet à certaines espèces de *Leishmania* d'être véhiculées par des mouches d'espèces différentes (Pimenta et al., 1994). Les *Leishmania* qui expriment un LPG contenant des unités répétitives non substituées, comme c'est le cas chez *L. donovani*, sont transmis surtout par les mouches de l'espèce *Phlebotomus argentipes* tandis que *L. major* est transmis par *Phlebotomus papatasi*.

La structure du LPG est modifiée au cours du développement du parasite. Les modifications les plus importantes se produisent lors de la métacyclogenèse du parasite à l'intérieur du système digestif de la mouche. Ce processus constitue un passage d'une forme non infectieuse, appelée procyclique, où les parasites se multiplient, vers une forme infectieuse, où les promastigotes ne se divisent plus et migrent vers la bouche de l'insecte. La métacyclogenèse s'accompagne d'une élongation marquée (environ le double) de la molécule du LPG causée par une augmentation du nombre d'unités disaccharidiques répétitives. Ce nombre peut atteindre 30 dans le cas de *Leishmania donovani* (McConville et Blackwell, 1991). Cette élongation permettrait de masquer certains sucres terminaux de la molécule et, ainsi, permettrait aux parasites métacycliques de se détacher de la paroi intestinale pour se rendre à la hauteur de la bouche afin d'être subséquentement injectés dans un mammifère (Sacks et Perkins, 1984, 1985; Pimenta et al., 1992, Sacks et al., 1995).

À la suite de l'internalisation des promastigotes métacycliques dans les phagosomes de macrophages, survient leur transformation graduelle en la forme amastigote, qui constitue la forme répliquative chez les mammifères. Tel que mentionné plus haut, lors de cette transformation, le parasite devient résistant à l'environnement des phagolysosomes. Cette transformation se caractérise par la perte du flagelle, mais aussi par une diminution marquée de l'expression du LPG de surface (McConville et Blackwell, 1991). La quasi-disparition du LPG lors de la transformation des promastigotes en amastigotes indique que cette molécule n'est pas essentielle à la survie dans les phagolysosomes.

Plusieurs rôles du LPG dans la survie des parasites autant chez la mouche que chez le mammifère ont été proposés (McNeely et Turco, 1990). Le LPG forme un glycocalix dense apte à protéger les promastigotes contre la dégradation dans le système digestif de la mouche (Schlein et *al.*, 1990). De plus, lors de la métacyclogenèse des promastigotes, la modification du LPG permet la migration des promastigotes vers la bouche de l'insecte (Turco, 1990). Chez le mammifère, le LPG accomplit plusieurs fonctions avant l'internalisation des parasites dans les macrophages. Une des fonctions extracellulaires du LPG consiste à protéger le parasite contre les attaques du complément. En effet, les promastigotes métacycliques infectieux, sont beaucoup plus résistants à la lyse que les promastigotes procycliques non infectieux (Franke et *al.*, 1985; Puentes et *al.*, 1988). Ils résistent à l'attaque du complément en empêchant le recrutement du complexe C5-C9, qui lyse les microorganismes étrangers (Puentes et *al.*,

1990). Une autre fonction extracellulaire du LPG est de faciliter la fixation des *Leishmania* aux macrophages (Handman et al., 1985). Cette action est indirecte puisqu'elle requiert d'abord le captage de la protéine C3 du complément par le LPG (Puentes et al., 1989). L'opsonisation des promastigotes par C3 facilite par la suite les interactions avec les récepteurs à complément CR1 et CR3 situés à la surface des macrophages (Da Silva et al., 1989; Mosser et Edelson, 1985; Talamàs-Rohana et al., 1990; Wilson et Pearson; 1988). Le processus de phagocytose qui s'amorce lors de l'activation de ces récepteurs ne déclenche pas les cascades d'activations cellulaires qui contribuent à la destruction des microorganismes dans les phagosomes (Wright et Silverstein, 1983). Par conséquent, l'internalisation via ces récepteurs favorise la survie des promastigotes dans les macrophages. Les *Leishmania* peuvent aussi pénétrer dans les macrophages, indépendamment du LPG, par les récepteurs à mannose/fucose (Wilson et Pearson, 1986). Ces récepteurs servent aussi à l'internalisation d'autres parasites, comme les mycobactéries, sans déclencher les fonctions bactéricides des macrophages (Astarie-Dequeker et al., 1999).

À l'intérieur des phagosomes, les parasites sont exposés à un environnement où des enzymes hydrolytiques s'accumulent graduellement. Pour survivre, les *Leishmania* doivent donc s'adapter, soit en neutralisant l'action des enzymes dégradatives, soit en y résistant (Alexander et Vickerman, 1975; Chang et Dwyer, 1976). Une étude suggère que le LPG pourrait jouer un rôle dans l'inactivation des enzymes dégradatives

contenues dans les lysosomes (El-On et *al.*, 1980). En plus de protéger le parasite contre les enzymes dégradatives, le LPG pourrait servir de chélateur de calcium et autres cations divalents prévenant ainsi la production de radicaux hydroxyles toxiques lors de l'activation des macrophages (Eilam et *al.*, 1985; Homans et *al.*, 1992). Le LPG influence aussi la transduction des signaux chez les macrophages. Une étude a permis de démontrer que le LPG est un inhibiteur puissant de la protéine kinase C (PKC) (Descoteaux et *al.*, 1992). Cette kinase joue un rôle important dans la signalisation transmembranaire qui contrôle plusieurs fonctions cellulaires (revu dans Farago et Nishizuka, 1990; Houslay, 1991). Une de ces fonctions est le déclenchement de la flambée respiratoire chez les macrophages (revu dans Baggiolini et Wyman, 1990) qui mène à la production de radicaux oxygénés toxiques pour les *Leishmania* (Reiner et Kazura, 1982). Le mécanisme précis de l'inhibition de la PKC par le LPG est encore méconnu. Toutefois, on sait que le LPG n'empêche pas la translocation de cette kinase du cytosol vers la membrane plasmique (Descoteaux et *al.*, 1992). Le LPG semble plutôt agir sur la PKC en empêchant le changement de sa conformation nécessaire à son activation (Giorgione et *al.*, 1996). Les autres fonctions possibles du LPG incluent: le captage de radicaux toxiques avant qu'ils ne causent des dommages (Chan et *al.*, 1989), l'inhibition de la production de IL-1 (Frankenburg et *al.*, 1990), une cytokine importante pour l'activation des lymphocytes T (Unanue et Allen, 1987), l'inhibition du chimiotactisme (Frankenburg et *al.*, 1990) et la réduction de la capacité des macrophages à lier le TNF, une cytokine qui

joue un rôle dans l'activation des macrophages (revu dans Sherry et Cerami, 1988).

Tel que mentionné précédemment, une des fonctions probables du LPG, consiste à inhiber la fusion phagosome-endosome. Cette fonction du LPG a été mise en évidence en utilisant une approche biochimique et génétique. En effet, les mutants de *Leishmania donovani* LPG2⁻, qui expriment un LPG sans unité disaccharidique répétitive (Descoteaux et al., 1995), induisent la formation de phagosomes très fusogéniques comparativement aux phagosomes formés lors de l'internalisation de promastigotes de type sauvage (Desjardins et Descoteaux, 1997). L'étude de Desjardins et Descoteaux (1997) a aussi montré que l'opsonisation du mutant LPG2⁻ avec du LPG purifié permet à ce parasite d'induire la formation de phagosomes peu fusogéniques tel qu'observé chez la forme sauvage. Le nombre d'unités disaccharidiques répétitives du LPG semble être la clef d'une inhibition efficace de la fusion. En effet, le mutant RT5 de *L. donovani*, qui exprime seulement de 3 à 5 unités répétitives (McNeely et al., 1990), se retrouve dans des phagosomes dont le taux de fusion se situe entre ceux contenant la forme sauvage et le mutant LPG2⁻.

La polymérisation des unités disaccharidiques répétitives (PO₄-6Galβ1-4Man) se produit dans l'appareil de Golgi (Carver et Turco, 1991). Ce processus implique vraisemblablement l'addition séquentielle et en alternance de résidus mannose et galactose directement à la chaîne naissante du LPG à partir de précurseurs nucléotidiques (Carver et Turco,

1991). Le gène *lpg2* code pour un transporteur qui permet la translocation de résidus mannoses du cytoplasme vers l'appareil de Golgi (Ma et al., 1997). Chez le mutant LPG2-, où le gène *lpg2* n'est plus fonctionnel, l'absence de résidu mannose dans le Golgi ne permet donc pas la synthèse ni l'ajout des unités répétitives (PO₄-6Galβ1-4Man) à un ensemble de molécules incluant, en plus du LPG, la phosphatase acide et les phosphoglycans sécrétés (Ilg et al., 1994). L'utilisation du mutant LPG2- ne permet donc pas de déterminer directement laquelle de ces molécules est responsable de l'altération des propriétés de fusion des phagosomes. La figure 1 (section Figures et Légendes) indique l'endroit où la synthèse du LPG est affectée par la mutation au gène *lpg2*.

En plus de *lpg2*, un autre gène, le *lpg1*, contribue à la biosynthèse du LPG. Ce gène joue un rôle dans la synthèse du noyau hexasaccharidique présent exclusivement sur la molécule du LPG (voir figure 1). Les modifications du noyau hexasaccharidique chez le mutant LPG1- ne permet pas l'ajout des unités répétitives disaccharidiques à la molécules de LPG. Contrairement au *lpg2*, le gène *lpg1* n'affecte donc pas la synthèse des autres molécules qui possèdent des sous-unités disaccharidiques. Par conséquent, le mutant LPG1- devrait permettre de déterminer si d'autres molécules possédant des unités répétitives sont impliquées dans l'inhibition de la fusion des phagosomes avec les endosomes.

Dans le présent travail, nous avons utilisé deux espèces de *Leishmania* et plusieurs mutants afin de déterminer quelle partie de la

molécule du LPG est essentielle à l'inhibition de la fusion (**Fig. 1**). Nous avons employé *L. donovani*, qui synthétise un LPG de structure linéaire, et *L. major*, qui synthétise un LPG plus complexe comportant des chaînes oligosaccharidiques latérales. Nous avons aussi employé 3 mutants: LPG2-, un mutant de *L. donovani*, qui n'ajoute pas d'unité disaccharidique sur plusieurs molécules de surface en plus du LPG; LPG1-, un autre mutant de *L. donovani*, dont le LPG est la seule molécule qui ne possède pas d'unité disaccharidique; et Spock, un mutant de *L. major*, qui synthétise un LPG sans chaîne oligosaccharidique latérale (**Fig. 1**). Il est à noter que ce dernier mutant produit un LPG de structure semblable à celui de *L. donovani*. Par un essai de fusion intracellulaire en microscopie électronique basé sur le transfert de particules d'or des endosomes vers les phagosomes, le niveau de fusion de phagosomes contenant les différentes populations de *Leishmania* a été évalué. Les résultats obtenus montrent que les sous-unités disaccharidiques répétitives attachées au LPG, mais pas à d'autres molécules de surface, sont essentielles à l'inhibition de la fusion. De plus, l'inhibition de la fusion induite par le LPG est plus efficace envers les endosomes tardifs qu'envers les endosomes précoces. Ces résultats suggèrent que les promastigotes de *Leishmania* survivent dans les macrophages en inhibant la fusion avec des compartiments contenant des enzymes hydrolytiques. Finalement, le LPG ne semble pas suffisant à l'inhibition de la fusion puisque des parasites morts avant leur internalisation qui possèdent toujours du LPG n'inhibent pas la fusion. Cependant, s'ils sont tués après leur internalisation dans les phagosomes, ces derniers demeurent peu fusogéniques, ce qui suggère que les

propriétés de fusion des phagosomes sont déterminées par un processus actif, peu de temps après l'internalisation des parasites.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Culture cellulaire

Les macrophages de la lignée cellulaire murine J774 ont été cultivés dans du DMEM (Gibco/Life Technologies) auquel 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté à la chaleur, 1% de glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine ont été ajoutés. Les cellules ont été conservées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, jusqu'à une confluence d'environ 80 à 100%. Les cellules n'ont pas été gardées plus de 15 passages en culture après la décongélation. Les promastigotes de *Leishmania donovani* de type sauvage et les mutants LPG2- et LPG1- de la souche soudanaise 1S ont été cultivés à 26 °C dans du RPMI 1640 (Gibco/Life Technologies) contenant 20% de SVF caractérisé (Hyclone), 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 0,1 mM d'adénine, 20 mM de MES, 0,0005% d'hème dans 50% triéthanolamine, 1µg/ml de 6-bioptérine et 0,0001% de biotine dans 95% d'éthanol, le tout tamponné à pH 5,5 avec du HCl. Les promastigotes de *Leishmania major* VI et le mutant Spock ont été cultivés dans le même milieu sans MES, mais contenant seulement 10% de SVF et 10 mM d'Hepes, le tout tamponné à pH 7,3 avec du NaOH. Toutes les souches de *Leishmania* ont été cultivées jusqu'à la phase stationnaire avant chaque expérience, et le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais la veille des expériences.

Essai de fusion intracellulaire entre des phagosomes contenant des *Leishmania* et des endosomes contenant de l'albumine-or

Pour évaluer le niveau de fusion entre les phagosomes contenant des *Leishmania* et les endosomes, un essai de fusion intracellulaire en microscopie électronique a été utilisé. Pour ce faire, deux jours avant les expériences, nous avons permis l'adhérence des cellules J774 dans des pétris de 35 mm de diamètre traités pour la culture cellulaire (Falcon 3001), afin d'atteindre une confluence d'environ 80-100% (environ 2×10^6 cellules/pétri).

Formation des phagosomes

Les macrophages ont été infectés avec des *Leishmania* en phase stationnaire de croissance (au quatrième jour de culture), pendant 60 minutes à 37 °C. L'infection a été effectuée avec un ratio de 10 parasites pour 1 macrophage pour tous les parasites utilisés à l'exception des mutants LPG1- et LPG2-, où un ratio de 5 pour 1 suffit pour obtenir le même nombre de phagosomes. Après l'internalisation, les cellules ont été lavées avec du PBS froid sur glace pour éliminer les parasites non internalisés. Les cellules ont ensuite été incubées 60 minutes dans du milieu de culture à 37 °C pour permettre l'internalisation complète des parasites attachés aux cellules.

Formation des endosomes chargés d'or

Pour charger les endosomes, les cellules infectées ont été incubées 30 minutes à 37 °C dans du DMEM contenant des particules d'or colloïdal de 16 nm de diamètre opsonisées avec de l'albumine sérique bovine (BSA). Par la suite, les cellules ont été lavées avec du PBS froid 3 fois 5 minutes sur glace et incubées à nouveau 30 minutes dans du milieu de culture à 37 °C pour permettre l'interaction des endosomes chargés d'or avec les phagosomes contenant les *Leishmania*. À la fin de cette étape, les cellules ont été préparées pour la microscopie électronique. Pour ce faire, elles ont été fixées 1 heure à 4 °C dans un tampon cacodylate 1M à pH 7,4 contenant 2% de glutaraldehyde, lavées 3 fois 3 minutes dans le tampon cacodylate et post-fixées au tétr oxyde d'osmium 1% dans le tampon cacodylate 1 heure à 4 °C. Ensuite, les cellules ont été déshydratées séquentiellement avec de l'éthanol 30, 50, 70 et 95% 3 minutes chaque fois et à l'éthanol 100% 3 fois 5 minutes. Les cellules ont ensuite été imprégnées dans un mélange d'Epon 812 et d'éthanol (1:1) une heure à la température de la pièce et laissées toute la nuit dans un mélange d'Epon pur. Le lendemain, l'Epon a été échangé par un mélange d'Epon frais contenant le catalyseur qui permet la polymérisation, qui se fait pendant 3 jours dans un four à 60 °C. Des coupes ultra-minces des cellules ont été effectuées à l'ultramicrotome et déposées sur des grilles de nickel. Ces coupes ont par la suite été colorées à l'acétate d'uranyle 3% dans de l'eau bidistillée pendant 10 minutes et au citrate de plomb pendant 7 minutes avant d'être observées au microscope électronique Zeiss 902. Le niveau de fusion des phagosomes a

été évalué selon la présence ou non de particules d'or à l'intérieur des phagosomes. La présence d'une seule particule d'or suffisait pour considérer qu'il y avait eu fusion. Pour chaque condition testée, au moins 100 phagosomes ont été comptés sur des coupes non sériées. Chaque expérience a été exécutée un minimum de 3 fois.

