

Université de Montréal

**Étude protéomique et fonctionnelle des mécanismes de
présentation croisée des antigènes exogènes dans les
macrophages**

par

Mathieu Houde

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en pathologie et biologie cellulaire

Décembre 2004

© Mathieu Houde, 2004

W

4

U58

2005

V.026

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude protéomique et fonctionnelle des mécanismes de présentation croisée des antigènes
exogènes dans les macrophages

présentée par :
Mathieu Houde

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Lucian Ghitescu, président-rapporteur
Michel Desjardins, directeur de recherche
Jacques Thibodeau, membre du jury
Geneviève Milon, examinateur externe
et Stephen Michnick, représentant du doyen de la FES



Résumé

La phagocytose est le mécanisme que certaines cellules ont acquis pendant l'évolution afin d'internaliser de larges particules tels des débris minéraux, des corps apoptotiques ainsi que des pathogènes dans le but de les tuer et les dégrader. Les cellules qui effectuent la phagocytose de façon routinière sont appelées phagocytes professionnels et constituent la première ligne de défense dans l'immunité innée. Chez les mammifères, les phagocytes professionnels sont composés de trois types cellulaires, soit les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Les particules internalisées par les phagocytes professionnels se retrouvent dans un organelle appelé phagosome, qui interagit avec les organelles de la voie endocytairre, les endosomes et les lysosomes, afin d'acquérir graduellement les éléments qui lui permettront d'effectuer ses fonctions cellulaires. Parmi ces fonctions, on retrouve la microbicidité envers les pathogènes phagocytés causée par la synthèse de réactifs oxygénés toxiques et la dégradation protéique par les protéases. Une autre fonction du phagosome est d'apprêter les peptides exogènes provenant de la dégradation des pathogènes sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, qui sont ensuite transportées à la surface du phagocyte afin de stimuler les lymphocytes T CD4⁺ et déclencher la réponse immunitaire adaptée spécifique contre les pathogènes phagocytés.

L'objectif du travail décrit ici était d'utiliser la protéomique afin de caractériser au niveau du macrophage le protéome du phagosome et de découvrir de nouvelles fonctions rattachées à cet organelle. Dans les résultats rapportés ici, nous décrivons les événements moléculaires impliqués dans la présentation croisée, qui permettent au phagosome d'apprêter des peptides exogènes sur les molécules du CMH de classe I, ce qui permet la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Les lymphocytes T cytotoxiques jouent un rôle important dans le contrôle des infections en reconnaissant les cellules infectées de

l'hôte et en éliminant celles-ci. Dans ce nouveau modèle de présentation croisée d'antigènes exogènes que nous décrivons ici, le phagosome est auto-suffisant pour toutes les étapes de la présentation croisée. Nous avons ainsi divisé la présentation croisée en cinq étapes: (1) la rétrotranslocation des antigènes exogènes de la lumière du phagosome au cytosol, (2) l'ubiquitination des antigènes exogènes dans le cytosol, (3) la dégradation par le protéasome recruté au phagosome des antigènes exogènes dans le cytosol, (4) la retranslocation à l'intérieur du phagosome des peptides exogènes générés et (5) le chargement à l'intérieur du phagosome des peptides exogènes sur le CMH de classe I, puis le transport du complexe peptide:CMH de classe I à la surface. Dans la deuxième partie du travail présenté ici, nous décrivons comment l'interféron- γ , une cytokine jouant un rôle important dans la stimulation des cellules du système immunitaire, modifie la composition protéique du phagosome afin de rendre celui-ci plus efficace dans ses diverses fonctions. Parmi les fonctions stimulées par l'interféron- γ au niveau du phagosome, on note l'augmentation de la microbicité envers les pathogènes, de la dégradation protéique, des interactions avec les endosomes et de la présentation antigénique.

Mots-clés : phagocytose, phagosome, système immunitaire, antigène, pathogène, présentation croisée, interféron-gamma, macrophage, protéomique

Abstract

Phagocytosis is a mechanism that certain cells have acquired during evolution to internalize large particles like mineral fragments, apoptotic bodies and pathogens so they can be killed and degraded. Cells that are routinely using phagocytosis are named professional phagocytes and form the first line of defence in innate immunity. In mammals, professional phagocytes are composed of three cellular types, the macrophages, the dendritic cells and the neutrophils. The particles internalized by professional phagocytes are found in an organelle named phagosome, which interacts with the organelles from the endocytic pathway, the endosomes and lysosomes, so it can gradually acquire the elements that will allow it to perform its cellular functions. These functions include microbicide against phagocytosed pathogens caused by the synthesis of reactive oxygen species and protein degradation by proteases. Another function of the phagosome is to process exogenous peptides from pathogen degradation on molecules of the class II major histocompatibility complex (MHC), which are then transported to the phagocyte surface so they can stimulate CD4⁺ T-lymphocytes and promote the adaptive immune response against the phagocytosed pathogens.

The objective of the work described here was to use proteomics to characterize in macrophage the phagosome proteome and discover new functions linked to this organelle. In the results reported here, we describe the molecular events implicated in cross-presentation, which allow the phagosome to process exogenous peptides on MHC class I molecules so that CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes can be stimulated. The cytotoxic T-lymphocytes play an important role in the control of infections by recognizing infected cells of the host and eliminating them. In this new model of exogenous antigen cross-presentation that we describe here, the phagosome is self-sufficient for all the steps of cross-presentation. We have thus divided cross-presentation in five steps: (1)

retrotranslocation of exogenous antigens from the phagosome lumen to the cytosol, (2) ubiquitination of exogenous antigens in the cytosol, (3) degradation by the proteasome recruited to phagosome of exogenous antigens in the cytosol, (4) retranslocation inside the phagosome of generated exogenous peptides and (5) loading within the phagosome of exogenous peptides on MHC class I, and transport of the peptide:MHC class I complex to the surface. In the second part of the work presented here, we describe how interferon- γ , a cytokine playing an important role in the stimulation of cells of the immune system, modifies the protein composition of the phagosome to make it more efficient in its various functions. Among the functions stimulated by interferon- γ in the phagosome, we note the increase of microbicity against pathogens, of protein degradation, of interactions with endosomes and of antigen presentation.

Keywords : phagocytosis, phagosome, immune system, antigen, pathogen, cross-presentation, interferon-gamma, macrophage, proteomics

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Liste des abbréviations.....	xiv
Remerciements.....	xix
Chapitre I. Introduction et revue de littérature.....	1
1. Contexte historique	1
2. Le système immunitaire	2
2.1 Les cellules du système immunitaire	4
2.1.1 Le progéniteur myéloïde	4
2.1.1.1 Les granulocytes.....	4
2.1.1.2 Les macrophages.....	5
2.1.1.3 Les cellules dendritiques.....	5
2.1.1.4 Les mastocytes	6
2.1.2 Le progéniteur lymphoïde commun	6
2.1.2.1 Les lymphocytes B.....	7
2.1.2.2 Les lymphocytes T	8
2.1.2.2.1 Les lymphocytes T CD4 ⁺	8
2.1.2.2.2 Les lymphocytes T CD8 ⁺	9
2.1.2.3 Les cellules NK.....	10
3. La phagocytose.....	12
3.1 Rôle des récepteurs de la membrane plasmique dans la phagocytose	13
3.2 Phagocytose médiée par le réticulum endoplasmique	14
3.3 Biogenèse des phagosomes	16

3.3.1	Rôle de la petite GTPase Rab5 dans la maturation des phagosomes.....	17
3.3.2	Rôle des radeaux lipidiques dans la maturation des phagosomes.....	19
4.	La présentation d'antigènes	24
4.1	La présentation d'antigènes par le CMH de classe I.....	25
4.1.1	Structure du complexe de chargement du peptide sur le CMH de classe I.....	25
4.1.2	Structure du protéasome 26S	25
4.1.3	Polyubiquitination des protéines.....	27
4.1.4	Apprêtement des antigènes endogènes pour la présentation par le CMH de classe I.....	28
4.2	La présentation d'antigènes par le CMH de classe II	29
5.	La présentation croisée d'antigènes exogènes	31
5.1	Voies de présentation croisée d'antigènes exogènes	32
5.2	Premier modèle : la régurgitation.....	34
5.3	Deuxième modèle : la voie phagosome-au-cytosol	36
5.4	La stimulation croisée <i>in vivo</i> des CD8 ⁺ par des antigènes exogènes.....	38
6.	L'interféron- γ	40
6.1	Les classes d'interférons	41
6.2	Le récepteur de l'interféron- γ	43
6.3	La transduction de signaux activés par l'interféron- γ	43
6.4	Les effets cellulaires de l'interféron- γ	45
6.4.1	Effets sur la présentation d'antigènes par le CMH de classe I.....	45
6.4.2	Effets sur la présentation d'antigènes par le CMH de classe II	46
6.4.3	Effets sur le développement de la réponse T _H 1	46
6.4.4	L'état antiviral induit par l'interféron- γ	47
6.4.5	Effets sur le cycle cellulaire, la croissance et l'apoptose.....	48
6.5.6	Activation des fonctions effectrices microbicides	49
6.5.6.1	Activation du système de la NADPH oxydase	50
6.5.6.2	Induction de la production de NO.....	50

6.5.7 Effets sur le trafic des lymphocytes	51
6.5.8 Effets sur la réponse au LPS par les macrophages.....	52
7. Objectifs et hypothèses de recherche	53
Chapitre II : Résultats, Article 1	55
Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation	56
Chapitre II : Résultats, Article 2	83
Modulation of phagosome functional properties by interferon- γ	84
Chapitre III: Discussion	136
La phagocytose est un processus clé de l'immunité innée.....	136
La phagocytose est un processus avantageux d'un point de vue évolutif.....	137
La phagocytose permet d'effectuer un lien entre l'immunité innée et la réponse immunitaire adaptée	138
Un nouveau modèle de présentation croisée des antigènes exogènes au niveau du phagosome	141
La rétrotranslocation des antigènes exogènes	144
L'ubiquitination des antigènes exogènes et le recrutement de protéasomes aux phagosomes	144
Le lien manquant?	147
La translocation par TAP des peptides exogènes et le complexe de chargement des peptides sur le CMH de classe I dans les phagosomes	147
Les phagosomes sont des organelles autonomes pour la formation de complexes peptide:CMH de classe I	149
Le transport du complexe peptide:CMH de classe I à la surface cellulaire	151
Les phagosomes versus les endosomes dans la présentation croisée d'antigènes exogènes	152
La protéomique est un outil primordial pour l'étude des propriétés fonctionnelles du phagosome modulé par l'interféron- γ	154
La modification du protéome du phagosome suivant une stimulation des	

macrophages par l'interféron- γ corrèle avec une augmentation de la microbicité et des interactions entre le phagosome et les organelles de la voie endocytaire.....	156
Conclusion	159
Bibliographie.....	160

Liste des tableaux

Chapitre II. Résultats, article 1

Table 1. Cross-presentation processing proteins identified from MS-MS analysis of phagosome.	79
Table 2. Protein identification from iterative LC-MS-MS analysis of phagosome-associated polypeptides isolated by affinity for the S5A subunit of the proteasome...	81

Chapitre II. Résultats, article 2

Table 1. 2-D proteome map of the phagosome	126
Table 2. Functions of proteins of the 2-D proteome map of the phagosome.....	130
Table 3. Positive modulation of phagosomal proteins by interferon- γ	134
Table 4. Functions of proteins positively modulated by interferon- γ	135

Liste des figures

Chapitre I. Introduction et revue de littérature

Figure 1. Les cellules du système immunitaire.....	3
Figure 2. Transduction de signaux associés à la phagocytose via le récepteur Fc.....	11
Figure 3. Phagocytose médiée par le réticulum endoplasmique et biogenèse des phagosomes.....	15
Figure 4. Distribution hétérogène des protéines du phagosome dans des radeaux lipidiques.....	18
Figure 5. Structure du complexe de chargement des peptides.....	20
Figure 6. Structure du protéasome 26S.....	21
Figure 7. Cycle de polyubiquitination des protéines.....	22
Figure 8. Apprêtement des antigènes endogènes pour la présentation par le CMH de classe I.....	23
Figure 9. Modèles de présentation croisée d'antigènes exogènes.....	33
Figure 10. Transduction de signaux activés par l'interferon- γ	42

Chapitre II. Résultats, article 1

Figure 1. Exogenous proteins internalized by phagocytosis are retrotranslocated to the cytoplasmic side of phagosomes.....	73
Figure 2. Proteasomes are present on phagosomes.....	74
Figure 3. Ubiquitinated proteins associate with proteasomes on the cytoplasmic side of phagosomes.....	75

Figure 4. Exogenous proteins loaded in phagosomes can be presented by MHC class I complexes at the surface of macrophages and trigger a TAP-dependent CD8 ⁺ T-cell response.....	76
---	----

Chapitre II. Résultats, article 2

Figure 1. Interferon- γ promotes microbicidal and antigen presentation pathways in macrophages.....	118
Figure 2. Establishment of a 2-D proteome map of the phagosome.....	119
Figure 3. Positive modulation of phagosomal proteins by interferon- γ	121
Figure 4. Degradation of <i>Leishmania donovani</i> is accelerated in macrophages stimulated by interferon- γ	124
Figure 5. Improvement of early-phagosome acidification by interferon- γ	125

Chapitre III. Discussion

Figure 11. Modèles actuels de présentation croisée d'antigènes exogènes	140
Figure 12. Modèle de l'auto-suffisance des phagosomes pour la présentation croisée d'antigènes exogènes	143
Figure 13. Le phagosome virtuel	153

Liste des abréviations

ADP	Adenosine-5'-diphosphate
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
ATPase	Adenosine-5'-triphosphatase
BFA	Brefeldine A
BSA	Albumine de sérum bovin
BCR	récepteur d'antigène des cellules B
C3b	sous-unité 3b du complément
CD	Clusters of differentiation
CDK	Kinase cycline-dependante
CeCl ₃	Perhydroxyde de cérium
CKI	Inhibiteur de kinase cycline-dependante
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTL	Lymphocyte T CD8 ⁺ cytotoxique
Cys	Cystéine
DAG	Diacylglycérol
EBNA1	Antigène nucléaire 1 du virus Epstein-Barr
EEA1	Antigen 1 de l'endosome précoce
ER	Réticulum endoplasmique
ERAP	Aminopeptidase du réticulum endoplasmique
ERAD	Dégradation de protéines associées au réticulum endoplasmique
FcγR	Recepteur de la portion Fc de l'immunoglobuline G
GAS	Sites activés par l'interferon-γ
H ⁺	Ion hydrogène, ou proton
HRP	Horseradish peroxidase

Ii	Chaîne invariante
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
IFN- γ	Interféron- γ
IFNAR	Récepteur d'interféron- α , β , ω , τ
IFNGR	Récepteur d'interféron- γ
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
Ink	Inactivateur de CDK
iNOS	Synthetase inductible d'oxyde nitrique
IP-10	Protéine de 10 kD inductible par l'interféron- γ
IP3	Inositol triphosphate
IRF	Facteur régulateur d'interféron
ISRE	Éléments de réponse stimulés par l'interféron
ITAM	Motif d'activation tyrosine de la famille de gène immunoglobuline
Jak	Janus kinase
kDa	KiloDaltons
LAMP	Protéine membranaire associée au lysosome
LAP	Leucine aminopeptidase
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysine
μm	Micron(s)
MCP-1	Protéine chimioattractante de monocyte 1
MIP-1	Protéine inflammatoire de Macrophage 1
Na^+	Ion sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NF- κB	Facteur nucléaire- κB
nm	Nanomètre(s)

NK	Natural killer
NKT	Natural killer T cell
NO	Oxyde Nitrique
NSF	Facteur sensible au N-ethylmaleimide
OVA	Ovalbumine
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PI(4)P	Phosphatidylinositol 4-phosphate
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
pRb	Protéine du rétinoblastome
RANTES	Regulated-upon-activation normal T cell expressed and secreted
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèces oxygénées réactives
SIINFEKL	Séquence d'acides aminés 257 à 264 de l'ovalbumine
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
Stat	Signal transducteur et activateur de transcription
TAP	Transporteur associé avec la présentation d'antigène
TCR	Récepteur d'antigène des cellules T
TLR	Récepteur Toll-like
TNF- α	Facteur nécrosant des tumeurs- α
TOP	Thimet oligopeptidase
TPPII	Tripeptidyl peptidase II
t-SNARE	Cible associée aux SNARE
v-ATPase	Proton-ATPase vacuolaire

VCAM	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires
v-SNARE	Vésicule associée aux SNARE
WT	Wild-type

À mon épouse Meldra, ma famille, Raymond, Micheline, Vanessa, Jonathan et Jessica, et tous mes amis et collègues qui m'ont accompagné et appuyé au cours de mon doctorat. Ce fut sans aucun doute les meilleures années de ma vie (jusqu'à maintenant).

Remerciements

J'aimerais profiter de l'occasion pour remercier mon directeur de recherche, Michel Desjardins, qui m'a accueilli avec enthousiasme dans son laboratoire. C'est lui qui m'a réellement donné la piqûre pour la recherche et qui m'a démontré qu'avec le travail et la confiance en soi, il n'y a pas de limite à ce qu'on peut accomplir. J'aimerais également remercier mes collègues au laboratoire, Jean-François Dermine, Guillaume Goyette, Sophie Duclos, François St-Louis, Jonathan Boulais, Luc English, Sylvain Brunet, Isabelle Jutras, Pascale Gueirard, Christiane Rondeau et Annie Laplante qui m'ont fourni un environnement chaleureux lors de mes études et qui m'ont assisté dans toutes mes réalisations. J'aimerais remercier ma famille, Raymond, Micheline, Vanessa, Jonathan et Jessica qui m'ont apporté leur support tout au long de mes années études (et ce fut long!), autant moralement que financièrement. Finalement, j'aimerais remercier plus particulièrement l'amour de ma vie, Meldra Apinane, qui a complètement transformé et donné un sens à ma vie. L'âme sœur existe vraiment et je l'ai trouvé en Meldra.