Essai de fusion intracellulaire en microscopie électronique avec les *Leishmania* dans leur forme amastigote

Pour évaluer le rôle du LPG et du flagelle dans l'inhibition de la fusion chez les parasites dans leur forme amastigote, l'essai de fusion a été fait sur des amastigotes extraits de hamsters infectés, qui n'expriment pas de LPG, et sur des amastigotes différenciés en culture, qui expriment toujours du LPG à leur surface.

Production d'amastigotes *in vitro* (ALFs)

Les ALFs ont été produits en incubant les promastigotes en fin de phase exponentielle ou en début de phase stationnaire (au troisième jour de culture) dans leur milieu de culture à 37 °C pendant au moins 36 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. La disparition du flagelle servait de critère pour signaler la transformation en ALFs. Les essais de fusion intracellulaire ont été exécutés tel que décrit plus haut.

Production d'amastigotes *in vivo*

Les amastigotes *in vivo* ont été générés en infectant des hamsters par une injection intrapéritonéale de 1 ml de milieu de culture contenant 1×10^7 promastigotes ou amastigotes de *Leishmania* fraîchement décongelés. Les animaux ont été sacrifiés par asphyxie au CO_2 dès qu'ils ont présenté des signes évidents de maladie (après 1 ou 2 mois), et la rate a été recueillie dans du milieu de culture à *Leishmania*, coupée en petits morceaux et homogénéisée. L'homogénat a ensuite été centrifugé 5 minutes à 800 rpm à 4 °C pour se débarrasser des débris cellulaires de la rate. Cette étape a été répétée 3 fois pour enlever le plus de débris possible. Par la suite, les amastigotes ont été récoltés par une centrifugation de 10 minutes à 2800 rpm. Le culot a été resuspendu dans environ 7 ml de NH_4Cl 0,17 M froid et laissé reposer 10 minutes sur glace afin de lyser les globules rouges. Ce mélange a ensuite été dilué dans le même volume de milieu de culture puis centrifugé 5 minutes à 800 rpm afin d'enlever les débris cellulaires. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 2800 rpm pour générer un culot d'amastigotes, qui ont été resuspendus dans 10 ml de milieu de culture à *Leishmania*. La culture a ensuite été filtrée séquentiellement à l'aide de filtres contenant des pores de 8 μm et de 5 μm . Après l'extraction, les parasites ont immédiatement été utilisés pour l'infection des macrophages en culture afin d'éviter leur différenciation en promastigotes.

Essai de fusion avec des *Leishmania* tués avant leur internalisation dans les cellules

Pour déterminer si la viabilité des parasites est essentielle à l'inhibition de la fusion entre les phagosomes et les endosomes, le niveau de fusion des phagosomes formés à partir de l'internalisation de parasites morts et vivants a été évalué. Les *Leishmania* ont été tués par une incubation de 20 minutes dans du DMEM complet à 45 °C avant l'internalisation dans les macrophages. L'immobilité du flagelle a servi de critère pour évaluer la mortalité des *Leishmania*. Puisque les parasites morts sont rapidement dégradés à l'intérieur des phagosomes, l'essai de fusion a été modifié afin de permettre aux parasites morts de résider le plus brièvement possible dans les macrophages. Pour ce faire, le chargement des endosomes avec la BSA-or a été effectué en premier par une incubation de 30 minutes et une chasse de 2 heures. Les *Leishmania* ont ensuite été internalisés pendant 60 minutes. Les cellules ont été préparées directement pour la microscopie électronique tel que décrit plus haut.

Essai de fusion avec des *Leishmania* tués après leur internalisation dans les cellules

Puisque nos résultats indiquent que les parasites tués avant leur internalisation dans les cellules induisent la formation de phagosomes très fusogéniques, contrairement aux vivants, nous avons vérifié si le fait de tuer les parasites après leur internalisation faisait en sorte que les phagosomes se remettent à fusionner avec les endosomes. Pour ce faire, les endosomes ont été chargés de BSA-or par une incubation de 30 minutes puis chassés

120 minutes. Par la suite, les *Leishmania* ont été internalisés 60 minutes, puis chassés 30 minutes. Les *Leishmania* ont ensuite été tués dans les cellules par une incubation de 10 minutes avec du DMEM contenant 10^{-5} M de violet de cristal, un transporteur d'électrons toxique pour les *Leishmania*, mais sans effet apparent sur les macrophages (Mauel, 1984). Les cellules ont ensuite été lavées du produit par 3 lavages de 2 minutes dans du PBS froid puis incubées 2 heures pour permettre l'action du violet de cristal sur les *Leishmania* et les interactions entre les phagosomes et les endosomes. Comme contrôle, toutes ces étapes ont été répétées en employant des billes de latex plutôt que des *Leishmania*.

Essai de survie avec des *Leishmania* dans des cellules traitées avec du violet de cristal

Pour vérifier si le violet de cristal est efficace à tuer les *Leishmania* dans les cellules, un essai de survie avec des *Leishmania* qui expriment un gène rapporteur codant pour l'enzyme luciférase a été effectué (St-Denis et al., soumis). Puisque cette enzyme n'est synthétisée que par les parasites vivants, la mesure de son activité permet d'établir une corrélation entre la quantité de lumière émise lors de la réaction avec le substrat et la quantité de *Leishmania* vivants. Pour faire cet essai, 125 000 J774 ont été mises en culture dans des puits de 1,5 cm de diamètre (Falcon 3047). Durant une période de quinze heures, les cellules se sont collées et multipliées jusqu'à un nombre moyen de 200 000/puits. Ensuite, les *Leishmania*, exprimant la luciférase, ont été internalisés 60 minutes dans les cellules avec un ratio parasites/cellule de 10 pour 1. Par la suite les cellules ont été lavées dans

du PBS froid pour enlever les *Leishmania* non internalisés, puis incubées 60 minutes à 37 °C pour permettre l'internalisation de tous les *Leishmania*. Les cellules ont ensuite été incubées 10 minutes à 37 °C dans du milieu contenant 10^{-5} M de violet de cristal. Après 3 lavages de 2 minutes au PBS, le transporteur d'électrons a été chassé 0, 30 et 60 minutes pour lui permettre de tuer les *Leishmania*. Après ces temps de chasse, le milieu a été enlevé, les cellules lysées, et le lysat lu au luminomètre selon la méthode du Luciferase Assay System (Promega E1500).

Essai de fusion en microscopie électronique entre des phagosomes contenant des *Leishmania* et différentes populations d'endosomes

Pour étudier la fusion des phagosomes contenant des *Leishmania* avec différentes populations d'endosomes, l'or a été internalisé 30 minutes et chassé 15 minutes, 2 et 15 heures pour obtenir respectivement des endosomes précoces, tardifs et des lysosomes. Après cette étape, les *Leishmania* ont été internalisés pendant 60 minutes et chassés 60 minutes ou 4 heures. Par la suite, les échantillons ont été traités pour la microscopie électronique, tel que décrit plus haut.

Détection du LPG de surface par immunofluorescence

Pour évaluer la présence du LPG à la surface des différentes populations de *Leishmania*, 10 μ l de milieu de culture contenant des *Leishmania* ont été déposés sur des lamelles et fixés avec du méthanol

20%/acétone 80% 20 minutes à -20°C . Les *Leishmania* ont été lavés et réhydratés dans du PBS 2x5 minutes et 2x10 minutes, puis bloqués 10 minutes dans du PBS contenant 2% de BSA fraction V (Sigma) et 0,2 % de gélatine. Par la suite, les lamelles ont été incubées 60 minutes avec l'anticorps monoclonal de souris CA7AE (dilution 1:1000 dans la solution de blocage), qui reconnaît les unités répétitives disaccharidiques (Tolson et *al.*, 1989). Les lamelles ont ensuite été lavées 3 fois 2 minutes dans du PBS 1% BSA et incubées 30 minutes avec un anticorps de chèvre anti-IgM de souris (dilution 1:250 dans la solution de lavage) couplé au Texas-Red. Les lamelles ont par la suite été lavées 3 fois 2 minutes dans du PBS 1% BSA et une fois dans du PBS, pour ensuite être montées sur lame et observées au microscope à fluorescence.

RÉSULTATS

Les agents pathogènes intracellulaires ont développé diverses stratégies afin de survivre dans leurs cellules hôtes. Dans plusieurs cas, une des caractéristiques de ces stratégies consiste en l'inhibition de la biogenèse des phagolysosomes afin d'éviter l'importation de molécules toxiques vers le phagosome. Notre laboratoire a déjà fourni plusieurs indications qui suggèrent que l'inhibition de la fusion phagosome-endosome joue un rôle dans la survie des promastigotes de *Leishmania donovani* peu de temps après leur entrée dans les macrophages. Les résultats ont montré que les unités disaccharidiques répétitives phosphorylées du lipophosphoglycan, la principale molécule de surface de *Leishmania*, sont possiblement impliquées dans le processus d'inhibition de fusion (Desjardins et Descoteaux, 1997). Dans la présente étude, nous avons utilisé plusieurs mutants de *Leishmania donovani*, incapables à synthétiser normalement le LPG, et la souche *L. major*, qui synthétise un LPG de structure plus complexe, afin d'étudier plus en détail le rôle du LPG dans l'inhibition de la fusion phagosome-endosome.

Les propriétés de fusion des phagosomes ont été évaluées en utilisant un essai de fusion intracellulaire qui mesure, en microscopie électronique, le transfert de la BSA-or des endosomes vers les phagosomes. Les avantages de ce système sont d'être sensible et de permettre une évaluation quantitative. Nous avons tout d'abord mesuré les

propriétés de fusion de phagosomes contenant les deux espèces de *Leishmania*. En plus de *L. donovani*, nous avons choisi *L. major*, parce que ce parasite produit un LPG comportant plus d'unités disaccharidiques répétitives que celui de *L. donovani*, auxquelles des chaînes oligosaccharidiques latérales sont attachées à la position 3 du résidu galactose. L'observation en microscopie électronique montre que dans la plupart des cas, il y a absence de particule d'or à l'intérieur des phagosomes contenant les *L. major*, et ce, malgré la présence d'endosomes chargés d'or qui gravitent autour des phagosomes (**fig. 2**). Les résultats quantitatifs des essais de fusion confirment que *L. major*, aussi bien que *L. donovani*, induit la formation de phagosomes qui fusionnent peu avec les endosomes chargés d'or. Ces deux types de phagosomes ont des propriétés de fusion similaires (**fig. 3**) et sont beaucoup moins fusogéniques que des phagosomes contenant des billes de latex (Desjardins et Descoteaux, 1997). Nous avons aussi quantifié le nombre de particules de BSA-or présentes dans les phagosomes. Cette quantification a généré une distribution similaire pour chaque type de *Leishmania* (**fig. 4**). Ces résultats indiquent que des *Leishmania* de différentes espèces, qui expriment des LPG de structure différente, sont capables d'inhiber la fusion phagosome-endosome à des niveaux similaires.

Par la suite, nous avons déterminé si les chaînes oligosaccharidiques latérales du LPG de *L. major* jouent un rôle dans l'altération des propriétés fusogéniques des phagosomes. Pour ce faire, nous avons comparé le niveau de fusion de phagosomes contenant le *L. major* de type sauvage et

le mutant Spock, qui n'exprime pas de chaîne latérale. L'observation au microscope électronique montre que les phagosomes contenant le mutant Spock, tout comme ceux contenant le *L. major* de type sauvage, fusionnent peu avec des endosomes chargés d'or (**fig. 2**) Les résultats quantitatifs obtenus montrent que le niveau de fusion des phagosomes contenant le mutant Spock est similaire à celui des phagosomes contenant le *L. major* de type sauvage. Ainsi, il est peu probable que les chaînes oligosaccharidiques latérales jouent un rôle important dans l'inhibition de la fusion phagosome-endosome.

Après avoir déterminé que les chaînes oligosaccharidiques latérales ne participent pas à l'inhibition de la fusion, nous avons étudié plus précisément le rôle des unités disaccharidiques répétitives du LPG. Une étude précédente faite au laboratoire (Desjardins et Descoteaux, 1997) a démontré que les unités répétitives, possiblement celles présentes sur le LPG, jouent un rôle dans l'inhibition de la fusion phagosome-endosome. En effet, cette étude a démontré que les phagosomes contenant le mutant LPG2⁻ de *L. donovani* fusionnent beaucoup plus avec les organites endocytaires que les phagosomes contenant le *L. donovani* de type sauvage. Le gène *lpg2* code pour une protéine localisée dans la membrane de l'appareil de Golgi et impliquée dans le transport de résidus mannoses du cytoplasme vers la lumière du Golgi (Ma et al., 1997). Chez les mutants LPG2⁻, cette protéine est incapable de transporter les résidus mannoses vers le Golgi, lieu de synthèse du LPG, ce qui résulte en une altération de la biosynthèse des unités disaccharidiques répétitives qui

comprennent un résidu mannose. Les mutants LPG2- produisent donc un LPG de surface qui ne contient aucune unité répétitive. Toutefois, le LPG n'est pas la seule molécule affectée par la mutation au gène *lpg2*. En effet, des unités disaccharidiques sont aussi présentes chez d'autres macromolécules du parasite comme la phosphatase acide et les phosphoglycans sécrétés (Ilg et al., 1994). Il est donc possible que ces molécules participent aussi à l'inhibition de la fusion des phagosomes dans la cellule hôte. Afin de démontrer que le LPG est bel et bien la molécule qui joue un rôle dans l'inhibition de la fusion phagosome-endosome, nous avons utilisé un mutant de *L. donovani* muté au gène *lpg1* (Privé et al., soumis). Ce gène code pour une galactofuranosyl transférase essentielle à la synthèse du noyau de la molécule du LPG (Huang et Turco, 1993). Chez ce mutant, les unités disaccharidiques répétitives ne peuvent être ajoutées à un noyau incomplet. Par conséquent, une forme tronquée de LPG semblable à celle exprimée par le mutant LPG2- se retrouve à la surface des parasites. Précisons à nouveau que, contrairement au mutant LPG2-, les autres protéines contenant des unités disaccharidiques répétitives ne sont pas affectées chez le mutant LPG1-.

Un immunomarquage avec l'anticorps CA7AE, qui reconnaît les unités répétitives phosphorylées du LPG, révèle que le LPG couvre toute la surface des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage (**fig. 5**). On constate aussi l'absence de signal chez les mutants LPG2- qui ne produisent pas d'unité répétitive, alors que le mutant LPG1- est marqué d'une manière pointillée. Ce résultat indique que, malgré l'absence d'unité

disaccharidique sur le LPG de ce mutant, d'autres molécules qui ne recouvrent pas entièrement sa surface en contiennent toujours. Ces résultats démontrent que l'utilisation des mutants LPG2- et LPG1- s'avère être un bon système pour déterminer avec exactitude si le LPG est responsable de l'inhibition de la fusion des phagosomes ou si d'autres molécules des parasites contenant des sous-unités répétitives sont impliquées.

L'observation au microscope électronique montre que, généralement, les phagosomes contenant les promastigotes de *L. donovani* de type sauvage fusionnent peu avec des endosomes chargés d'or (**fig. 6**). Par contre, les phagosomes contenant les mutants LPG1- et LPG2-, contiennent de nombreuses particules d'or provenant de la fusion avec des endosomes. Les résultats quantitatifs des essais de fusion nous révèlent que les phagosomes contenant les mutants LPG2- ou LPG1- ont un taux de fusion beaucoup plus élevé avec les endosomes chargés d'or que les phagosomes contenant le *L. donovani* de type sauvage (**fig. 3B**). Tous ces résultats démontrent clairement que le LPG est la molécule principale contenant des unités répétitives impliquée dans la modification des propriétés de fusion des phagosomes. Les autres molécules qui possèdent des unités répétitives, toujours présentes chez LPG1-, ne semblent pas avoir d'effet sur l'inhibition de la fusion .

Contrairement à nos résultats qui indiquent que les promastigotes de *Leishmania* résident dans des phagosomes qui sont peu fusogéniques

envers les endosomes, plusieurs groupes ont déjà montré que les amastigotes de *Leishmania* résident dans des compartiments très fusogéniques qui possèdent certaines caractéristiques des phagolysosomes (Antoine et *al.*, 1990; Prina et *al.*, 1990; Russell et *al.*, 1992; Lang et *al.*, 1994). Cette différence est possiblement attribuable au fait que les promastigotes possèdent du LPG à leur surface alors que cette molécule est absente chez l'amastigote. En effet, lors de la transformation des promastigotes en amastigotes dans les phagosomes de macrophages, le parasite modifie sa morphologie (perte du flagelle) et perd son LPG (McConville et Blackwell, 1991). Afin d'étudier l'implication de cette perte du LPG de surface ou du flagelle dans la restauration de la fusogénicité des phagosomes, nous avons évalué les propriétés de fusion de phagosomes contenant des amastigotes fraîchement extraits de rate de hamsters infectés ou des amastigotes différenciés *in vitro*, aussi appelés ALF (amastigote-like form). Cette forme *in vitro* d'amastigote ressemble morphologiquement à son homologue *in vivo* par l'absence du flagelle. Cependant, il exprime toujours du LPG à sa surface.

Effectivement, l'immunomarquage en fluorescence montre que les amastigotes extraits de hamsters infectés n'expriment pas de LPG à des niveaux détectables, alors que les ALFs expriment toujours le LPG à leur surface malgré l'absence du flagelle (**fig. 5**). L'observation au microscope électronique montre que la plupart des phagosomes contenant des amastigotes sans LPG contiennent de nombreuses particules d'or provenant des endosomes, alors que les phagosomes contenant des ALFs

fusionnent peu avec les endosomes chargés d'or (**fig. 7**). Les résultats quantitatifs des essais de fusion montrent que les phagosomes contenant les amastigotes fusionnent beaucoup plus que les phagosomes contenant les ALFs (**fig. 3 C**). De plus, les phagosomes contenant des ALFs, ont un niveau de fusion comparable à celui des phagosomes contenant des promastigotes. Encore une fois, ces résultats confirment l'implication du LPG dans l'inhibition de la fusion des phagosomes. Ils suggèrent aussi que la perte du LPG lors de la transformation des promastigotes en amastigotes doit s'accompagner de la levée de l'inhibition de fusion, ce qui explique pourquoi les amastigotes sont observés dans les phagolysosomes par de nombreux groupes.

Plusieurs études ont déjà montré que divers parasites inhibent la fusion phagosome-endosome afin de survivre à l'intérieur des macrophages (revue dans Sinai et Joiner, 1997). Par contre, lorsque ces microorganismes sont tués avant leur internalisation, les phagosomes formés fusionnent alors normalement avec les endosomes et se transforment en phagolysosomes. Ces résultats suggèrent que ces pathogènes arrivent à contrôler la maturation des phagosomes par un processus actif auquel la viabilité est essentielle. Afin de déterminer si l'inhibition de la fusion phagosome-endosome par les promastigotes de *Leishmania* est un processus actif, nous avons comparé le taux de fusion de phagosomes formés par l'internalisation de parasites vivants et par l'internalisation de parasites tués à la chaleur. Les résultats quantitatifs montrent que les phagosomes formés par les parasites morts fusionnent

environ deux fois plus que les phagosomes formés par les parasites vivants (**fig. 8A**). Pour éliminer la possibilité que les parasites tués à la chaleur puissent perdre leur LPG sous l'action de la chaleur, nous avons fait un immunomarquage du LPG sur les parasites vivants et morts. Les résultats montrent que les parasites morts aussi bien que les vivants, expriment du LPG à leur surface (**fig. 5**). À la suite de ces résultats, nous avons évalué si le fait de tuer les parasites après leur internalisation dans les phagosomes a des conséquences sur les propriétés fusogéniques de ces organites. Les résultats quantitatifs montrent que tuer les *Leishmania* avec le transporteur d'électron violet de cristal, une fois qu'ils sont à l'intérieur de phagosomes, n'a pas d'effet sur le taux de fusion de ces compartiments (**fig. 8B**). Ce résultat suggère que le destin intracellulaire des phagosomes contenant les *Leishmania* est déterminé au moment de l'entrée des parasites dans les cellules ou très tôt après l'internalisation des parasites.

Nous avons choisi le violet de cristal, puisqu'il semble efficace à tuer les parasites dans leur compartiment intracellulaire sans altérer la morphologie des cellules (Mauel, 1984). Toutefois, afin de s'assurer de son efficacité nous avons fait des essais de survie avec des *Leishmania* transfectés avec la luciférase. La luciférase, produite seulement par des parasites vivants, nous permet d'établir une corrélation entre la survie des *Leishmania* et la quantité de lumière émise lors de la réaction entre l'enzyme et son substrat. Les résultats de l'essai de survie montrent que le violet de cristal tue les *Leishmania* d'une façon dose-dépendante et temps-dépendante (**fig. 9**). La concentration de 10^{-5} M a été retenue pour nos

expériences, car nous avons déterminé, en microscopie électronique, que les concentrations supérieures altèrent morphologiquement les cellules (présence de grosses vacuoles, membranes moins bien définies), ce qui peut altérer les fonctions cellulaires ou rendre difficiles les comptages en microscopie électronique.

Des études ont montré que la biogenèse des phagolysosomes se produit lors d'une série d'interactions entre les phagosomes et différents compartiments endocytaires (Desjardins et *al.*, 1994a, 1997). En effet, les phagosomes nouvellement formés fusionnent séquentiellement avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes. Cette série d'événements de fusion permet la maturation des phagosomes vers les phagolysosomes (Desjardins, 1995; Desjardins et *al.*, 1997). Si la stratégie de survie des *Leishmania* consiste à éviter de se retrouver dans l'environnement hostile des phagolysosomes enrichis d'hydrolases, il est probable que ces parasites inhibent préférentiellement la fusion entre les phagosomes et les organites endocytaires tardifs contenant ces enzymes, plutôt qu'avec les endosomes précoces. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué le niveau de fusion entre les phagosomes contenant les mutants et le *Leishmania* de type sauvage et différentes populations d'organites endocytaires de plus en plus tardives. Pour ce faire, nous avons chargé les endosomes de particules de BSA-or en augmentant le temps de chasse de l'or, afin de former des endosomes précoces, tardifs et finalement des lysosomes. Ensuite, nous avons infecté les cellules avec les promastigotes de type sauvage et les mutants LPG2- et LPG1-. Les

résultats quantitatifs du transfert de l'or des différents endosomes vers les phagosomes montrent que les phagosomes contenant les mutants fusionnent 30% plus avec les endosomes précoces que les phagosomes contenant le parasite de type sauvage (**fig. 10A**). Cette différence est beaucoup plus importante si les phagosomes interagissent avec des endosomes tardifs ou des lysosomes. En effet, les phagosomes contenant les mutants fusionnent environ 100% plus avec les endosomes tardifs âgés de deux heures que les phagosomes contenant le parasite du type sauvage. De plus, la différence de fusion est beaucoup plus prononcée lorsque les phagosomes interagissent avec des lysosomes de 15 heures et peut s'élever jusqu'à près de 200%. Les différences entre les phagosomes contenant les mutants et ceux contenant le type sauvage persistent même si les parasites sont chassés pendant 4 heures (**fig. 10B**). Ces résultats démontrent que *L. donovani* a développé une stratégie de survie qui consiste à inhiber d'une façon persistante la fusion du compartiment où il réside avec les endosomes plus tardifs enrichis en enzymes dégradatives.

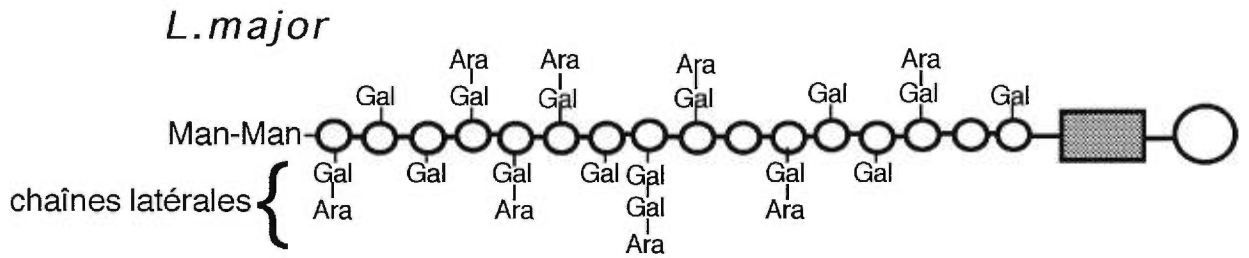
FIGURES ET LÉGENDES

Figure 1

Schéma de la molécule du lipophosphoglycan chez *L. major*. et *L. donovani*.

Cette figure décrit de façon schématique la structure du LPG chez les deux espèces de *Leishmania* étudiées *L. major* et *L. donovani* ainsi que chez le mutant de *L. major*, Spock, et deux mutants de *L. donovani*, LPG2⁻ et LPG1⁻. En bas, des flèches indiquent les étapes où les mutations aux gènes *lpg2* et *lpg1* affectent la synthèse de la molécule du LPG.

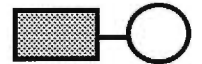
Structure du Lipophosphoglycan



L. donovani
L. major Spock



LPG2-



LPG1-

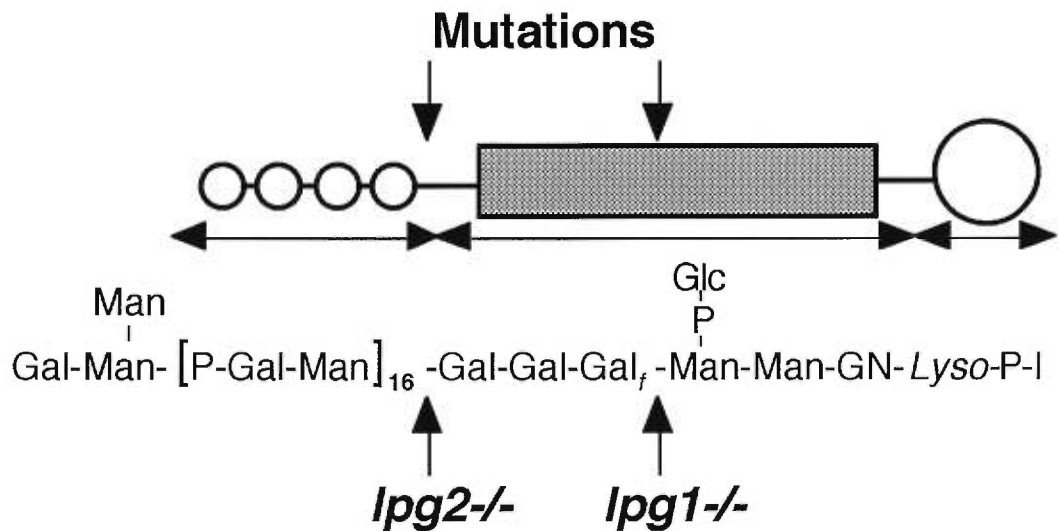
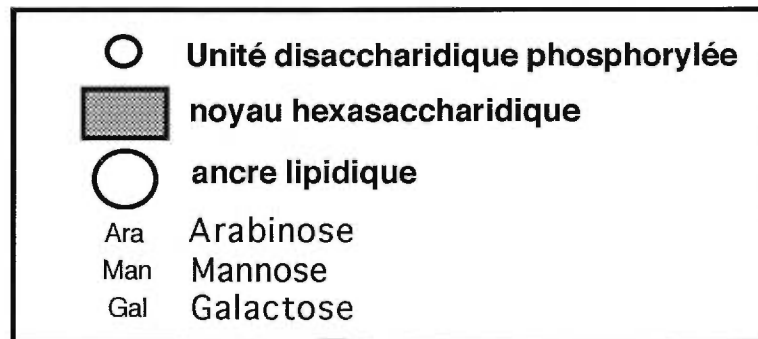


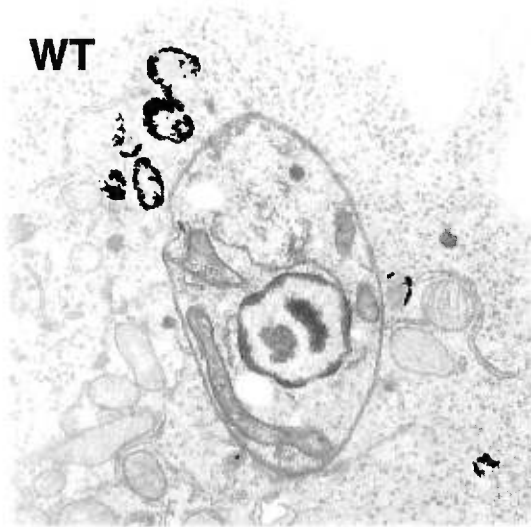
Figure 2

Micrographie illustrant les propriétés de fusion de phagosomes contenant le parasite *L. major* ou le mutant Spock.

La photo du haut montre un phagosome contenant un promastigote de *L. major*. L'absence de particule d'or à l'intérieur du phagosome montre qu'il n'y a pas eu fusion avec les endosomes chargés d'or qui se trouvent en périphérie. (7000X).

La photo du bas montre des phagosomes contenant le mutant Spock de *L. major*, qui ne synthétise pas de chaîne oligosaccharidique latérale (**Fig. 1**). Chez ces phagosomes, il y a absence de particule d'or à l'intérieur dans la lumière, indiquant que les chaînes latérales ne participent pas de façon significative à l'inhibition de fusion (7000X).

WT



Spock

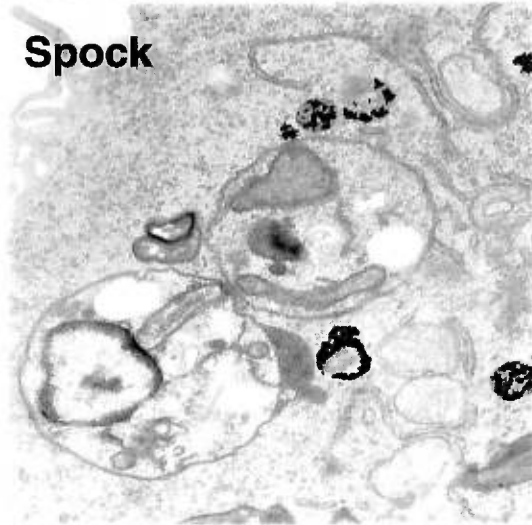


Figure 3

Analyses quantitatives des essais de fusion intracellulaire en microscopie électronique décrivant les propriétés fusogéniques de phagosomes contenant différentes populations de *Leishmania*.

Les *Leishmania* ont été internalisés 60 minutes, puis chassés 60 minutes. Par la suite, l'albumine-or a été internalisée 30 minutes, puis chassée 30 minutes. Au microscope électronique, les événements de fusion ont été quantifiés. La présence d'une particule d'or à l'intérieur d'un phagosome suffit pour considérer qu'il y a eu fusion entre le phagosome et un endosome.