Chapitre I. Introduction et revue de littérature

1. Contexte historique

L'immunologie est une science relativement récente en termes historiques. Son origine est attribuée à Edward Jenner qui découvrit en 1796 qu'on pouvait induire une protection immunitaire contre la variole humaine en traitant des patients avec des extraits atténués de variole bovine, aussi appelée vaccinia (Razzell, 1980). Cette procédure fut ainsi baptisée vaccination. Deux siècles plus tard, en 1979, la variole humaine fut complètement éradiquée dans ce qui a été décrit comme le plus grand triomphe de la médecine moderne (Janeway *et al.*, 2001). L'immunologie connaîtra une deuxième avancée importante en 1880 avec la conception par Louis Pasteur d'un vaccin contre le choléra chez le poulet et surtout, d'un vaccin contre la rage chez l'humain (Pastoret et Brochier, 1996). En 1890, Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato découvrirent que le sérum d'individus vaccinés contenait une substance qu'ils appelèrent anticorps, qui possède notamment la propriété de se lier spécifiquement au pathogène (Von Behring et Kitasato, 1890). C'est également à cette époque fructueuse pour la science, en 1891, que Robert Koch démontra que les maladies infectieuses sont causées par des microorganismes pathogènes, chacun étant responsable d'une pathologie particulière (Mazumdar, 2003). Les pathogènes ont ainsi été classés en quatre catégories : (1) les virus, (2) les bactéries, (3) les champignons et (4) les parasites eukaryotes complexes. Suite aux travaux de Koch, on assiste à la naissance d'une nouvelle science, la microbiologie

2. Le système immunitaire

Le système immunitaire des mammifères peut être divisé en deux selon le type de réponse impliquée : l'immunité innée et la réponse immunitaire adaptée. L'immunité innée inclut le complément, les granulocytes et les phagocytes, et se traduit par une protection non spécifique contre les pathogènes (Paul, 2003 ; Janeway *et al.*, 2001). La réponse immunitaire adaptée inclut entre autres la production d'anticorps et de lymphocytes, et se produit suite à l'infection par un pathogène de l'hôte (Paul, 2003 ; Janeway *et al.*, 2001). Au cours de la réponse immunitaire adaptée, on peut noter deux types de sous-réponses, soit la réponse humorale dans laquelle des anticorps neutralisants sont produits, et la réponse à médiation cellulaire où des anticorps opsonisants sont produits et au cours de laquelle des macrophages sont activés. La réponse immunitaire adaptée se traduit dans plusieurs cas par une protection spécifique et durable contre la réinfection par le même pathogène. Ces deux types de réponses principales constituent respectivement la première ligne et la deuxième ligne de défense contre les agents pathogènes pouvant infecter l'hôte. Il existe également une troisième ligne de défense qui forme une barrière physique contre les intrusions extérieures et qui comprend les cellules épithéliales de la peau, du système respiratoire, du tractus gastro-intestinal et urino-génital (Janeway *et al.*, 2001). De plus, les cellules épithéliales peuvent sécréter des substances chimiques microbicides ou inhibitrices de la croissance des pathogènes. Par exemple, un type de cellules spécifiques de l'épithélium intestinal, les cellules de Paneth, sécrètent des peptides antibactériens et antifongiques appelés α -défensines (Ouellette, 1999). Ce type de peptides semble particulièrement répandu chez les insectes.

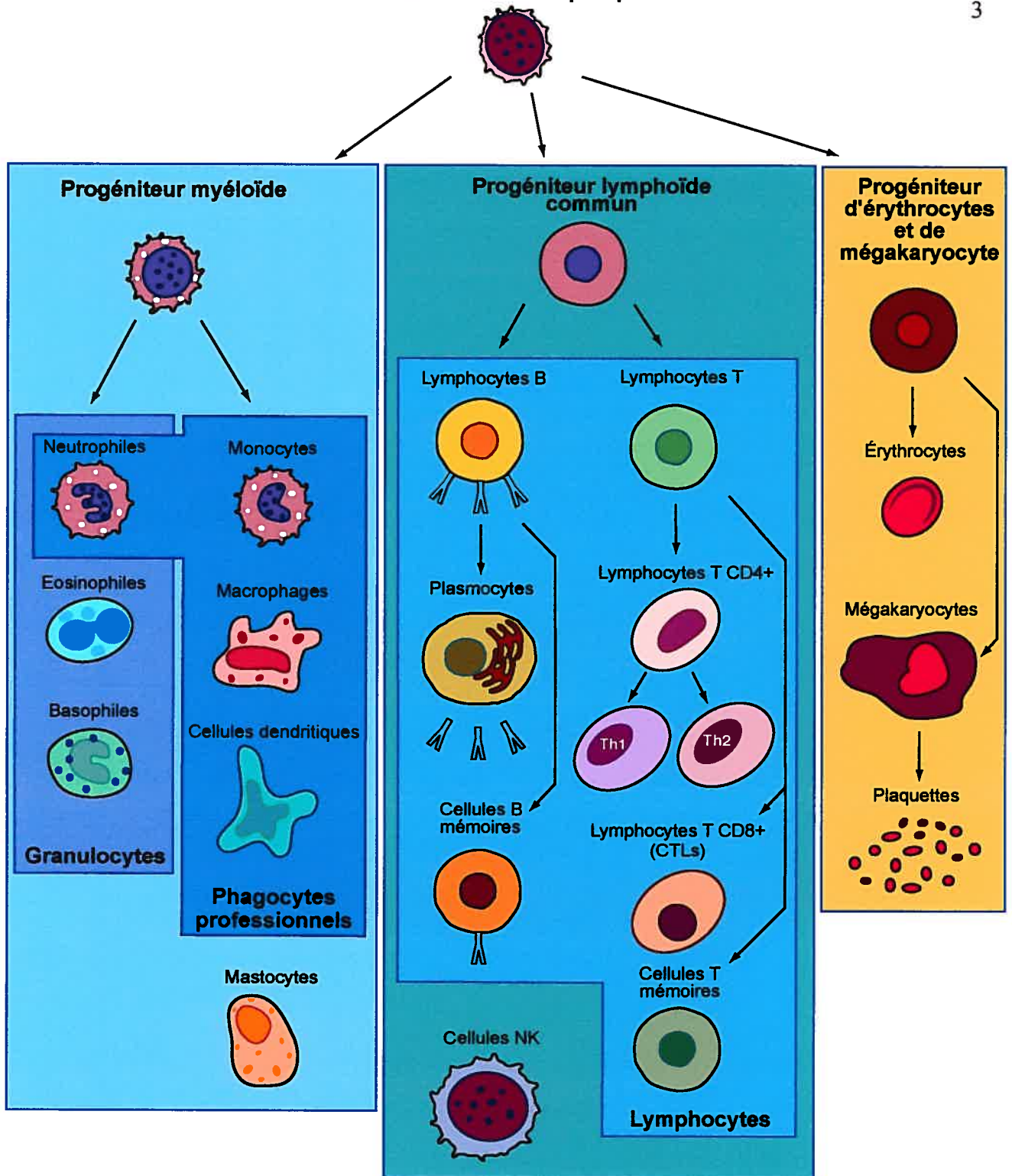


Figure 1. Les cellules du système immunitaire

Les cellules du système immunitaire originent des cellules souches pluripotentes hématopoïétiques. Ces cellules souches donnent naissance aux cellules progénitrices des globules rouges (érythrocytes) et plaquettes ainsi qu'aux deux types progéniteurs de globules blancs, soit le progéniteur myéloïde et le progéniteur lymphoïde commun. Le progéniteur myéloïde peut se différencier en granulocytes, en phagocytes professionnels ou en mastocytes. Les granulocytes de type neutrophile font également partie des phagocytes professionnels. Le progéniteur lymphoïde commun peut se différencier en lymphocytes ou en cellules NK.

2.1 Les cellules du système immunitaire

Les cellules composant le système immunitaire originent des cellules souches pluripotentes hématopoïétiques de la moëlle osseuse. Initialement, ces cellules pluripotentes donnent naissance à une deuxième série de cellules souches au potentiel plus limité, soit les cellules progénitrices des globules rouges et plaquettes ainsi que les deux types progéniteurs de globules blancs, soit le progéniteur myéloïde et le progéniteur lymphoïde commun (Figure 1).

2.1.1 Le progéniteur myéloïde

Le progéniteur myéloïde est le précurseur des granulocytes, macrophages, cellules dendritiques et mastocytes (Figure 1).

2.1.1.1 *Les granulocytes*

Les granulocytes, aussi appelés leukocytes polymorphonucléaires, contiennent des granules denses dans leur cytoplasme et possèdent une courte durée de vie (Rosenberg et Gallin, 2003). Il existe trois types de cellules granulocytaires : (1) les neutrophiles, qui font également partie des phagocytes (avec les macrophages et les cellules dendritiques) et qui sont les plus nombreuses de l'immunité innée, ont une grande responsabilité dans la défense contre les infections bactériennes ; (2) les éosinophiles qui jouent un rôle important dans la défense contre les parasites ; (3) les basophiles qui complètent les éosinophiles dans la suppression des parasites.

2.1.1.2 Les macrophages

Les macrophages font partie des phagocytes et sont répandus dans les tissus corporels, à l'intérieur et à l'extérieur des organes lympho-hémopoïétiques. Ils constituent la forme mature des monocytes qui circulent dans le sang et qui se différencient en macrophages lorsqu'ils pénètrent les tissus. Les macrophages matures sont hautement phagocytiques et possèdent une longue durée de vie. Les macrophages jouent un rôle primordial non seulement dans l'immunité innée contre les pathogènes, mais également dans le remodelage tissulaire et l'élimination des corps apoptotiques. Ils jouent également un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptée en stimulant les lymphocytes T CD4⁺. Toutes ces fonctions font du macrophage un type cellulaire très versatile. Les macrophages peuvent être activés par des cytokines comme l'interféron- γ , ce qui les rend encore plus efficaces dans leurs fonctions microbicides. Ils peuvent également sécréter différentes cytokines tels l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-18, le TNF- α et l'IL-10 qui jouent un rôle dans l'inflammation et le recrutement de cellules du système immunitaire (Gordon, 2003).