Afin de faciliter la compréhension des résultats, toutes les données sont représentées en "Index de fusion". Dans cet index, le nombre 100 a été arbitrairement attribué à la valeur de fusion (le pourcentage de phagosomes contenant de l'or), obtenue pour les phagosomes contenant des *L. donovani* de type sauvage. Les valeurs de fusion obtenues pour les autres *Leishmania*, en pourcentage, ont été ajustées en respectant les proportions. Pour chaque échantillon, 100 phagosomes par coupe choisie au hasard ont été comptés sur un minimum de 3 coupes non sériées.

A) Comparaison du niveau de fusion entre les phagosomes contenant *L. donovani* et *L. major*. Les phagosomes contenant *L. major* et le mutant Spock sans chaîne latérale ont le même taux de fusion et fusionnent 25% moins que les phagosomes contenant *L. donovani* de type sauvage, une différence qui n'est pas significative (Test Anova $p=0,15$).

B) Comparaison du niveau de fusion entre les phagosomes contenant le *L. donovani* de type sauvage et ceux contenant les mutants LPG1- et LPG2-. Les phagosomes contenant les mutants, qui ne synthétisent pas les unités disaccharidiques répétitives du LPG, sont environ 60% plus fusogéniques que les phagosomes contenant *L. donovani* de type sauvage. Les différences entre les mutants LPG1-, LPG2- et le type sauvage sont significatives (Test Anova: $p=0,0009$; Test de t post-hoc: $p=0,002$ et $p=0,005$ respectivement).

C) Comparaison du niveau de fusion entre les phagosomes contenant les promastigotes de *L. donovani*, les amastigotes générés in vitro (ALF) et les amastigotes in vivo. Les phagosomes contenant les ALFs, qui synthétisent toujours du LPG, ont le même taux de fusion que les phagosomes contenant les promastigotes. Par contre, les phagosomes contenant les vrais amastigotes, qui ne synthétisent pas de LPG fusionnent 60% plus que les phagosomes contenant les promastigotes (Test Anova: $p=0,0007$; Test de t post-hoc entre promastigotes et amastigotes: $p=0,0006$).

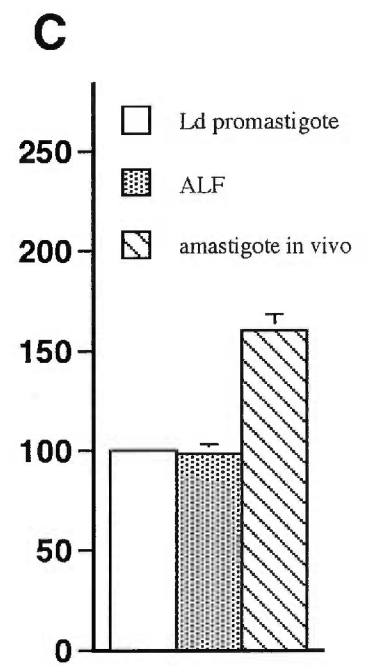
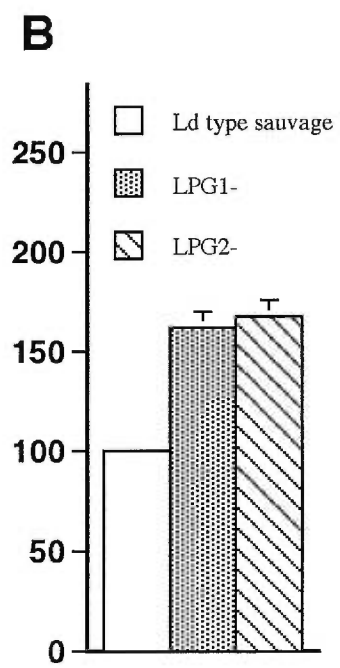
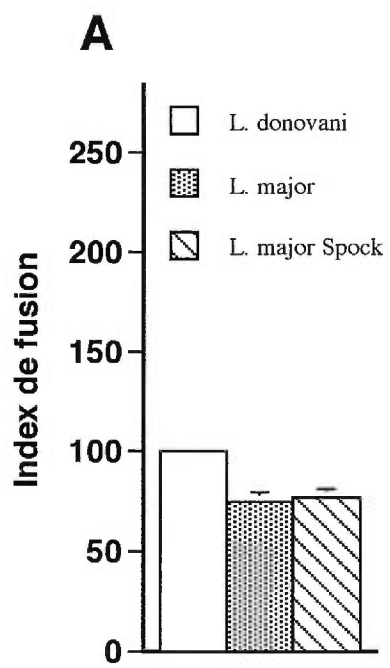


Figure 4

Quantification de l'albumine-or présente dans les phagosomes contenant *L. donovani* et *L. major*.

Le nombre de particules d'or présentes dans 25 phagosomes a été compté pour chaque type de *Leishmania*. Les phagosomes sont répartis selon qu'ils contiennent 0, 1-50 ou 51 et + particules d'or. La distribution de l'or chez les phagosomes contenant les promastigotes de *L. donovani*, *L. major* et *L. major* Spock est semblable.

Quantification de l'or dans les phagosomes

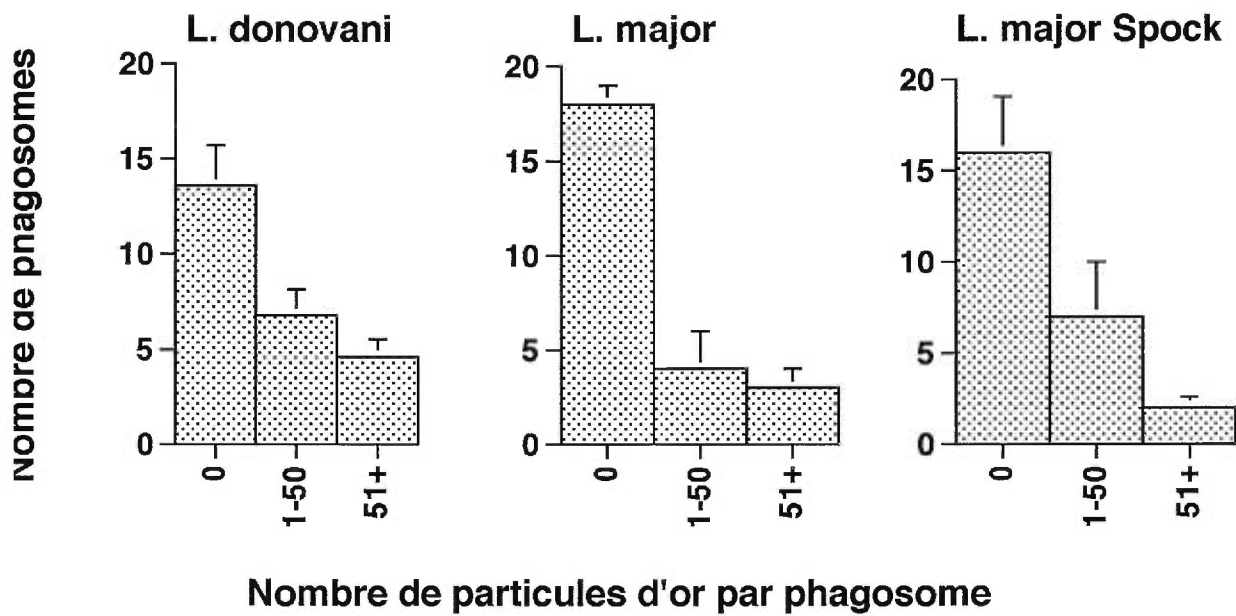


Figure 5

Immunomarquage en fluorescence du LPG à la surface des *Leishmania*.

Les *Leishmania* ont été déposés sur des lamelles et fixés avec du méthanol 20%/acétone 80%. Ils ont ensuite été réhydratés dans du PBS, puis bloqués dans du PBS contenant 2% de BSA fraction V (Sigma) et 0,2 % de gélatine. Par la suite, les *Leishmania* ont été incubés avec l'anticorps monoclonal de souris CA7AE, qui reconnaît les unités répétitives disaccharidiques, puis incubés avec un anticorps de chèvre anti-IgM de souris couplé au Texas-Red. Les lamelles ont ensuite été montées sur lame et observées au microscope à fluorescence.

- wt pro: Le marquage avec l'anticorps CA7AE dirigé contre les unités disaccharidiques phosphorylées répétitives est uniforme et réparti partout à la surface des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage.
- wt killed: Les promastigotes tués expriment toujours du LPG à leur surface. L'intensité de marquage est similaire à l'intensité obtenue dans le cas des vivants représentés à gauche.
- LPG1-: Chez ce mutant, le marquage est pointillé plutôt qu'uniforme. Ce mutant n'exprime pas d'unité répétitive sur le LPG. Toutefois, il en exprime sur d'autres molécules de surface moins abondantes que le LPG, ce qui pourrait expliquer le marquage discontinu.
- wt Alf: Contrairement aux promastigotes, les ALFs ont une forme arrondie. Ils expriment toujours du LPG à leur surface.
- LPG2-: Le marquage est complètement négatif. Les mutants LPG2- n'expriment aucune unité répétitive en surface.
- wt ama: Le marquage est négatif, ce qui démontre que la transformation du promastigote en amastigote se traduit par la perte du LPG de surface (McConville et Blackwell, 1991).

Les photos ont toutes été prises avec une exposition de 2 secondes (1000X).

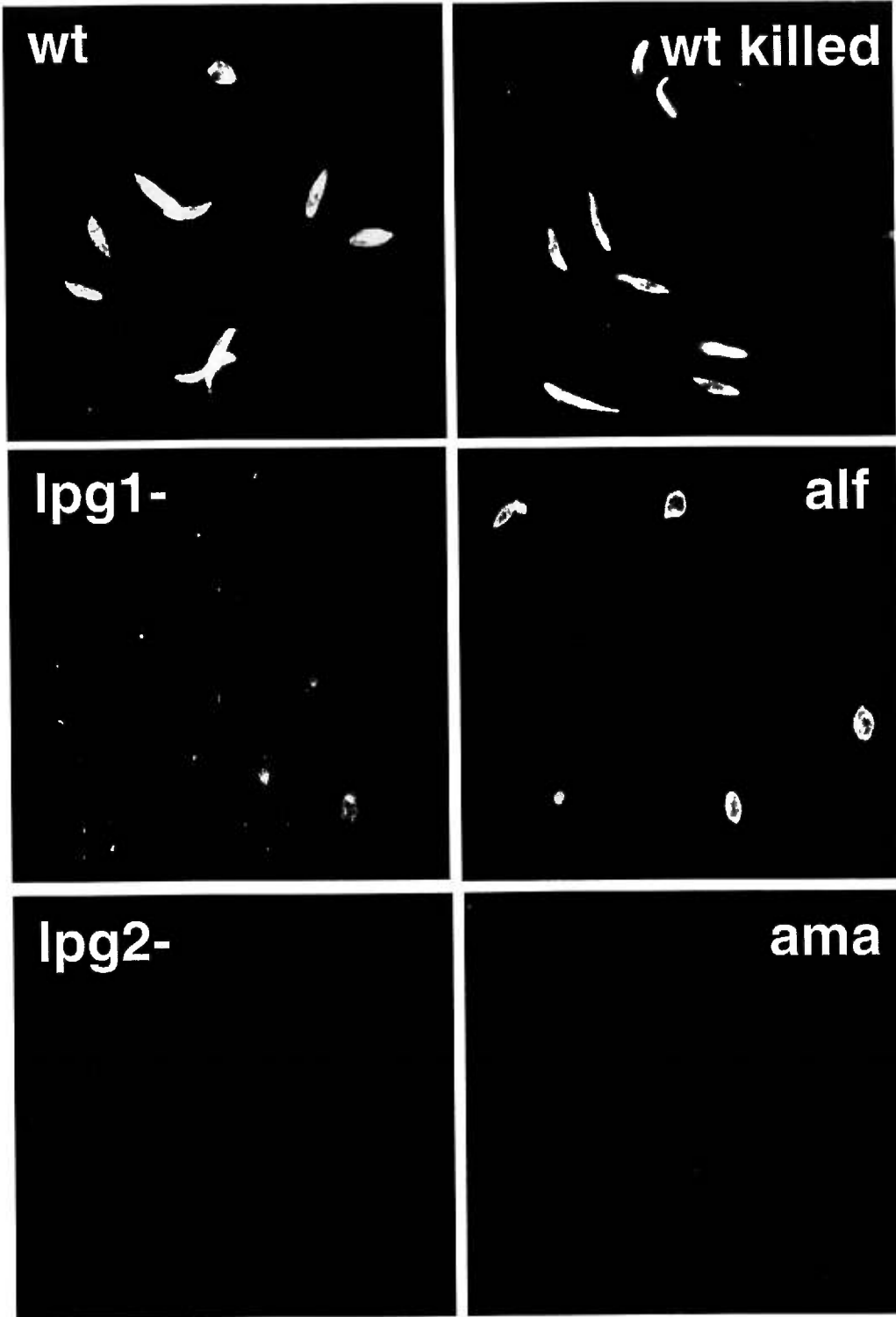


Figure 6

Micrographie illustrant les propriétés de fusion de phagosomes contenant le *L. donovani* de type sauvage et les mutants LPG2- et LPG1-.

La photo du haut montre un promastigote de *L. donovani* dans un phagosome. La présence du LPG à la surface des promastigotes permet la formation de phagosomes peu fusogéniques envers les endosomes (7000X). En effet, il n'y a pas eu fusion du phagosome avec les endosomes chargés d'or.

Les photos du milieu et du bas montrent des phagosomes contenant respectivement le mutant LPG1- et LPG2- qui synthétisent une forme tronquée de LPG. Chez le LPG2- aucune molécule exprimée à la surface ne possède d'unité disaccharidique répétitive. Par contre, le LPG1- ajoute ces unités sur toutes les molécules qui en contiennent normalement sauf le LPG. Ces deux mutants induisent la formation de phagosomes très fusogéniques. En effet, la présence d'une très grande quantité de particules d'or à l'intérieur des phagosomes indique qu'il y a eu fusion avec des endosomes chargés d'or (7000X), ce qui indique que seulement les unités répétitives présentes sur le LPG, mais pas sur d'autres molécules, ont un impact sur les propriétés de fusion des phagosomes.

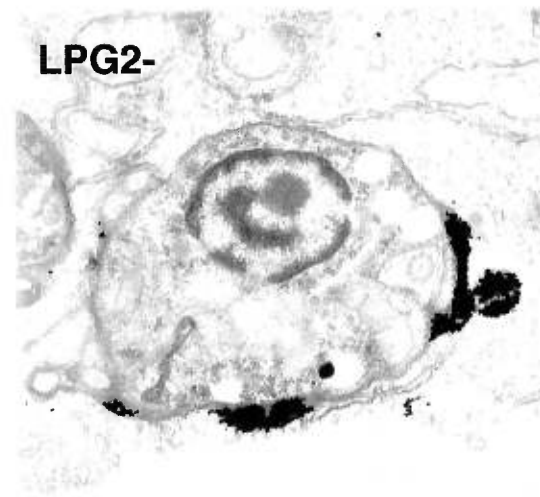
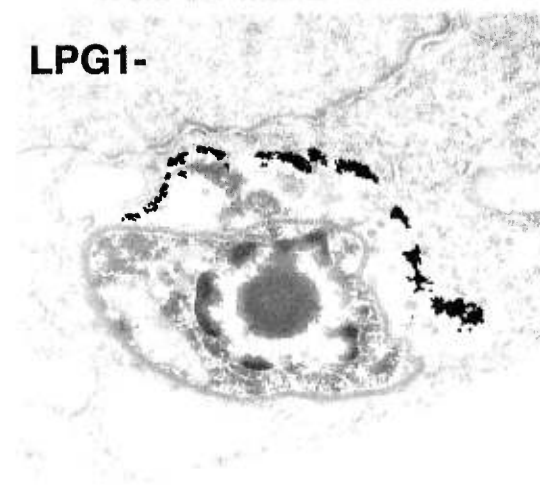
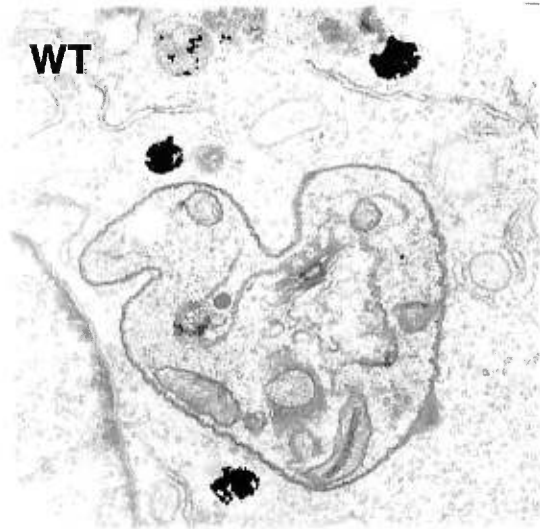


Figure 7

Micrographie illustrant les propriétés de fusion de phagosomes contenant un amastigote *in vivo* et un amastigote généré *in vitro* (ALF).

La photo du haut montre un phagosome contenant un *L. donovani* sous sa forme amastigote, qui ne synthétise pas de LPG de surface. La présence de particules d'or à l'intérieur du phagosome indique que le phagosome a fusionné avec des endosomes chargés d'or (12000X).

La photo du bas montre un phagosome contenant un ALF. Bien que les ALFs ressemblent morphologiquement aux amastigotes, ils expriment toujours du LPG à leur surface. Par conséquent, ils induisent la formation de phagosomes peu fusogéniques. En effet, l'absence de particules d'or dans le phagosome indique qu'il n'y a pas eu de fusion des phagosomes avec des endosomes chargés d'or (12000X).

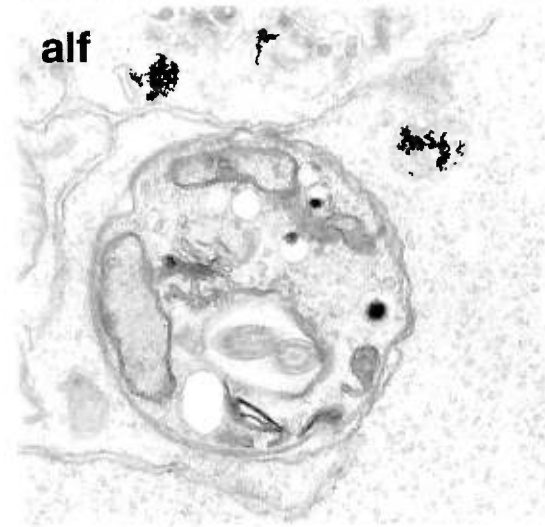
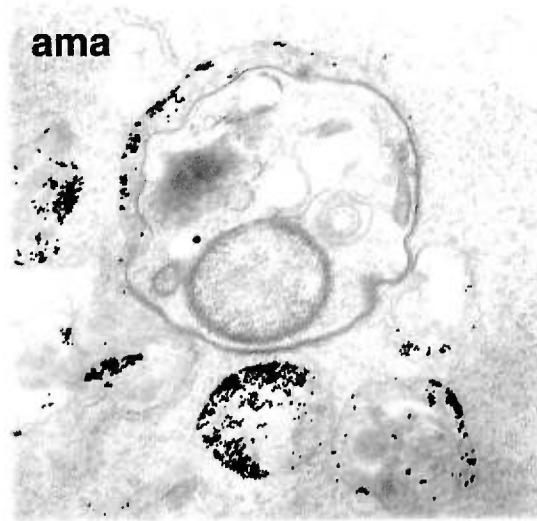


Figure 8

Analyses quantitatives des essais de fusion intracellulaire décrivant les propriétés de fusion des phagosomes contenant des parasites vivants et morts.

A) Comparaison des niveaux de fusion de phagosomes contenant des *L. donovani* vivants ou des parasites tués à la chaleur par une incubation de 20 minutes à 45 °C avant l'internalisation. Les phagosomes formés lors de l'internalisation de parasites morts fusionnent plus de deux fois plus que les phagosomes formés lors de l'internalisation de parasites vivants (Test de t: $p=0,007$). Ce résultat suggère que la viabilité des parasites est nécessaire à l'inhibition de la fusion.

B) Comparaison des niveaux de fusion de phagosomes contenant des *L. donovani* vivants et tués une fois à l'intérieur des cellules en incubant les cellules infectées 10 minutes, en présence de violet de cristal. Le fait de tuer les parasites à l'intérieur des phagosomes ne rend pas les phagosomes plus fusogéniques (Test de t: $p=0,72$). Ce résultat suggère que les propriétés fusogéniques des phagosomes sont déterminées au moment ou peu de temps après l'entrée des parasites dans leurs cellules hôtes, probablement par un processus actif (Voir A). Par la suite, la seule présence du LPG semble suffisante à maintenir l'inhibition de la fusion.

En A) et B), pour chaque colonne représentée, 100 phagosomes par coupe ont été comptés sur un minimum de 3 coupes non sériées.

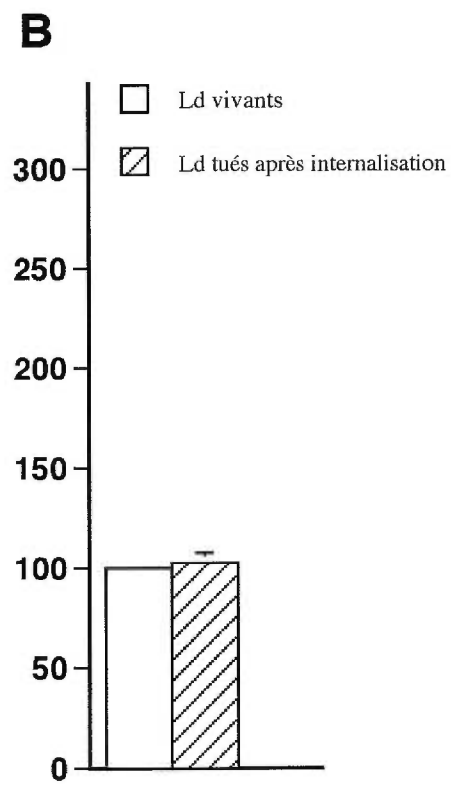
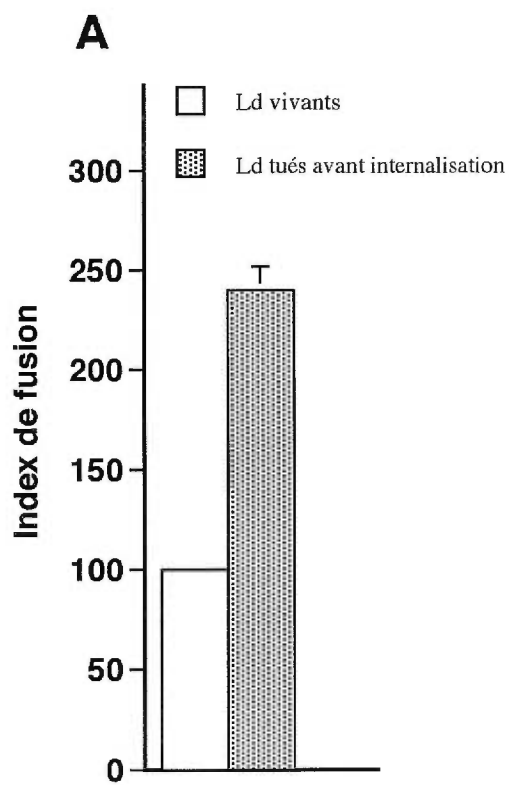


Figure 9

Effet d'un transporteur d'électrons (violet de cristal) sur la survie intracellulaire de *L. donovani*.

Dans cet essai, l'activité de la luciférase est directement proportionnelle à la quantité de *Leishmania* vivants. Les *Leishmania* qui expriment la luciférase ont été internalisés 60 minutes puis chassés 60 minutes. Par la suite, les cellules ont été traitées avec le transporteur d'électrons violet de cristal (CV) pour 10 minutes puis réincubées 0, 30 ou 60 minutes pour permettre au CV de tuer les parasites. Après ces temps de chasse, le milieu a été enlevé, les cellules lysées, et le lysat, auquel le substrat de la luciférase a été ajouté, lu au luminomètre.

Ce graphique représente la survie de *Leishmania* (exprimé en RLU/sec) en fonction du temps, à l'intérieur des cellules traitées avec le transporteur d'électrons violet de cristal . Le CV est beaucoup plus efficace à forte concentration et agit en fonction du temps. La concentration de 10^{-5} M a été retenue pour nos expériences puisqu'elle réduit de deux logs la quantité de *Leishmania* après 70 minutes. Cette concentration de CV n'altère pas l'ultrastructure des cellules en microscopie électronique.

Survie de *Leishmania* dans des J774 traitées avec différentes concentrations de violet de cristal

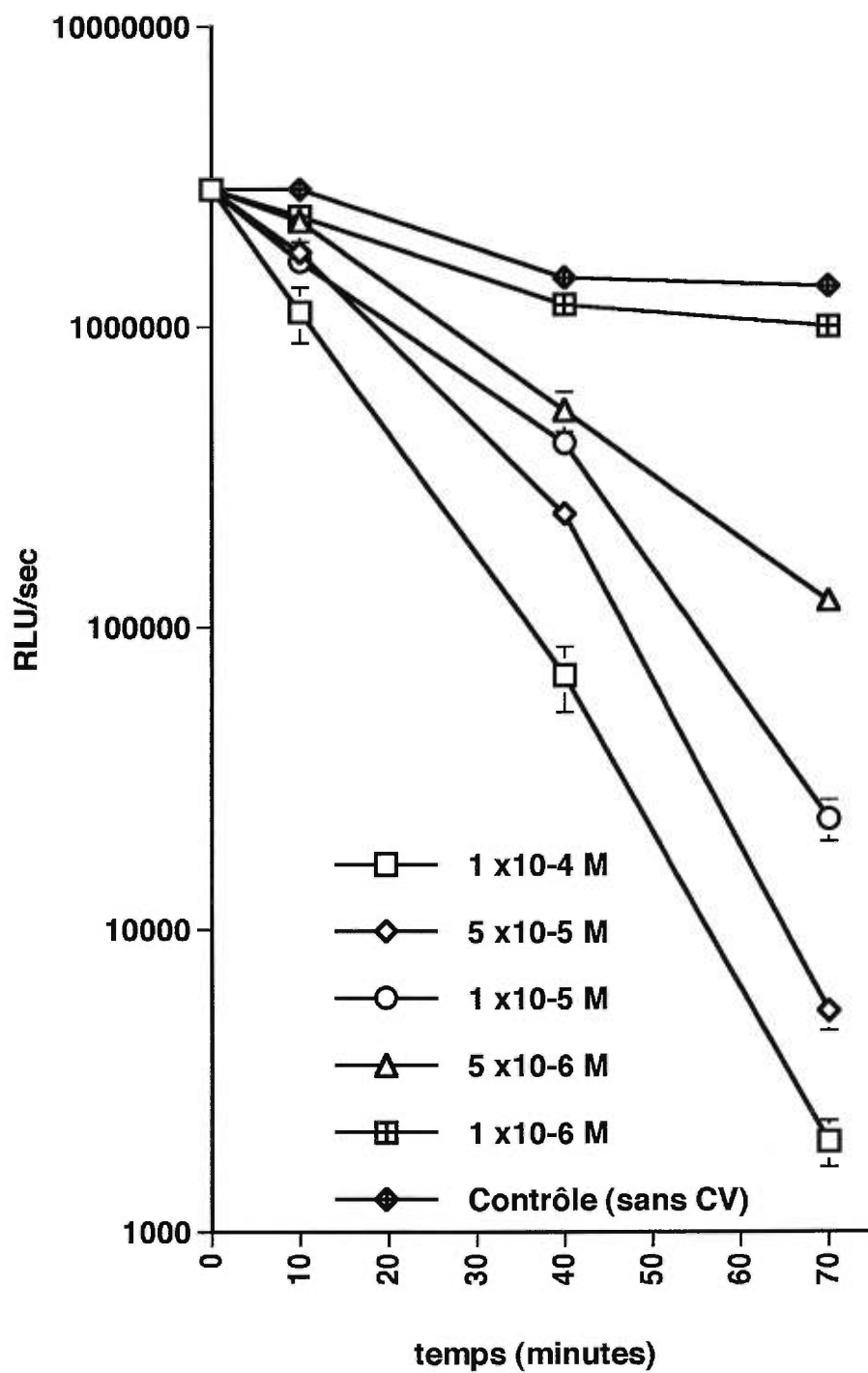


Figure 10

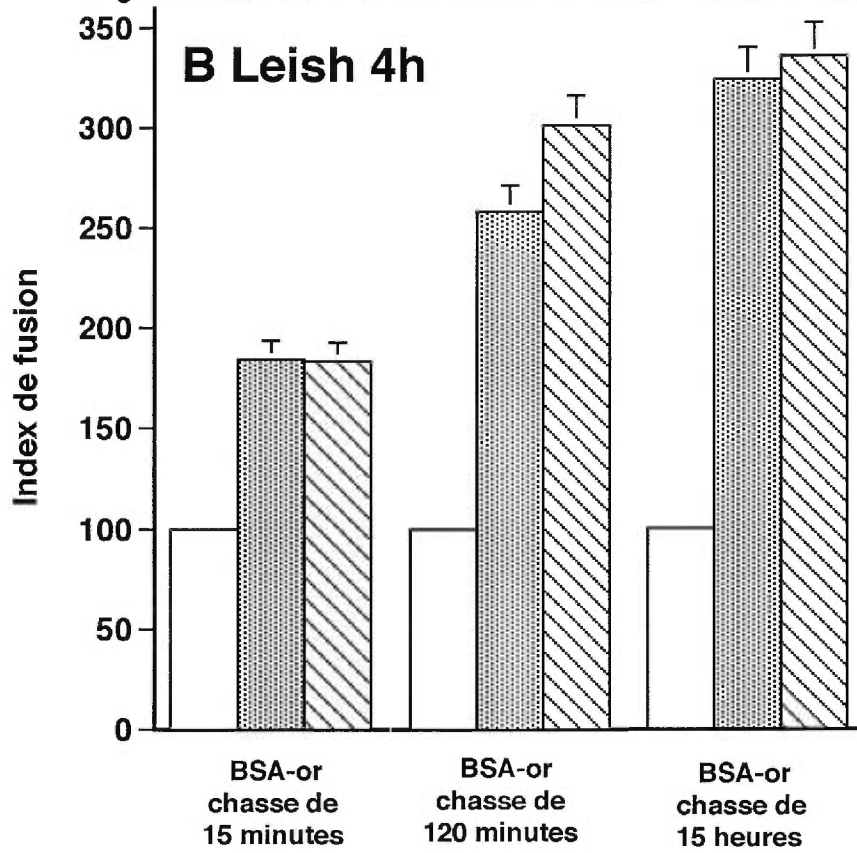
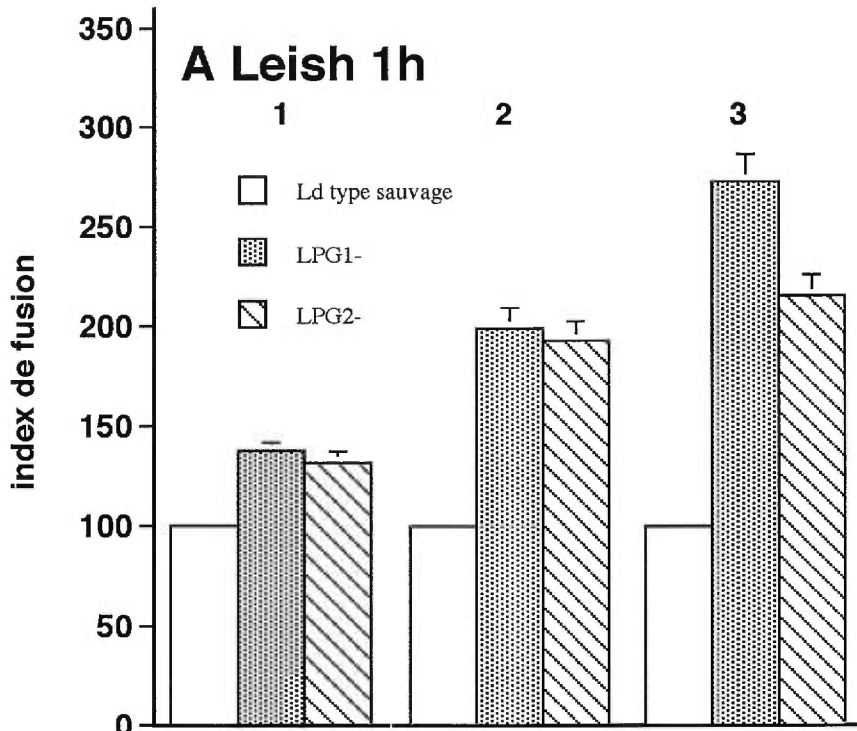
Analyses quantitatives des essais de fusion décrivant les propriétés de fusion entre les phagosomes contenant *L. donovani* et différentes populations d'endosomes.