2.1.1.3 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques font également partie des phagocytes avec les macrophages et les neutrophiles. Elles sont particulièrement spécialisées dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques. Contrairement aux macrophages, les cellules dendritiques sont au stade immature dans le sang et les tissus et mûrissent suite à la phagocytose d'un pathogène. Cette maturation provoque leur déplacement vers les ganglions lymphatiques où elles interagissent avec les lymphocytes T. Les cellules dendritiques composent une famille à plusieurs membres qu'on peut différencier grâce à certains marqueurs. Ainsi, parmi les cellules dendritiques

immatures provenant du progéniteur myéloïde, on retrouve deux types : les $CD11c^+CD14^+$ et les $CD11c^+CD14^-$ qui deviennent des cellules dendritiques interstitielles et des cellules de Langerhans lorsqu'elles se dirigent aux épithéliums ou d'autres tissus (Moser, 2003). Les monocytes provenant du progéniteur myéloïde peuvent également se différencier en cellules dendritiques en présence de certaines cytokines ou produits microbiens (Liu, 2001). Il a également été démontré *in vivo* chez la souris qu'une population de cellules dendritiques pouvaient provenir du progéniteur lymphoïde commun (Manz *et al.*, 2001).

2.1.1.4 Les mastocytes

Tout comme les macrophages, les mastocytes se différencient lorsqu'ils se retrouvent dans les tissus. Ils sont localisés plus particulièrement près des capillaires et des petits vaisseaux sanguins et sécrètent lors de leur activation des substances qui modifient la perméabilité de ces derniers. Ils jouent un rôle dans la défense des muqueuses contre les pathogènes et sont responsables des réactions allergiques (Wills-Karp et Khurana Hershey, 2003).

2.1.2 Le progéniteur lymphoïde commun

Le progéniteur lymphoïde commun est le précurseur des lymphocytes B et T qui sont responsables de la réponse immunitaire adaptée aux pathogènes (Figure 1). Il est également le précurseur des cellules NK qui jouent un rôle dans l'immunité innée. La grande particularité des lymphocytes est de subir une maturation qui fait en sorte que chaque lymphocyte individuel va posséder une variation unique du récepteur antigénique, le BCR (« B cell receptor ») dans le cas des lymphocytes B et le TCR (« T cell receptor ») dans le cas des lymphocytes T (Janeway *et al.*, 2001). Cette variation individuelle fait en sorte que chaque lymphocyte reconnaît un antigène pathogénique différent, ce qui donne à

la population totale un immense répertoire de récepteurs reconnaissant les pathogènes. La différenciation des lymphocytes se produit dans les organes lymphoïdes centraux, soit la moëlle osseuse dans le cas des lymphocytes B et le thymus dans le cas des lymphocytes T, mais la population différenciée est localisée dans les organes lymphoïdes périphériques où la réponse immunitaire adaptée est initiée, soit les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (Paul, 2003).

2.1.2.1 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B naïfs possèdent le récepteur à antigènes BCR à leur surface qui a pour fonction de capturer un antigène spécifique. Suite à cette liaison, le complexe du BCR:antigène est internalisé par endocytose, puis l'antigène est dégradé en peptides qui pourront se lier au CMH de classe II (Reth et Wienands, 1997). Un recyclage vésiculaire amène à la surface le complexe peptide:CMH de classe II qui pourra être reconnu par un lymphocyte T auxiliaire $CD4^+$ via son récepteur TCR. Ce lymphocyte T $CD4^+$ doit préalablement avoir été stimulé par un macrophage ou une cellule dendritique (Janeway *et al.*, 2001). Cette présentation du peptide par le lymphocyte B au lymphocyte T auxiliaire provoque la synthèse de protéines effectrices et la sécrétion de cytokines par ce dernier. Parmi les protéines effectrices, on retrouve le ligand de CD40 qui lie CD40 à la surface du lymphocyte B et active son cycle cellulaire (McHeyzer-Williams, 2003). Parmi les cytokines sécrétées, on retrouve l'IL-4 qui agit en synergie avec le ligand de CD40 pour activer la prolifération du lymphocyte B (McHeyzer-Williams, 2003). La progéniture du lymphocyte B se différencie ensuite en cellules productrices d'anticorps, aussi appelées plasmocytes, qui sécrètent les anticorps en grande quantité mais ne peuvent plus interagir avec les lymphocytes T (Max, 2003). Une petite fraction de la population de lymphocytes B peut également se différencier en cellules B mémoires à longue durée de vie qui jouent un rôle lors de la réinfection (Janeway *et al.*, 2001).

2.1.2.2 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T naïfs circulent entre le sang et les tissus lymphoïdes périphériques jusqu'à ce qu'ils rencontrent leurs antigènes spécifiques. Il existe deux types de lymphocytes T naïfs, ceux exprimant le corécepteur $CD4^+$ et ceux exprimant le corécepteur $CD8^+$, ces deux types étant définis dans le cortex du thymus par sélection positive et négative (Paul, 2003). Les lymphocytes T $CD4^+$ sont spécifiques aux antigènes couplés au CMH de classe II tandis que les lymphocytes T $CD8^+$ sont spécifiques au CMH de classe I.

2.1.2.2.1 Les lymphocytes T $CD4^+$

Puisque le CMH de classe II est surtout exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes tels les macrophages et les cellules dendritiques, les lymphocytes T $CD4^+$ interagissent surtout avec ces cellules. Les cellules dendritiques sont particulièrement aptes à la présentation d'un peptide sur le CMH de classe II puisqu'elles peuvent effectuer la pinocytose d'une grande quantité de matériel ou la phagocytose de pathogènes, ce qui provoque leur migration aux tissus lymphoïdes périphériques où sont localisés les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs (Janeway *et al.*, 2001). Pendant cette migration, les cellules dendritiques adoptent une forme mature, ce qui leur permet d'exprimer à leur surface des protéines co-stimulatrices dont les molécules B7 qui lient le récepteur CD28 sur le lymphocyte T et agissent en synergie avec le complexe peptide:CMH de classe II qui est reconnu, lui, par le TCR et la protéine $CD4^+$ (Weiss et Samelson, 2003). Les cellules présentatrices d'antigènes interagissent également avec les lymphocytes T de façon non spécifique via les protéines ICAMs qui lient l'intégrine LFA-1 sur le lymphocyte T, ce qui permet un rapprochement et une interaction suffisamment longue entre les deux cellules pour la vérification de la spécificité du TCR pour le complexe peptide:CMH de classe II

(Weiss et Samelson, 2003). La liaison soutenue du TCR et des protéines co-stimulatrices provoque l'expansion clonale du lymphocyte T CD4⁺ qui peut se différencier en CD4⁺ T_{H1} ou T_{H2} qui vont différer quant à leurs cytokines sécrétées (Jenkins, 2003). En général, les lymphocytes T_{H1} vont moduler l'immunité à médiation cellulaire, soit l'activation des macrophages et la production d'anticorps opsonisants par les lymphocytes B, tandis que les lymphocytes T_{H2} vont moduler l'immunité humorale, soit la production d'anticorps neutralisants par les lymphocytes B (Paul, 2003 ; Janeway *et al.*, 2001). Tout comme les lymphocytes B, une fraction des lymphocytes T CD4⁺ se différenciera en cellules mémoires (Ahmed et Gray, 1996).

2.1.2.2.2 Les lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs se différencient en cellules T CD8⁺ cytotoxiques, CTLs (« cytotoxic T lymphocytes »), suite à la stimulation par un antigène couplé au CMH de classe I. Ils sont particulièrement efficaces dans l'élimination des cellules infectées par des pathogènes de type viral en provoquant l'apoptose de ces cellules. Les effets promoteurs d'apoptose induits par les CD8⁺ peuvent emprunter deux voies (Henkart et Sitkovsky, 2003). La première voie consiste en l'exocytose de granules contenant des perforines qui percent la membrane des cellules attaquées, puis l'entrée des granzymes dans cette cellule afin d'activer les caspases. La deuxième voie consiste en la liaison du ligand Fas des CD8⁺ au récepteur Fas des cellules attaquées, ce qui permet également l'activation de caspases. Les CD8⁺ sont des producteurs importants d'interféron- γ qui active le potentiel cytotoxique des macrophages (Henkart et Sitkovsky, 2003). En raison de leur potentiel destructeur, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs requièrent une plus grande activité co-stimulatrice que les CD4⁺ pour se différencier en cytotoxiques. Ainsi, des lymphocytes T CD4⁺ activés peuvent favoriser l'activation des CD8⁺ par la sécrétion de cytokines qui vont augmenter l'expression des molécules co-stimulatrices des cellules présentant le complexe

du CMH de classe I couplé au peptide viral (Janeway *et al.*, 2001). De façon similaire aux CD4⁺, une fraction des CD8⁺ se différencie en cellules mémoires (Ahmed et Gray, 1996).

2.1.2.3 Les cellules NK

Les cellules NK (« Natural Killer ») n'ont pas de récepteurs à antigènes spécifiques, mais sont néanmoins capables de reconnaître des cellules anormales telles des cellules tumorales ou infectées par des virus, et d'éliminer ces cellules (Raulet, 2003). Leur rôle est moins bien caractérisé que les CD4⁺ et CD8⁺, mais il est connu qu'elles circulent dans le sang et possèdent un mécanisme inducteur d'apoptose similaire aux CD8⁺ (Raulet, 2003). Cependant, contrairement aux CD8⁺ qui sont généralement spécifiques pour un type de cellule ou pathogène, les cellules NK peuvent lyser plusieurs lignées de cellules différentes (Takasugi *et al.*, 1973). Il semblerait que les cellules NK forment une troisième classe de lymphocytes, distincts des lymphocytes B et T (Ritz *et al.*, 1985). Les cellules NK sont activées entre autres par les interférons α et β ainsi que par l'IL-12 aux temps précoces d'une infection dans le but probable de contenir la propagation du pathogène pendant que la réaction immunitaire adaptée s'organise (Raulet, 2003). Les cellules NK ne génèrent pas de cellules mémoires (Raulet, 2003).