Afin de déterminer si les *Leishmania* inhibent la fusion de préférence avec les endosomes tardifs et les lysosomes plutôt qu'avec les endosomes précoces, les trois compartiments endocytaires ont été chargés d'or en modifiant le temps de chasse après l'entrée de l'or dans la voie endocytaire. Pour ce faire, l'or a été internalisé 30 minutes puis chassé 15 minutes pour charger les endosomes précoces, chassé 2 heures pour charger les endosomes tardifs et chassé 15 heures pour charger les lysosomes. Par la suite, les parasites ont été internalisés 1 heure, puis chassés 1 ou 4 heures pour permettre les interactions entre les phagosomes et les différentes populations d'endosomes. Bien que les endosomes tardifs et les lysosomes apparaissent plus ronds et plus petits que les endosomes précoces, seul le temps de chasse de l'or a servi de critère pour différencier les compartiments endocytaires. Pour chaque colonne représentée, 100 phagosomes par coupe ont été comptés sur un minimum de 3 coupes non sériées.

A) Ce graphique montre l'index de fusion entre les phagosomes et les endosomes précoces à gauche, les endosomes tardifs au milieu et les lysosomes à droite. La différence de fusion entre les phagosomes contenant le type sauvage et les mutants s'accroît alors que la population d'endosomes devient plus âgée. Les différences entre les mutants et le type sauvage sont significatives pour toutes les populations d'endosomes observées (Tests Anova: chasse 15 min.: $p=0,004$; chasse 120 min.: $p=0,001$; chasse 15 heures: $p=0,0003$; Test de t post-hoc toutes les valeurs $p \leq 0,01$).

B) Les promastigotes de type sauvage maintiennent l'inhibition de la fusion de façon persistante même après 4 heures de chasse.

Ces résultats démontrent que les *Leishmania* inhibent de préférence la fusion entre les phagosomes et les compartiments endocytaires plus tardifs enrichis d'hydrolases. Ce processus permettrait aux parasites d'éviter de se retrouver dans des compartiments contenant des composés capables de les dégrader.



DISCUSSION

Le parasite intracellulaire *Leishmania*, agent étiologique de la leishmaniose, a développé des stratégies qui lui permettent de survivre et de se reproduire dans l'environnement hostile de ses hôtes, c'est-à-dire, les insectes et les mammifères. Chez les mammifères, les parasites injectés sous le derme par une piqûre de la mouche, sont rapidement internalisés dans les macrophages par phagocytose. Dans ces cellules, les promastigotes de *Leishmania* résident dans des phagosomes où ils se transforment en quelques jours en amastigotes, la forme répliquative responsable de la maladie chez le mammifère. Cette transformation est déclenchée par la température plus élevée chez le mammifère et une baisse du pH à l'intérieur des phagosomes (Zilberstein et Shapira, 1994). Des études ont démontré que les promastigotes de *L. donovani* sont internalisés dans des phagosomes qui fusionnent peu avec les endosomes (Desjardins et Descoteaux, 1997). L'absence de fusion a pour conséquence d'empêcher la maturation des phagosomes contenant les promastigotes de *Leishmania* en phagolysosomes (Scianimanico et al., 1999). Par contre, plusieurs études ont montré que les amastigotes de *Leishmania* se retrouvent à l'intérieur de phagolysosomes, ce qui démontre que les amastigotes peuvent survivre en toute impunité dans l'environnement hostile des phagolysosomes, probablement, en résistant à l'action des hydrolases (Alexander et Vickerman, 1975; Chang et Dwyer, 1976; Shepherd et al., 1983; Rabinovitch et al., 1985; Antoine et al., 1990;

Prina et *al.*, 1990; Russell et *al.*, 1992; Lang et *al.*, 1994). Ces résultats indiquent clairement que les promastigotes et les amastigotes ont recours à des stratégies de survie différentes dans leurs cellules hôtes. Dans la présente étude, nous apportons de nouvelles indications qui démontrent que les promastigotes de *Leishmania* utilisent le LPG présent à leur surface pour inhiber la fusion des phagosomes avec les compartiments tardifs de la voie endocytaire. Ce processus se fait de façon active, puisque, comme nous le montrons, les parasites tués sont incapables d'inhiber la fusion des phagosomes. Cette inhibition permet aux promastigotes de résider à l'intérieur de compartiments cellulaires incapables de tuer les microorganismes.

Une étude précédente utilisant une approche génétique a montré que les molécules responsables de l'inhibition de la fusion phagosome-endosome possèdent des unités disaccharidiques répétitives phosphorylées ($\text{PO}_4\text{-6Gal}\beta\text{1-4Man}$) (Desjardins et Descoteaux, 1997). Le squelette de la molécule du LPG est formé d'une suite de ces sous-unités (Turco et Descoteaux, 1992), ce qui rend le LPG un candidat apte à jouer un rôle dans l'inhibition de la fusion. Toutefois, l'étude de Desjardins et Descoteaux (1997) utilisant le mutant LPG2- n'a pas permis de démontrer sans équivoque que le LPG est la seule molécule contenant des unités répétitives impliquée dans l'inhibition de la fusion. En effet, le mutant LPG2- utilisé dans cette étude, ne synthétise pas d'unité répétitive sur d'autres macromolécules en plus du LPG, comme la phosphatase acide et les phosphoglycans sécrétés (Ilg et *al.*, 1994). Chacune de ces molécules

pourrait donc participer au processus d'inhibition de la fusion. C'est pourquoi, dans la présente étude, nous avons tenté de démontrer sans équivoque le rôle du LPG dans l'inhibition de la fusion phagosome-endosome. À cette fin, nous avons utilisé un second mutant, le LPG1-, qui ajoute les unités disaccharidiques répétitives à toutes les macromolécules qui en contiennent normalement, sauf au LPG (Huang et Turco, 1993). Les résultats des essais de fusion en microscopie électronique obtenus dans le présent travail montrent que les phagosomes contenant les mutants LPG1- ou les LPG2- sont beaucoup plus fusogéniques envers les endosomes chargés d'or que les phagosomes contenant les parasites de type sauvage. De plus, les phagosomes contenant les mutants ont des niveaux de fusion similaires. Nos résultats confirment donc que le LPG est la principale molécule responsable de l'inhibition de la fusion chez *L. donovani*. Les autres molécules, dont la composition est altérée chez le mutant LPG2-, mais intacte chez le mutant LPG1-, n'ont pas ou très peu d'effet sur les propriétés fusogéniques des phagosomes.

Sachant maintenant que ce sont les unités disaccharidiques répétitives attachées au LPG qui permettent l'inhibition de la fusion phagosome-endosome, il est intéressant de noter qu'il existe un polymorphisme structural du LPG chez différentes espèces de *Leishmania*. Les chaînes oligosaccharidiques latérales attachées à la position 3 du galactose des unités disaccharidiques, présentes chez *L. major*, mais absentes chez *L. donovani*, constituent un très bon exemple. La présence de telles chaînes chez *L. major* rend son LPG beaucoup plus complexe que

celui de *L. donovani*. Butcher et collaborateurs (1996) ont montré que les chaînes latérales de *L. major* permettent à ce parasite d'infecter spécifiquement une espèce particulière de mouche, appelée *Phlebotomus papatasi*, puisqu'en éliminant ces chaînes, le parasite n'est plus capable de se lier aux parois intestinales de cette mouche. Toutefois, le rôle précis de ces chaînes latérales dans l'interaction des parasites avec les macrophages et dans leur survie à l'intérieur de ces cellules est peu connu. Easterbrook et collaborateurs (1995) ont montré que le LPG de *L. major* est plus efficace que le LPG de *L. donovani* dans l'inhibition de la formation de syncytia de cellules, un processus qui implique des phénomènes de fusion membranaire. C'est pourquoi, afin de tester si les chaînes latérales ont un rôle à jouer dans l'inhibition de la fusion phagosome-endosome, nous avons étudié les propriétés de fusion de phagosomes contenant *L. donovani* ou *L. major*. Nos résultats montrent que les phagosomes contenant *L. major* fusionnent moins avec les endosomes chargés d'or que les phagosomes contenant *L. donovani*. La présence de chaînes latérales oligosaccharidiques chez *L. major* pourrait expliquer pourquoi cette espèce inhibe d'avantage la fusion que *L. donovani*. Toutefois, l'analyse du taux de fusion des phagosomes contenant le mutant Spock, qui ne possèdent pas les chaînes latérales (Butcher et al., 1996), montre que ces phagosomes fusionnent au même niveau que les phagosomes contenant le *L. major* de type sauvage. Ces résultats éliminent donc tout rôle par les chaînes latérales dans l'inhibition de la fusion phagosome-endosome. L'efficacité accrue de *L. major* à inhiber la fusion phagosome-endosome peut s'expliquer plutôt par le fait que son LPG possède en moyenne plus d'unités

répétitives que le LPG de *L. donovani* (Turco et Descoteaux, 1992). D'ailleurs, une étude a montré que l'efficacité de l'inhibition de la fusion membranaire induite par le LPG s'accroît en fonction du nombre d'unités disaccharidiques présentes sur cette molécule (Easterbrook et al., 1995)

Plusieurs travaux ont démontré que les amastigotes résident dans des compartiments qui ont certaines caractéristiques propres aux phagolysosomes (Antoine et al., 1990; Prina et al., 1990; Russell et al., 1992; Lang et al., 1994), c'est-à-dire, des compartiments capables de fusionner librement avec des endosomes ou des lysosomes. Russell et collaborateurs (1992) ont montré que la transformation des phagosomes contenant *L. mexicana* en phagolysosomes se fait de façon graduelle et concorde avec la transformation des promastigotes en amastigotes. De plus, ce groupe a observé que le transfert du contenu des endosomes vers les phagosomes formés lors de l'internalisation de promastigotes augmente en fonction de la progression de l'infection, ce qui suggère que le rétablissement de la fusion se produit alors que les promastigotes se transforment en amastigotes. Pour expliquer ce phénomène, il a été suggéré que la présence du LPG dans les membranes des macrophages au début de l'infection réduit les propriétés de fusion des phagosomes, tandis que sa disparition graduelle lors de la transformation des promastigotes en amastigotes (McConville et Blackwell, 1991), rétablit la capacité de fusion des phagosomes (Desjardins et Descoteaux, 1997). Toutefois, il existe plusieurs différences biochimiques et morphologiques entre les promastigotes et les amastigotes. Ces différences peuvent

expliquer la modification des propriétés fusogéniques des phagosomes lors de la différenciation des promastigotes en amastigotes. Une différence évidente est l'absence de flagelle et du LPG chez les amastigotes. Dans ce travail, nous avons étudié les conséquences de la perte du LPG et du flagelle sur la fusion entre les phagosomes et les endosomes lors de la transformation des promastigotes en amastigotes. Nos résultats confirment le rôle du LPG dans l'inhibition de la fusion et éliminent le flagelle en tant que facteur pouvant intervenir dans la modification des propriétés fusogéniques des phagosomes. Nous sommes arrivés à cette conclusion en employant des amastigotes générés *in vitro* (ALFs), qui ont la morphologie aflagellée des amastigotes, mais qui expriment toujours du LPG à leur surface. Cependant, puisque les conditions de culture utilisées dans notre étude pour générer des ALFs ne reproduisent pas tout à fait les conditions qui prévalent dans les phagolysosomes, il est possible que les ALFs ressemblent plus biochimiquement aux promastigotes qu'aux amastigotes. Dans ce cas, il est probable qu'il y ait d'autres facteurs, en plus de la disparition du LPG lors de la transformation des promastigotes en amastigotes, qui puissent contribuer au rétablissement de la fusogénicité des phagosomes. Afin d'étudier les modifications biochimiques qui se produisent lors de la transformation des promastigotes en amastigotes, il serait très avantageux de produire *in vitro* des ALFs qui ont les mêmes caractéristiques que les amastigotes retrouvés chez les mammifères. Déjà, certaines conditions de culture axénique des amastigotes ont permis de produire des ALFs qui possèdent plusieurs marqueurs biochimiques des vrais amastigotes (Saar et al., 1998). En effet, ces amastigotes cultivés *in*

vitro expriment les 7 gènes de la famille A2 spécifiques aux amastigotes (Charest et Matlashewski, 1994), n'expriment pas le LPG en surface et possèdent des activités métaboliques de transport de proline propres aux amastigotes (Glaser et Mukkada, 1992). En employant de telles conditions, il devient possible de produire facilement des ALFs en grande quantité pour ensuite étudier leur composition biochimique. Sous peu, de telles études seront entreprises dans notre laboratoire.

Notre étude a aussi permis de démontrer que l'inhibition de la fusion phagosome-endosome induite par le LPG, est plus efficace envers les endosomes tardifs qu'envers les endosomes précoces. Ces résultats suggèrent que *L. donovani* bloque la biogenèse des phagolysosomes en stoppant ou en retardant la fusion des phagosomes avec les organites endocytaires tardifs qui permettent l'acquisition des caractéristiques lysosomiales par les phagosomes. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus lors d'une étude effectuée dans notre laboratoire portant sur la maturation des phagosomes contenant *Leishmania donovani*. Dans cette étude, nous avons évalué la cinétique d'acquisition de marqueurs spécifiques aux phagosomes "fusogéniques" (contenant le mutant LPG2-) et aux phagosomes "non fusogéniques" (contenant le promastigote de type sauvage) (Scianimanico et al., 1999). Les résultats de cette étude ont montré que les deux types de phagosomes amorcent leur maturation de façon similaire en recyclant des marqueurs précoces associés aux endosomes précoces, comme TFR et EEA1. Par contre, les phagosomes contenant le type sauvage acquièrent beaucoup moins la petite GTPase

rab7, associée aux endosomes tardifs, que les phagosomes contenant le mutant LPG2-. Étant donné que cette GTPase intervient dans la régulation des événements de fusion entre les endosomes tardifs (Feng et *al.*, 1995; Méresse et *al.*, 1995; Vitelli et *al.*, 1997), il est possible que le faible recrutement de rab7 soit la cause de la baisse du niveau de fusion entre les phagosomes contenant les promastigotes de type sauvage et les endosomes tardifs. L'étude de Scianimanco et collaborateur (1999) a aussi montré que les phagosomes contenant le *L. donovani* de type sauvage acquièrent le marqueur lysosomal LAMP1 en moins grande quantité et avec une cinétique plus lente que les phagosomes contenant le mutant LPG2-, ce qui suggère que le *L. donovani* de type sauvage inhibe ou du moins retarde la fusion des phagosomes avec les lysosomes. Nos résultats des essais de fusion en microscopie électronique obtenus dans le présent travail et ceux obtenus en cytométrie en flux (Scianimanco et *al.*, 1999), permettent de proposer que les promastigotes de *Leishmania* inhibent la fusion des phagosomes avec les endosomes tardifs et ainsi bloquent la maturation des phagosomes à un stade précoce. Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été obtenus lors d'études de la composition biochimique de phagosomes contenant d'autres parasites intracellulaires. En effet, les phagosomes contenant des mycobactéries fusionnent avec les endosomes précoces, mais pas avec les tardifs (de Chastellier et *al.*, 1995; Via et *al.*, 1997). L'étude de Via et collaborateurs (1997) a démontré que les phagosomes contenant des mycobactéries arrêtent leur maturation entre des étapes régulées par rab5, un marqueur d'endosome précoce, et rab7, un marqueur d'endosome tardif (Via et *al.*, 1997), ce qui suggère que les

phagosomes contenant des mycobactéries fusionnent avec des endosomes précoces, mais pas avec des tardifs. De plus, les phagosomes contenant le parasite intracellulaire, *Brucella* et possiblement *Salmonella* acquièrent des marqueurs d'endosomes précoces sans toutefois acquérir des marqueurs d'endosome tardifs (Rathman et al., 1997; Pizarro-Cerdá et al., 1998a). Il est possible qu'il y ait plusieurs points communs entre l'inhibition de la fusion induite par ces microorganismes, et celle induite par *Leishmania*. D'autres études sont nécessaires afin de répondre à cette question.