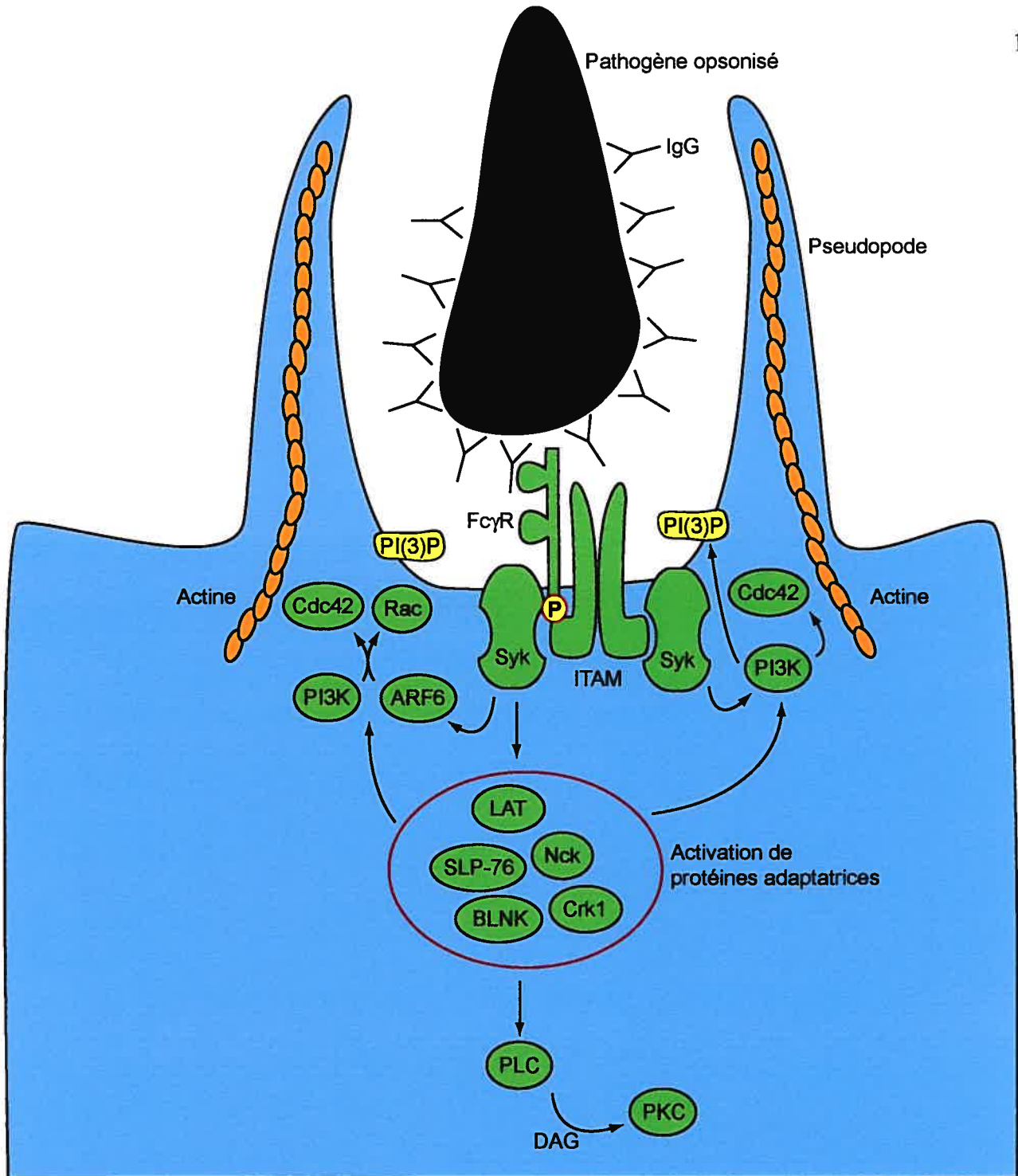


Figure 2. Transduction de signaux associés à la phagocytose via le récepteur Fc

Suite au regroupement du récepteur Fc, la portion cytoplasmique du récepteur est phosphorylée ainsi que les protéines ITAMs associées, ce qui permet le recrutement de la tyrosine kinase Syk. D'autres protéines adaptatrices telles LAT, SLP-76, BLNK, Crk1 et Nck sont également engagées dans le complexe associé au récepteur. La PI3K est ensuite activée causant l'accumulation de PI(3)P à la coupe phagocytaire. La PKC est aussi activée via la génération de DAG par la PLC, de même que Rac1 et Cdc42 qui signalent l'accumulation focale d'actine et la formation de pseudopodes.

3. La phagocytose

Le mot phagocytose provient de la langue grecque où « phagos » signifie « manger » et « kytos » signifie « cavité » ou « cellule ». La phagocytose est le mécanisme que certaines cellules ont acquis au cours de l'évolution afin d'internaliser de larges particules tels des débris minéraux, des corps apoptotiques ainsi que des pathogènes dans le but de pouvoir les tuer et les dégrader (Desjardins, 2003). Ce processus fut observé pour la première fois en 1883 par Élie Metchnikov qui suggéra que des globules blancs du sang attaquaient les envahisseurs provenant de l'extérieur du corps humain (Metchnikov, 1891). Pour les formes de vie unicellulaires telle *Amoeba*, la phagocytose de bactéries suivi de leur dégradation permet l'entrée de nouveaux nutriments essentiels pour leurs fonctions cellulaires. Dans le cas des formes de vie complexes pluricellulaires possédant un système digestif s'occupant de la nutrition, la phagocytose sert de mécanisme de défense contre les infections par des pathogènes cellulaires. En général, la largeur de la particule destinée à être internalisée détermine si nous sommes en présence de phagocytose ou d'endocytose. Il a été suggéré que la largeur minimale requise doit être de 0.5 μm , mais cette donnée varie selon le type de cellules (Desjardins et Griffiths, 2003). Les macrophages peuvent par exemple internaliser une grande quantité de particules de 0.5 μm ou une particule géante plus grosse que leur superficie.

Les cellules de mammifères pratiquant la phagocytose sont référées comme étant des phagocytes professionnels. Ainsi les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles font partie des phagocytes professionnels puisqu'ils phagocytent de routine les corps étrangers et apoptotiques (Figure 1). Il existe également des phagocytes non professionnels tels les fibroblastes ainsi que les cellules endothéliales et épithéliales qui peuvent sous certaines conditions effectuer la phagocytose (Rabinovitch, 1995). On peut également activer le potentiel de phagocytose chez certaines cellules en exprimant de façon

stable le récepteur Fc, ce qui permet l'internalisation de corps opsonisés avec des IgGs (immunoglobulines G) (Booth *et al.*, 2002).

3.1 Rôle des récepteurs de la membrane plasmique dans la phagocytose

La phagocytose d'un corps étranger est activée suite au regroupement à la membrane plasmique du phagocyte des récepteurs liant les ligands de la particule cible. Parmi les récepteurs pouvant déclencher le processus de phagocytose se retrouvent les récepteurs Fc pour les corps opsonisés avec des IgGs, les récepteurs du complément pour les corps opsonisés avec des molécules du complément tel C3b, les récepteurs de type « scavenger », les récepteur du mannose, les récepteurs de phosphatidylsérine pour l'internalisation des corps apoptotiques et des intégrines (Greenberg et Grinstein, 2002). D'autres récepteurs spécifiques pour certains pathogènes existent également. La reconnaissance des ligands à la surface des corps destinés à être phagocytés par les récepteurs activent des cascades de signalisation menant à la réorganisation de l'actine et à la formation de pseudopodes autour du corps étranger. La voie de transduction de signal associée au récepteur Fc a été bien caractérisée (Figure 2). Suite au regroupement du récepteur, il s'ensuit une phosphorylation de la portion cytoplasmique du récepteur ainsi que des protéines ITAMs associées au récepteur ce qui permet le recrutement de la tyrosine kinase Syk (Fitzer-Attas *et al.*, 2000 ; Gresham *et al.*, 2000). Il a été démontré que Syk est important pour la phagocytose via le récepteur Fc, mais pas pour les autres types d'internalisation. D'autres protéines adaptatrices telles LAT, SLP-76, BLNK, Crk1 et Nck sont également engagées dans le complexe associé au récepteur (Tridandapani *et al.*, 2000 ; Bonilla *et al.*, 2000 ; Kyono *et al.*, 1998 ; Izadi *et al.*, 1998). La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est ensuite activée, ce qui cause l'accumulation de phosphoinositides-3' à la coupe phagocytaire. Des kinases telles la protéine kinase C (PKC) sont aussi activées via la génération de diacylglycérol par la phospholipase C ainsi que des petites GTPases de la

famille Rho, soit Rac1 et Cdc42, qui signalent l'accumulation focale d'actine filamentaire et le début de la formation de pseudopodes qui engloberont la particule à internaliser (Botelho *et al.*, 2000 ; Larsen *et al.*, 2000 ; Melendez *et al.*, 1999 ; Cox *et al.*, 1997 ; Massol *et al.*, 1998 ; Caron et Hall, 1998 ; Castellano *et al.*, 2000).

3.2 Phagocytose médiée par le réticulum endoplasmique

L'engouffrement de la particule lors de la phagocytose mène à la création d'une vacuole appelée phagosome. De façon logique, la membrane du phagosome devrait en majeure partie être composée de membrane plasmique. Cependant, une étude récente des composantes du phagosome effectuée grâce à une approche protéomique à grande échelle (Garin *et al.*, 2001) a révélé qu'un haut pourcentage des protéines du phagosome précoce provenait du réticulum endoplasmique (RE). Une étude subséquente (Gagnon *et al.*, 2002) a démontré que les phagosomes de macrophages sont formés par une fusion directe de la membrane du RE avec la membrane plasmique, ce qui permet l'apport de membrane au phagosome naissant (Figure 3). Cette découverte surprenante et inattendue fut également confirmée pour un autre type cellulaire, les cellules dendritiques (Guermonprez *et al.*, 2003 ; Ackerman *et al.*, 2003). Un autre groupe a également rapporté que le RE chez *Dictyostelium* forme des contacts transitoires avec le phagosome naissant et qu'une double suppression des protéines du RE calnexine et calreticuline bloque la phagocytose chez cet organisme (Mueller-Taubenberger *et al.*, 2001). Ces différents résultats pourraient expliquer comment des phagocytes professionnels comme les macrophages et les cellules dendritiques peuvent internaliser un grand nombre de particules qui devraient en théorie mobiliser la majorité de la membrane plasmique sans diminuer significativement la taille de la cellule ou empêcher leurs fonctions vitales. Puisque les résultats de Gagnon *et al.* pointent vers un rôle important du RE dans la formation des phagosomes naissants, ce processus fut nommé « phagocytose médiée par le RE » (« ER-mediated phagocytosis »).

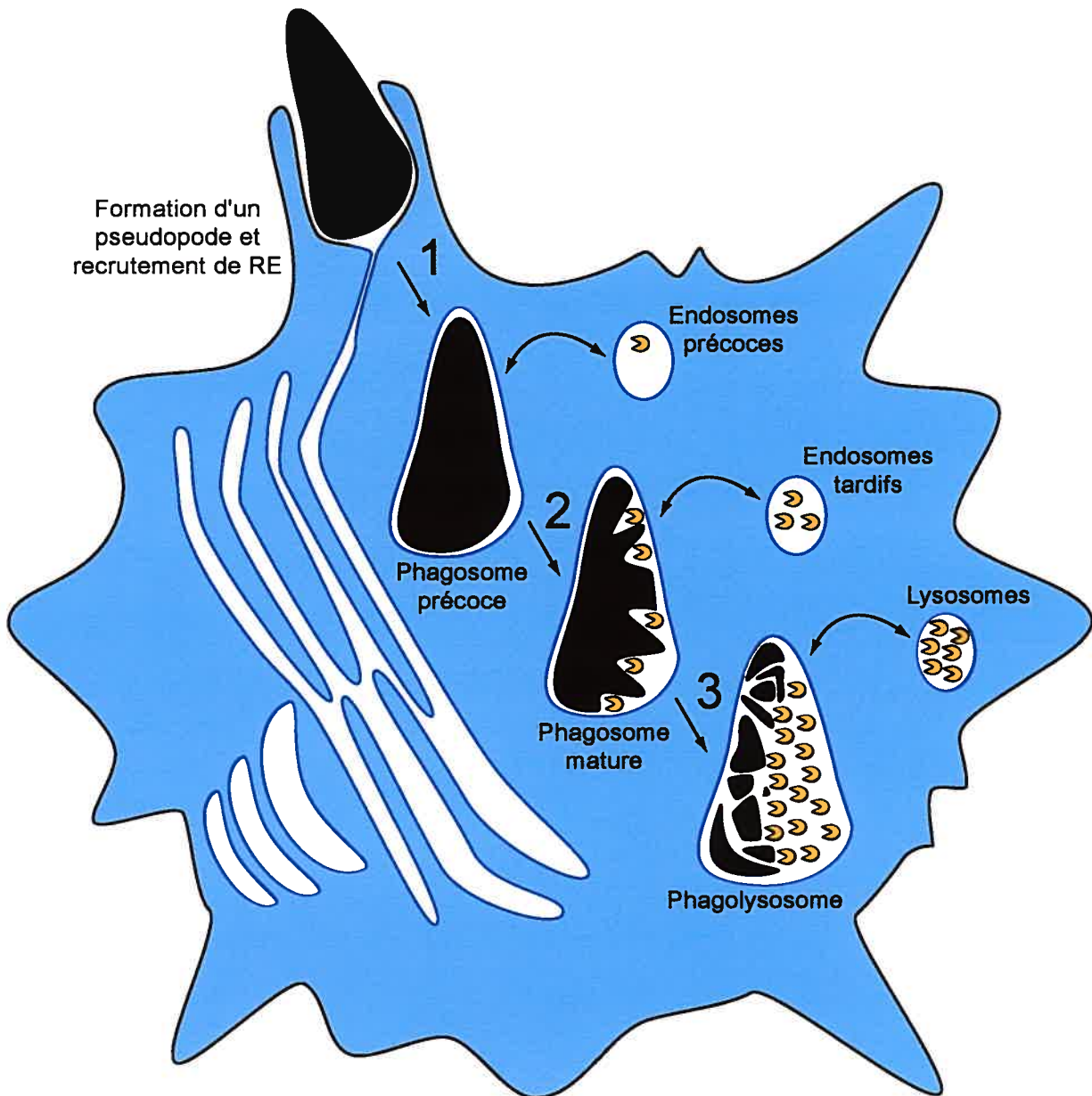


Figure 3. Phagocytose médiée par le réticulum endoplasmique et biogenèse des phagosomes

Lors de la phagocytose, le RE est recruté à la membrane plasmique et fusionne avec celle-ci, ce qui permet l'apport de membrane au phagosome naissant. Les phagosomes entament ensuite un processus de maturation en interagissant séquentiellement avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes.

Des indices reliés à ce processus avaient déjà été relevés en 1977 par Vicker qui démontra qu'une partie importante de la membrane des phagosomes semblait apparemment fabriquée de membranes nouvellement synthétisées d'une origine indéterminée (Vicker, 1977). Plus tard, en 1992, Cannon et Swanson notèrent que les macrophages internalisent des billes plus grosses qu'eux-mêmes sans que leurs fonctions vitales en soient affectées (Cannon et Swanson, 1992). Des études reliées à la taille de la cellule pendant la phagocytose ont démontré qu'il se produit un accroissement de la surface cellulaire juste avant la phagocytose, un processus appelé « réponse à exocytose focale » (« focal exocytotic response »), ce qui indique que des endomembranes sont recrutés à la surface cellulaire juste avant l'internalisation (Holevinsky et Nelson, 1998). Une étude intéressante du groupe supervisé par Rothman sur la fusion de membranes cellulaires modulée par des protéines SNARES de différents compartiments cellulaires a démontré que la t-SNARE de la membrane plasmique Sso1/Sec9c pouvait entre autres interagir avec des membranes portant la v-SNARE Sec22 résidente du RE et permettre la fusion (McNew *et al.*, 2000), ce qui semble bien démontrer que la membrane du RE possède le potentiel d'interagir avec la membrane plasmique.

3.3 Biogenèse des phagosomes

Rapidement après leur formation à la surface cellulaire, les phagosomes entament un processus complexe de maturation visant à les transformer en organelles efficaces pour tuer et dégrader des pathogènes, soit les phagolysosomes (Figure 3). Des analyses de la maturation du phagosome à différents intervalles de temps ont démontré que ces organelles interagissent séquentiellement avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes, et acquièrent graduellement des marqueurs protéiques provenant de ces compartiments (Desjardins *et al.*, 1994a ; Desjardins *et al.*, 1994b ; Desjardins, 1995 ; Desjardins *et al.*, 1997).

3.3.1 Rôle de la petite GTPase Rab5 dans la maturation des phagosomes

Parmi les protéines acquises séquentiellement se retrouvent plusieurs petites GTPases de la superfamille Ras, incluant Rab5 et Rab7, connues comme étant impliquées dans la fusion des membranes, et Rap1 (Desjardins *et al.*, 1994a ; Pizon *et al.*, 1994). Une expérience de vidéo-microscopie a révélé une facette intéressante de l'interaction phagosome-endosome. Dans les macrophages où les phagosomes furent formés par l'internalisation de billes de latex et où les endosomes furent remplis de particules d'or liées à la BSA, très peu d'interactions entre ces organelles semblent accompagner leur fusion apparente (Desjardins *et al.*, 1994a). Ainsi, au lieu d'avoir une fusion complète des endosomes avec les phagosomes, on assiste à des interactions transitoires de type fusion/fission entre ces organelles, ce qui permet l'échange de matériel tout en conservant l'intégrité de chacun des organelles impliqués. Ces propositions ont mené à l'élaboration de l'hypothèse « kiss and run » où les événements transitoires de fusion/fission sont accompagnés par un transfert sélectif selon la taille de protéines de la lumière des endosomes aux phagosomes (Desjardins, 1995 ; Desjardins *et al.*, 1997 ; Duclos *et al.*, 2000). Cette hypothèse du « kiss and run » ne serait pas seulement propre aux phagosomes mais serait également impliquée dans la biogenèse des lysosomes (Duclos *et al.*, 2003). Les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions transitoires ne sont pas parfaitement connus, mais la protéine Rab5 semble jouer un rôle important. En effet, des macrophages exprimant de façon stable un mutant de Rab5 déféctueux dans son activité GTPasique perdent leur capacité d'effectuer des interactions transitoires entre les phagosomes et les lysosomes, ce qui entraîne la création de phagosomes géants, résultat de la fusion complète des endosomes avec les phagosomes (Duclos *et al.*, 2000).