Bien qu'il soit de plus en plus clair que les promastigotes de *L. donovani* inhibent ou retardent la biogenèse des phagolysosomes, la façon dont le LPG modifie les propriétés de fusion des phagosomes demeure méconnue. On peut cependant imaginer plusieurs scénarios. D'abord, il est possible que les *Leishmania* de type sauvage et mutants pour LPG soient internalisés par des récepteurs différents, formant ainsi des phagosomes qui ont une composition biochimique et des propriétés fusogéniques différentes. Dans cette éventualité, le destin des phagosomes contenant les promastigotes mutants et de type sauvage serait déterminé au moment de l'entrée dans la cellule. Il est intéressant de noter que ce scénario se produit chez d'autres parasites intracellulaires, comme par exemple *Toxoplasma gondii* où les propriétés des phagosomes sont déterminées par un processus actif du parasite lors de son internalisation (Joiner et al., 1990; Finlay et Falkow, 1997).

Un deuxième scénario possible est que le LPG agisse d'une façon persistante sur les phagosomes. En effet, bien que les phagosomes contenant des promastigotes de *Leishmania* fusionnent peu avec les endosomes, la transformation des promastigotes, riches en LPG, en amastigotes, pauvres en LPG, se traduit par le rétablissement de la fusion (Russell et al., 1992). Ceci suggère que le LPG affecte les propriétés de fusion des phagosomes tant et aussi longtemps qu'il est présent à la surface des *Leishmania*. Le LPG pourrait agir sur les phagosomes en modifiant les propriétés physiques des membranes comme le suggèrent plusieurs études. D'abord, le LPG se retrouve très rapidement associé à la membrane plasmique des macrophages dans la zone d'internalisation (Tolson et al., 1990). Ceci suggère que ces molécules sont rapidement dissociées de la surface des *Leishmania* et s'insèrent dans les membranes des macrophages. De plus, il a été démontré que la présence du LPG dans des membranes de cellules réduit de façon appréciable leur fusion avec des virus (Miao et al., 1995). Par ailleurs, des travaux plus récents (Rasmusson et al., 1998; Martin et al., 1998) ont démontré que l'insertion du LPG dans les membranes altère leurs propriétés de fusion en stabilisant les bicouches lipidiques, augmentant ainsi la barrière énergétique à franchir pour provoquer un événement de fusion.

Une troisième possibilité est que le LPG empêche la fusion par encombrement stérique. Une étude portant sur la formation de syncytia, un processus qui implique la fusion de plusieurs cellules entre elles, a montré que le LPG de *L. major* inhibe ce processus plus efficacement que le LPG

de *L. donovani* (Easterbrook et al., 1995). Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de chaînes latérales chez le LPG de *L. major* qui rendrait plus difficile le rapprochement de vésicules s'apprêtant à fusionner. Toutefois, nos résultats indiquent qu'il n'y a pas de différences de fusion chez les phagosomes contenant *L. major* et le mutant Spock sans chaîne latérale, ce qui va à l'encontre de cette idée. De plus, une étude faite avec des vésicules artificielles a montré que le LPG peut inhiber la fusion même s'il est présent seulement du côté luminal des phagosomes (Martin et al., 1998). Ce résultat démontre que le LPG ne peut pas inhiber la fusion par encombrement stérique, mais qu'il agit plutôt en stabilisant les membranes comme mentionné plus tôt (Miao et al., 1995). Si toutefois, le LPG agit par encombrement stérique lors de l'inhibition de la formation de syncytia (Easterbrook et al., 1995), il est peu probable que ce processus soit physiologique puisque, dans le cas de l'inhibition de la fusion induite par la présence de *L. donovani* à l'intérieur des phagosomes, le LPG se retrouve uniquement du côté luminal des phagosomes.

Un autre mécanisme d'action possible du LPG serait d'altérer le fonctionnement de protéines régulatrices de la fusion soit en prévenant leur recrutement à la membrane phagosomiale ou en inhibant directement leur fonction. En effet, la petite GTPase rab7 est acquise en moins grande quantité sur les phagosomes contenant le *L. donovani* de type sauvage que sur les phagosomes contenant le mutant LPG2- (Scianimanico et al., 1999). Si le LPG n'empêche pas le recrutement de protéines régulatrices de la fusion, il est possible que cette molécule puisse modifier leur conformation

tridimensionnelle, ce qui aurait pour effet de les inactiver. Ce phénomène se produit lors de l'inhibition de la PKC par le LPG. En effet, le LPG n'empêche pas le recrutement de cette kinase à la membrane phagosomiale, mais l'inactive en modifiant sa conformation (Giorgione et *al.*, 1996).

Bien que plusieurs indications suggèrent que le LPG agit directement sur les membranes biologiques, notre étude montre qu'à lui seul, il ne semble pas suffisant pour inhiber la fusion des phagosomes. En effet, des parasites tués avant l'internalisation, qui expriment toujours du LPG à leur surface tel que montré en immunofluorescence, induisent la formation de phagosomes qui sont beaucoup plus fusogéniques que les phagosomes formés lors de l'internalisation de parasites vivants. Ce résultat suggère donc qu'un processus actif du parasite, en plus du LPG, agit sur les phagosomes de façon à changer leurs propriétés fusogéniques. Toutefois, il est possible que les parasites tués à la chaleur aient perdu une partie de leur LPG, ce qui rendrait l'inhibition de la fusion moins efficace. Un dosage de l'intensité de marquage du LPG chez les parasites tués et vivants en cytométrie en flux pourrait répondre à cette question. Il est aussi possible que le LPG ait changé de conformation sous l'action de la chaleur utilisée pour tuer les parasites. Nous avons aussi montré que tuer les parasites après leur internalisation dans les cellules, ne rétablit pas les propriétés fusogéniques des phagosomes. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les propriétés fusogéniques des phagosomes sont déterminées peu de temps après l'interaction entre le parasite et l'hôte, plutôt que par une action

persistante du parasite sur les phagosomes. Il est probable que ce processus implique le LPG, puisque certaines études ont montré que du LPG purifié a la capacité d'inhiber la fusion membranaire (Miao et *al.*, 1995; Rasmusson et *al.*, 1998; Martin et *al.*, 1998). D'autres études sont requises afin de déterminer avec plus de précision la nature des interactions, entre le parasite et son hôte, qui permettent la modification des propriétés fusogéniques des phagosomes au moment de l'internalisation .

L'ensemble de nos résultats soulève certaines interrogations sur le mécanisme d'action du LPG. Par exemple, pourquoi le LPG inhibe peu la fusion entre les phagosomes et les endosomes précoces, mais beaucoup celle entre les phagosomes et les endosomes tardifs. En effet, si le LPG altère les propriétés physiques des membranes biologiques tel que suggéré dans plusieurs études (Miao et *al.*, 1995; Rasmusson et *al.*, 1998; Martin et *al.*, 1998), ce changement devrait aussi affecter la fusion entre les phagosomes et les endosomes précoces. Il est possible que le LPG agisse de façon différente dépendamment de la composition biochimique des membranes dans lesquelles il s'insère. Par ailleurs, il est possible que le LPG modifie les propriétés de fusion des phagosomes en agissant sur des protéines qui régulent la fusion avec les endosomes tardifs, mais pas sur des protéines qui régulent la fusion avec les endosomes précoces (Scianimanco et *al.*, 1999). De toute évidence, de nombreuses études seront nécessaires afin d'identifier le mécanisme d'action de cette molécule.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons étudié une importante molécule de surface des *Leishmania*, le lipophosphoglycan ou LPG, qui joue un rôle primordial dans leur survie à l'intérieur des phagosomes de macrophages. Les résultats d'essais de fusion en microscopie électronique, obtenus avec deux mutants de *L. donovani*, montrent que les unités disaccharidiques phosphorylées, qui forment le squelette du LPG, sont essentielles à l'inhibition de la fusion entre phagosomes et endosomes. Par contre, les chaînes saccharidiques latérales présentes chez *L. major* n'ont aucun impact sur la fusion. Nous avons aussi démontré que l'inhibition de la fusion phagosome-endosome est plus efficace envers les endosomes tardifs et les lysosomes qu'envers les endosomes précoces. L'inhibition de la fusion avec les compartiments tardifs permet aux *Leishmania* d'éviter d'entrer en contact avec les enzymes hydrolytiques présentes surtout dans les endosomes tardifs et les lysosomes. L'absence d'enzyme hydrolytique permet aux *Leishmania* de résider dans un environnement favorable à leur survie et d'initier leur transformation en amastigotes capables de résister aux hydrolases. De plus, nous avons déterminé que la viabilité des parasites est essentielle au moment de leur internalisation ou très peu de temps après, ce qui suggère que le LPG agit très tôt sur les propriétés fusogéniques des phagosomes grâce à un processus actif du parasite.

La découverte du LPG en tant que facteur de survie important des *Leishmania* au tout début de l'infection, en fait une cible pour le développement de nouvelles thérapies contre la leishmaniose. Malheureusement, nous ne connaissons pas encore son mécanisme d'action. C'est pourquoi, d'autres études portant sur les interactions potentielles du LPG avec certains composants membranaires des phagosomes sont essentielles. Nous nous proposons d'entreprendre de telles études dans notre laboratoire. Pour ce faire, nous tenterons d'identifier, par électrophorèse en deux dimensions, les protéines présentes chez les phagosomes contenant des mutants de LPG, mais absentes chez les phagosomes contenant des *L. donovani* de type sauvage. Parallèlement, ces études pourraient nous révéler des informations importantes sur les protéines qui participent à la fusion entre les phagosomes et les endosomes. Par ailleurs, les informations obtenues pourraient permettre de tracer des parallèles avec les autres parasites intracellulaires, comme *Mycobacteria*, *Legionella*, *Salmonella*, et *Brucella* pour n'en nommer que quelques-uns, qui altèrent la voie normale de maturation des phagosomes en phagolysosomes.

Bien que le LPG soit indubitablement un facteur de virulence chez les promastigotes de *Leishmania*, il n'en est pas de même chez les amastigotes. En effet, ces derniers peuvent survivre et se reproduire en toute impunité dans l'environnement lytique des phagolysosomes même s'ils n'expriment pas de LPG à leur surface. De toute évidence, les amastigotes possèdent des déterminants moléculaires différents des

promastigotes qui permettent leur survie et leur reproduction dans les macrophages. Malheureusement, très peu de ces déterminants ont été identifiés jusqu'à présent. Prochainement, nous prévoyons débiter l'analyse protéomique¹ des promastigotes et des amastigotes afin d'identifier des protéines qui joueraient un rôle dans la survie des amastigotes à l'intérieur des phagolysosomes (Wilkins et *al.*, 1996). Ces protéines pourraient par la suite servir de cibles pour de futures thérapies contre la leishmaniose.

¹ Protéomique vient du mot protéome signifie toutes les PROTéines encodées par le génOME. Lorsque que l'on parle du protéome d'un organisme particulier, on désigne toutes les protéines présentes chez cet organisme.

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K et Watson JD (1993) Molecular biology of the cell (3rd edition) pp. 599-651, Garland
- Alexander J, Vickerman K (1975) Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. J Protozool 1975 22: 502-508
- Alpuche-Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI (1992) *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 10079-10083
- Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI (1994) *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis et persist within spacious phagosomes. J Exp Med 179: 601-608
- Alpuche-Aranda CM, Berthiaume EP, Mock B, Swanson JA, Miller SI (1995) Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. Infect Immun 63: 4456-4462
- Alvarez de Toledo G, Fernandez-Chacon R, Fernandez JM (1993) Release of secretory products during transient vesicle fusion. Nature 363: 554-558
- Alvarez-Dominguez C, Barbieri AM, Beron W, Wandinger-Ness A, Stahl PD (1996) Phagocytosed live *Listeria monocytogenes* influences RAb5-regulated *in vitro* phagosome-endosome fusion. J Biol Chem 271: 13834-13843
- Alvarez-Dominguez C, Roberts R, Stahl PD (1997) Internalized *Listeria monocytogenes* modulates trafficking et delays maturation of the phagosome. J Cell Sci 110: 731-743
- Andrews HL, Vogel JP, Isberg RR (1998) Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth et evasion of the endocytic pathway. Infect Immun 66: 950-958
- Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P (1990) Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. Infect Immun 58: 779-787
- Armstrong JA, Hart PD (1971) Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observation on fusion of lysosomes with phagosomes. J Exp Med 134: 713-740

- Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I (1999) The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* 67: 469-477
- Baggiolini M, Wymann MP (1990) Turning on the respiratory burst. *Trends Biochem Sci* 15: 69-72
- Barker LP, George KM, Falkow S, Small PLC (1997) Differential trafficking of live et dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun* 65: 1497-1504
- Bates PA, Hermes I, Dwyer DM (1990) Golgi-mediated post-translational processing of secretory acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 39: 247-255
- Beron W, Colombo MI, Mayorga LS, Stahl PD (1995) *In vitro* reconstitution of phagosome-endosome fusion: evidence for regulation by heterotrimeric GTPases. *Arch Biochem Biophys* 317: 337-342
- Blocker A, Severin FF, Burkhardt JK, Bingham JB, Yu H, Olivo JC, Schroer TA, Hyman AA, Griffiths G (1997) Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol* 137: 113-129
- Blocker A, Griffiths G, Olivo JC, Hyman AA, Severin FF (1998) A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *J Cell Sci* 111: 303-312
- Brazil RP (1984) *In vivo* fusion of lysosomes with parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 87-91.
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70: 715-718
- Buchmeier NA, Heffron F (1991) Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 59: 2232-2238
- Butcher BA, Turco SJ, Hilty BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks DL (1996) Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *J Biol Chem* 1996 271: 20573-20579
- Carver MA, Turco SJ (1991) Cell-free biosynthesis of lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. Characterization of microsomal galactosyltransferase et mannosyltransferase activities. *J Biol Chem* 266: 10974-10981

- Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, Snapper M, Aisen P, Bloom BR (1989) Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2453-2457
- Chang KP, Dwyer DM (1976) Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages *in vitro*. *Science* 193: 678-680
- Channon JY, Blackwell JM (1985) A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes et amastigotes to hydrogen peroxyde. II. Possible mechanisms involved in protective H₂O₂ scavenging. *Parasitology* 91: 207-217
- Charest H, Matlashewski G (1994) Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol* 14: 2975-2984
- Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic et endocytic compartments. *Cell* 62: 317-329
- Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A, Chang KP (1989) Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J Biol Chem* 264: 7483-7489
- Clemens DL, Horwitz MA (1995) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome et evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 181: 257-270
- Cooper J, Walker RD (1998) Listeriosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 14: 113-125
- Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL (1989) CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol* 143: 617-622
- de Carvahlo L, de Souza W (1989) Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during internalization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 36: 164-170
- de Chastellier C, Frehel C, Offredo C, Skamene E (1993) Implication of phagosome-lysosome fusion in restriction of *Mycobacterium avium* growth in bone marrow macrophages from genetically resistant mice. *Infect Immun* 61: 3775-3784
- de Chastellier C, Lang T, Thilo L (1995) Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, *Mycobacterium avium*, in comparison to

phagosomes which contain *Bacillus subtilis* or latex beads. *Eur J Cell Biol* 68: 167-182