Figure 4. Distribution hétérogène des protéines du phagosome dans des radeaux lipidiques

Les phagosomes comportent au moins deux types de radeaux lipidiques : (1) des radeaux lipidiques provenant de la membrane plasmique lors de la création des phagosomes, et riches en ganglioside GM1, et (2) des radeaux lipidiques contenant la flotilline acquis plus tardivement pendant la maturation et provenant d'une source interne. Les protéines membranaires des phagosomes sont distribuées en régions spécialisées où des fonctions spécifiques prennent place. (Reproduit avec la permission de Guillaume Goyette, Université de Montréal)

3.3.2 Rôle des radeaux lipidiques dans la maturation des phagosomes

En plus d'acquérir les enzymes protéolytiques lysosomales permettant la dégradation des corps phagocytés, les phagosomes acquièrent également des microdomaines membranaires du type « lipid rafts » ou radeaux lipidiques (Dermine *et al.*, 2001). Ainsi, les phagosomes semblent acquérir au moins deux types de radeaux lipidiques : (1) des radeaux lipidiques provenant de la membrane plasmique lors de la création des phagosomes, et riches en GM1, et (2) des radeaux lipidiques contenant la flotilline acquis plus tardivement pendant la maturation et provenant d'une source interne (Dermine *et al.*, 2001 ; Dermine *et al.*, 2004). La découverte de radeaux lipidiques sur les phagosomes semble démontrer qu'au lieu d'avoir une distribution homogène, les protéines membranaires des phagosomes sont distribuées en régions spécialisées où des fonctions spécifiques prennent place (Figure 4). En effet, les radeaux lipidiques semblent absents chez les phagosomes contenant le parasite *Leishmania donovani*, alors que le même parasite mutant pour son lipophosphoglycan (LPG) de surface est contenu dans des phagosomes possédant des radeaux lipidiques (Dermine *et al.*, 2001 ; Dermine *et al.*, 2004). De façon intéressante, les phagosomes contenant les parasites de type sauvage fusionnent peu avec les organelles endocytaires tardifs alors que les phagosomes contenant les parasites mutant pour le LPG fusionnent de façon importante avec ces organelles. Il semble que la déstabilisation des radeaux lipidiques par le LPG de *Leishmania donovani* empêche les interactions phagosomes-endosomes tardifs, ce qui conférerait un rôle pour les radeaux lipidiques dans la fusion et la maturation des phagosomes (Dermine *et al.*, 2004).

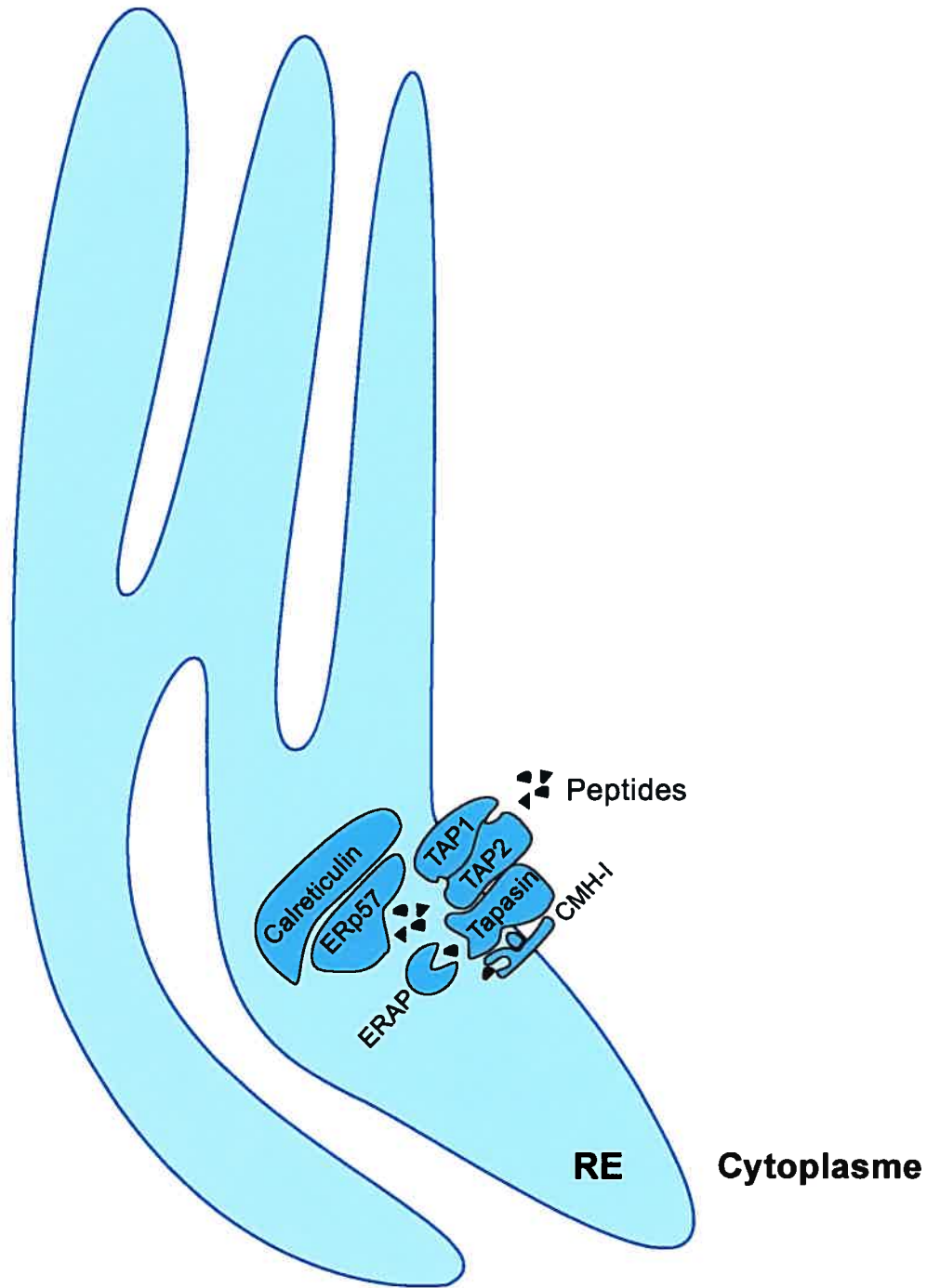


Figure 5. Structure du complexe de chargement des peptides

Le CMH de classe I consiste en une chaîne α luminale possédant un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. La calnexine aide la chaîne α à se replier correctement, puis la β 2-microglobuline s'associe à la chaîne α avec l'aide de la calreticuline, qui remplace la calnexine, pour terminer le repliement. ERp57 et tapasine viennent ensuite s'associer à ce complexe, pour former le complexe de chargement du peptide. La tapasine permet l'association de ce complexe au transporteur TAP possédant une affinité pour les chaînes de peptides du cytoplasme destinées à être apprêtées pour la présentation via le CMH de classe I.