Deretic V, Via LE, Fratti RA, Deretic D (1997) Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, et intracellular trafficking. *Electrophoresis* 18: 2542-2547

Dermine JF, Desjardins M (1999) Survival of intracellular pathogens within macrophages (Protoplasma, en cours de révision)

Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ (1992) Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 1992 149: 3008-3015

Descoteaux A, Luo Y, Turco SJ, Beverley SM (1995) A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 269: 1869-1872

Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G (1994a) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124: 677-688

Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA (1994b) Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* 269: 32194-32200

Desjardins M (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* 5: 183-186

Desjardins M, Descoteaux A (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 185: 2061-2068

Desjardins M, Nzala NN, Corsini R, Rondeau C (1997) Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* 110 : 2303-2314

Dunn WA (1990a) Studies on the mechanism of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 110: 1923-1933

Dunn WA (1990b) Studies on the mechanism of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 110: 1935-1945

Easterbrook MD, Levy MH, Gomez AM, Turco SJ, Epanand RM, Rosenthal KL (1995) Inhibition of HIV-1-induced syncytia formation et infectivity by lipophosphoglycan from *Leishmania*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 10: 496-505

Ehlers MR, Daffe M (1998) Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* et host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol* 6: 328-335

Eilam Y, El-On J, Spira DT (1985) *Leishmania major*: excreted factor, calcium ions, et the survival of amastigotes. *Exp Parasitol* 59: 161-168

El-On J, Bradley DJ, Freeman JC (1980) *Leishmania donovani*: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. *Exp Parasitol* 49: 167-174

Farago A, Nishizuka Y (1990) Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS Lett* 268: 350-354

Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane trafic. *J Cell Biol* 31: 1435-1452

Finlay BB (1994) Cell biology of *Salmonella* pathogenesis. In: Miller VL, Kaper JB, Portnoy DA, Isberg RR (eds) *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, pp 249-261

Finlay BB, Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 136-169

Francis CL, Starnbach MN, Falkow S (1992) Morphological et cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol Microbiol* 6: 3077-3087

Franke ED, McGreevy PB, Katz SP, Sacks DL (1985) Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 134: 2713-2718

Frankenburg S, Leibovici V, Mansbach N, Turco SJ, Rosen G (1990) Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J Immunol* 145: 4284-4289

Frenchick PJ, Markham RJ, Cochrane AH (1985) Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 46: 332-335

Garcia-del Portillo F, Finlay BB (1995) Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* 129: 81-97

Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S, Sansonetti P (1987) *In vitro* model of penetration et intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* 55: 2822-2829

Geoffroy C, Gaillard JL, Aloug JE, Berche P (1987) Purification, characterization et toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 55: 1641-1646

Giorgione JR, Turco SJ, Epanand RM (1996) Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11634-11639

Glaser TA, Mukkada AJ (1992) Proline transport in *Leishmania donovani* amastigotes: dependence on pH gradients and membrane potential. *Mol Biochem Parasitol* 51: 1-8

Gordon AH, Hart PD, Young MR (1980) Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286: 79-80

Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J (1991) Rab5 controls early endosome fusion *in vitro*. *Cell* 64: 915-925

Greenberg S, Silverstein SC (1993) *Fundamental immunology* (Ed. Paul WE), pp. 941-964, Raven Press

Griffin FM Jr, Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC (1975) Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* 142: 1263-1282

Handman E, Goding JW (1985) The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J* 4: 329-336

Hart PD, Young MR, Jordan MM, Perkins WJ, Geisow MJ (1983) Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. A combined microscopic et computer study. *J Exp Med* 158: 477-492

Herrera EM, Ming M, Ortega-Barria E, Pereira ME (1994) Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells et penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 65: 73-83

High N, Mounier J, Prévost MC, Sansonetti PJ (1992) IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells et escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J* 11: 1991-1999

Homans SW, Mehlert A, Turco SJ (1992) Solution structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry* 31: 654-661

Horwitz MA (1983a) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 158: 2108-2126

- Horwitz MA (1983b) Formation of a novel phagosome by Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* 158: 1319-1331
- Horwitz MA (1984) Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 36: 27-33
- Horwitz MA, Maxfield FR (1984) *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* 99: 1936-1943
- Houslay MD (1991) 'Crosstalk': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur J Biochem* 195: 9-27
- Huang C, Turco SJ (1993) Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 268: 24060-24066
- Ilg T, Stierhof YD, Wiese M, McConville MJ, Overath P (1994) Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*. *Parasitology* 108 Suppl: S63-71
- Ishibashi Y, Arai T (1990) Specific inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella typhimurium* infections. *FEMS Microbiol Immunol* 64: 3745-3752
- Joiner KA, Furhman SA, Miettinen H, Kasper LL, Mellman I (1990) *Toxoplasma gondii*: Fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249: 641-646
- Joiner KA (1992) The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Toxoplasma gondii*: a specialized interface between parasite and cell. In: Smith JL (ed.) *Toxoplasmosis*. Springer-Verlag, Berlin, pp 73-81
- Jones TC, Hirsch JG (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med* 136: 1157-1172
- Kirby JE, Isberg RR (1998) Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. *Trends Microbiol* 6: 256-258
- Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL, Isberg RR (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Micro* 27: 323-326
- Lang T, Hellio R, Kaye PM, Antoine JC (1994) *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and

potential role of this organite in antigen presentation. *J Cell Sci* 107: 2137-2150

Leimeister-Wacher M, Domann E, Chakraborty T (1991) Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is coordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 5: 361-366

Ma D, Russell DG, Beverley SM, Turco SJ (1997) Golgi GDP-mannose uptake requires *Leishmania* LPG2. A member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. *J Biol Chem* 272: 3799-3805

Martin I, Turco SJ, Epand RM, Ruyschaert JM (1998) Lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* inhibits lipid vesicle fusion induced by the N-terminal extremity of viral fusogenic simian immunodeficiency virus protein. *Eur J Biochem* 258: 150-156

Mauel J (1984) Intracellular parasite killing induced by electron carriers. I. Effect of electron carriers on intracellular *Leishmania* spp. in macrophages from different genetic backgrounds. *Mol Biochem Parasitol* 13: 83-96

Mayorga LS, Bertini F, Stahl PD (1991) Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells et in a cell-free system. *J Biol Chem* 266: 6511-3517

McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MA, Homans SW (1990) Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 265: 19611-19623

McConville MJ, Blackwell JM (1991) Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote et amastigote glycolipids. *J Biol Chem* 266: 15170-15179

McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium et demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 297: 1197-1203

McNeely TB, Turco SJ (1990) Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol* 144: 2745-2750

McNeely TB, Tolson DL, Pearson TW, Turco SJ (1990) Characterization of *Leishmania donovani* variant clones using anti-lipophosphoglycan monoclonal antibodies. *Glycobiology* 1: 63-69

Menard R, Dehio C, Sansonetti PJ (1996) Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol* 4: 220-226

Mengaud J, Braun-Breton C, Cossart P (1991) Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*, a novel type of virulence factor? *Mol Microbiol* 5: 367-372

Méresse S, Gorvel JP, Chavrier P (1995) The GTPase rab7 is involved in the transport between late endosomes et lysosomes. *J Cell Sci* 108: 3340-3358

Miao L, Stafford A, Nir S, Turco SJ, Flanagan TD, Epand RM (1995) Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry* 34: 4676-4683

Mordue DG, Sibley LD (1997) Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation et depends on the mechanism of entry. *J Immunol* 159: 4452-4459

Mosser DM, Edelson PJ (1985) The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 135: 2785-2789

Mosser DM, Rosenthal LA (1993) *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands et diverse cellular responses. *Semin Cell Biol* 4: 315-322

Oh YK, Alpuche-Aranda C, Berthiaume E, Jinks T, Miller SI, Swanson J (1996) Rapid et complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64: 3877-3883

Orlandi PA Jr, Turco SJ (1987) Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 262: 10384-10391

Pacheco-Soares C, De Souza W (1998) Redistribution of parasite et host cell membrane components during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Struct Funct* 23: 159-168

Pimenta PF, Saraiva EM, Sacks DL (1991) The comparative fine structure et surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol* 72: 191-204

Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL (1992) Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256: 1812-1815

Pimenta PF, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL (1994) Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9155-9156

Pitt A, Mayorga LS, Stahl PD, Schwartz AL (1992) Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest* 90: 1978-1983

Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP (1998a) Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion et is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* 66: 2387-2392

Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot FG, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, Moreno E, Gorvel JP (1998b) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway et replicates in the endoplasmic reticulum of non-professional phagocytes. *Infect Immun* 66: 5711-5724

Portnoy DA, Jacks PS, Hinrichs DJ (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 167: 1459-1471

Prina E, Antoine JC, Wiederanders B, Kirschke H (1990) Localization et activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect Immun* 58: 1730-1737

Privé C, Descoteaux A *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of macrophages. (Soumis)

Puentes SM, Sacks DL, da Silva RP, Joiner KA (1988) Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 167: 887-902

Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA (1989) Binding et release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol* 143: 3743-3749

Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* 145: 4311-4316

Pupkis MF, Tetley L, Coombs GH (1986) *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosomes. *Exp Parasitol* 62: 29-39

Rabinovitch M, Topper G, Cristello P, Rich A (1985) Receptor-mediated entry of peroxidases into the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania Mexicana amazonensis*. *J Leukoc Biol* 37: 247-261

Rabinovitch M (1995) Professional et non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5(3): 85-87

Rabinowitz S, Horstmann H, Gordon S, Griffiths G (1992) Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 116: 95-112

Rasmusson BJ, Flanagan TD, Turco SJ, Epand RM, Petersen NO (1998) Fusion of Sendai virus and individual host cells and inhibition of fusion by lipophosphoglycan measured with image correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1404: 338-352

Rathman M, Sjaastad MD, Falkow S (1996) Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun* 64: 2765-2773

Rathman M, Barker LP, Falkow S (1997) The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect Immun* 65: 1475-1485

Reiner NE, Kazura JW (1982) Oxidant-mediated damage of *Leishmania donovani* promastigotes. *Infect Immun* 36: 1023-1027

Rittig MG, Jagoda JC, Wilske B, Murgia R, Cinco M, Repp R, Burmester GR, Krause A (1998a) Coiling phagocytosis discriminates between different spirochetes et is enhanced by phorbol myristate acetate et granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun* 66:627-635

Rittig MG, Schroppel K, Seack KH, Sander U, N'Diaye EN, Maridonneau-Parini I, Solbach W, Bogdan C (1998b) Coiling phagocytosis of trypanosomatids et fungal cells. *Infect Immun* 66: 4331-4339

Rohrer J, Schweizer A, Russell D, Kornfeld S (1996) The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol* 132: 565-576

Rothman JE, Orci L (1992) Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355: 409-415

Rothman JE, Warren G (1994) Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol* 4: 220-233

Roy CR, Isberg RI (1997) Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect Immun* 65: 571-578

Roy CR, Berger KH, Isberg RR (1998) *Legionella pneumophila* DotA is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Micro* 28: 663-674

Russell DG, Xu S, Chakraborty P (1992) Intracellular trafficking et the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Cell Sci* 103:1193-1210.

Russell DG, Dant J, Sturgill-Koszycki S (1996) *Mycobacterium avium*-and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from host cell plasmalemma. *J Immun* 156: 4764-4773

Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J, Turco SJ, Zilberstein D (1998) Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 95: 9-20

Sacks DL, Perkins PV (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417-1419

Sacks DL, Perkins PV (1985) Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 34: 456-459

Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ (1995) Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181: 685-697

Schlein Y, Schnur LF, Jacobson RL (1990) Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 353-355

Scianimanico S, Desrosiers M, Dermine JF, Méresse S, Descoteaux A, et Desjardins M (1999) Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* (sous presse)

Seay MB, Heard PL, Chaudhuri G (1996) Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect Immun* 64: 5129-5137

Segal G, et Shuman HA (1998) How is the intracellular fate of *Legionella pneumophila* phagosome determined? *Trends Microbiol* 6: 253-255

Shepherd VL, Stahl PD, Bernd P, Rabinovitch M (1983) Receptor-mediated entry of beta-glucuronidase into the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Exp Med* 157: 1471-1482

Sherry B, Cerami A (1988) Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, et autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol* 107: 1269-1277

Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315: 416-419

Sinai AP, Joiner KA (1997) Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol* 51: 415-462

Sinai AP, Webster P, Joiner KA (1997) Association of host cell endoplasmic reticulum et mitochondria with *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* 110: 2117-2128

Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324

St-Denis A, Caouras V, Gervais F, Descoteaux A (1999) Role of PKC- α in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J Immunol* (sous presse)

Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG (1996) *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes et reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J* 15: 6960-6968

Swanson JA et Baer SC (1995) Phagocytosis by zippers et triggers. *Trends Cell Biol* 5: 89-93

Swanson MS, Isberg RR (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* 63: 3609-3620

Talamas-Rohana P, Wright SD, Lennartz MR, Russell DG (1990) Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 et LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol* 144: 4817-4824

Thomas JR, McConville MJ, Thomas-Oates JE, Homans SW, Ferguson MA, Gorin PA, Greis KD, Turco SJ (1992) Refined structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 267: 6829-6933

Tolson DL, Turco SJ, Beecroft RP, et Pearson TW (1989) The immunochemical structure et surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 35: 109-118

Tolson DL, Turco SJ, Pearson TW (1990) Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 58: 3500-3507

Trotter PJ, Voelker DR (1994) Lipid transport processes in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1213: 241-262

Turco SJ, Hull SR, Orlandi PA Jr, Shepherd SD, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW (1987) Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemistry* 26: 6233-6238

Turco SJ, Orlandi PA Jr, Homans SW, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW (1989) Structure of the phosphosaccharide-inositol core of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 264: 6711-6715

Turco SJ (1990) The leishmanial lipophosphoglycan: a multifunctional molecule. *Exp Parasitol* 70: 241-245

Turco SJ, Descoteaux A (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 46: 65-94

Unanue ER, Allen PM (1987) The basis for the immunoregulatory role of macrophages et other accessory cells. *Science* 236: 551-557

Vance JE, Shiao YJ (1996) Intracellular trafficking of phospholipids: import of phosphatidylserine into mitochondria. *Anticancer Res* 16: 1333-1340

Vasquez-Boland JA, Kocks C, Dramsi S, Ohayon H, Geoffroy C, Mengaud J, Cossart P (1992) Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* et possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* 60: 219-230

Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V (1997) Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 et rab7. *J Biol Chem* 272: 13326-13331

Vogel JP, Andrew HL, Wong SK, Isberg RR (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279: 873-875

Wright SD, Silverstein SC (1983) Receptors for C3b et C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med* 158: 2016-2023

Wilkins MR, Pasquali, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphrey-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* 14: 61-65

Wilson ME, Pearson RD (1986) Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol* 136: 4681-4688

Wilson ME, Pearson RD (1988) Roles of CR3 et mannose receptors in the attachment et ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 56: 363-369

Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, Allen P, Russell DG (1994) Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol* 153: 2568-2578

Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48: 449-470

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Michel Desjardins pour m'avoir accordé sa confiance et permis de réaliser ce travail dans son laboratoire, Christiane Rondeau pour son indispensable soutien technique et relecture de ce mémoire, Sandra Scianimanco pour sa supervision au début de mon projet, Jean Léveillé pour ses services photographiques et Albert Descoteaux pour sa collaboration sur le projet et ses conseils sur la culture de *Leishmania*.

Je remercie aussi mon père Jacques Dermine pour la relecture et correction du français de ce mémoire, Roberto Diez, Sophie Duclos et Martine Quintal pour la relecture critique de ce travail et de judicieux conseils.