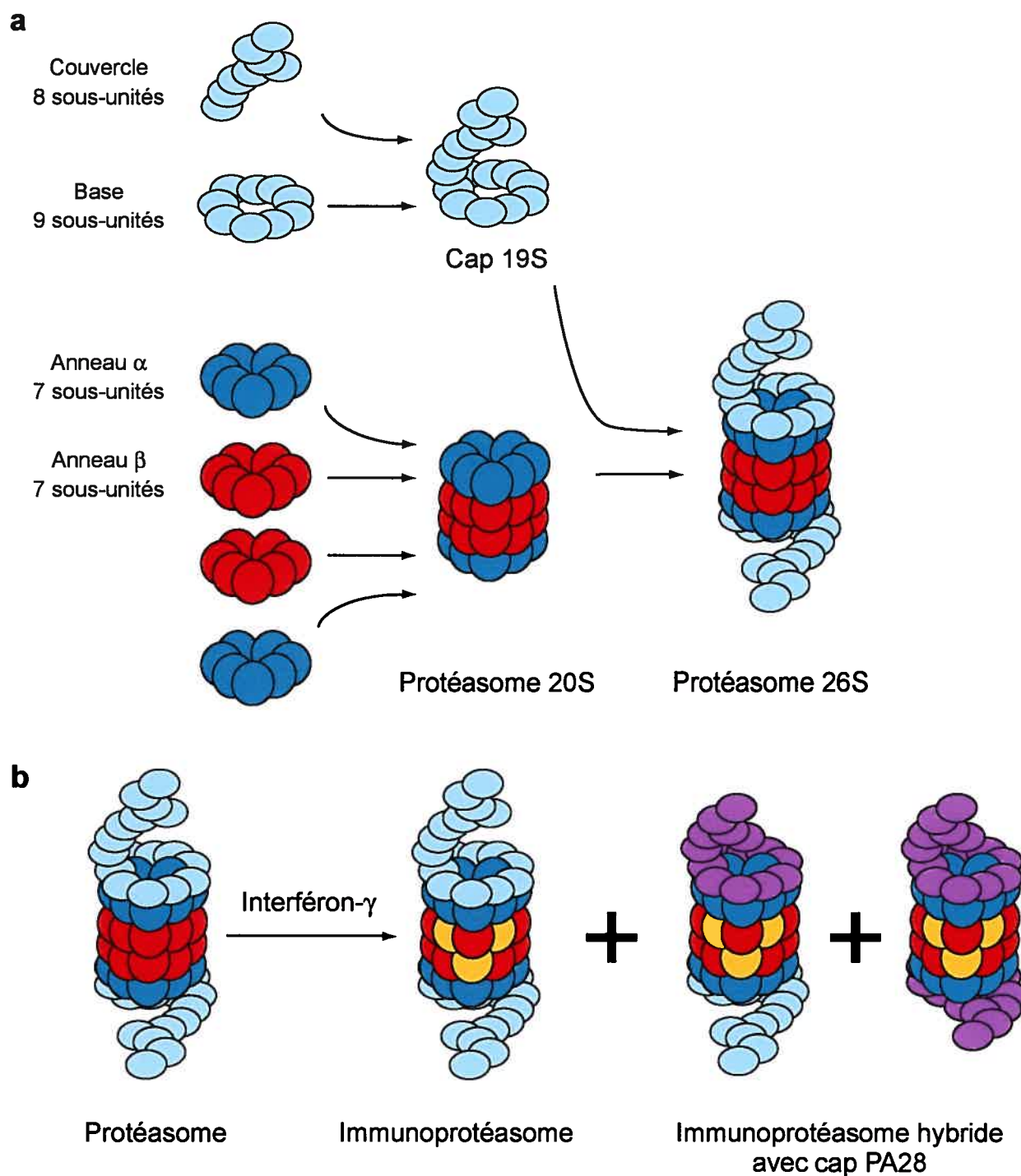


Figure 6. Structure du protéasome 26S

a, Le corps catalytique 20S du protéasome est composé de 4 anneaux heptamériques, possédant chacun 7 sous-unités différentes. Les deux anneaux extérieurs sont composés des sous-unités de type α et les deux anneaux intérieurs sont composés des sous-unités de type β . Le cap 19S est constitué de deux portions : (1) la base qui comprend 9 sous-unités différentes et (2) le couvercle qui comprend 8 sous-unités différentes. **b**, Lors d'une stimulation par l'interféron- γ , les sous-unités inducibles LMP-2, MECL et LMP-7 viennent remplacer les sous-unités constitutives β 1, β 2 et β 5 du corps catalytique ce qui forme le complexe appelé immunoprotéasome. Le cap PA28, induit par l'interféron- γ , peut également venir s'associer à l'immunoprotéasome.

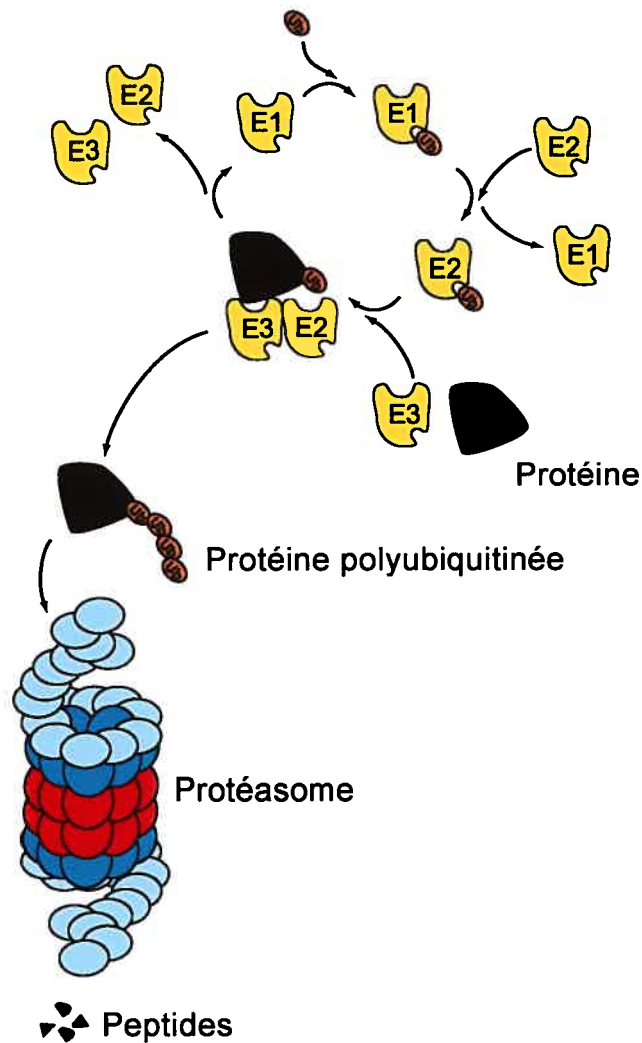


Figure 7. Cycle de polyubiquitination des protéines

L'attachement d'ubiquitines aux protéines est catalysée par l'action séquentielle de trois enzymes, soit les enzymes E1, E2 et E3. L'enzyme activatrice E1 débute la réaction en activant la Gly en C-terminal de l'ubiquitine et en formant un lien thioester avec un de ses résidus Cys. L'ubiquitine activée est ensuite transférée à l'enzyme E2 conjuguatrice, également via un lien thioester avec un résidu Cys de l'E2. La troisième étape est catalysée par l'enzyme E3 ligase qui lie de façon covalente le C-terminal de l'ubiquitine activée au groupe amine- ϵ d'un résidu Lys du substrat protéique. Suite à la liaison de la première ubiquitine au substrat, la réaction de polyubiquitination via les enzymes E1, E2 et E3 se poursuit avec la liaison subséquente des ubiquitines sur un résidu Lys de l'ubiquitine déjà liée au substrat (habituellement la Lys48), formant ainsi une chaîne multiple d'ubiquitines liées au substrat de façon covalente.

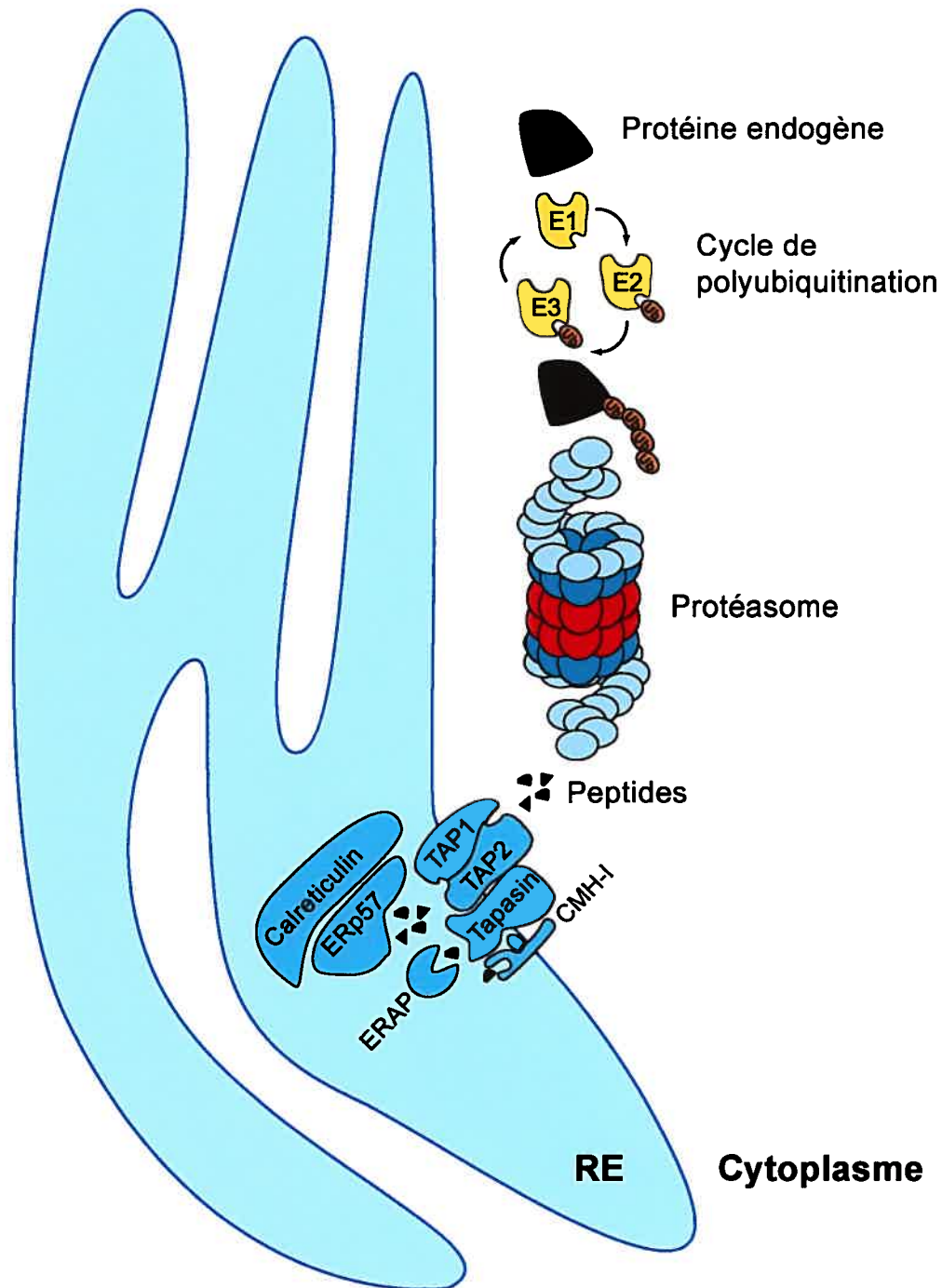


Figure 8. Apprêtement des antigènes endogènes pour la présentation par le CMH de classe I

La première étape de l'apprêtement des antigènes pour la présentation sur le CMH de classe I consiste en l'ubiquitination des protéines. La deuxième consiste en la dégradation des protéines polyubiquitinées en peptides par le protéasome. À la troisième étape, le transporteur TAP reconnaît les peptides spécifiques au CMH de classe I et les transporte dans la lumière du RE où ils sont pris en charge par le complexe de chargement du peptide consistant en la tapasine, ERp57 et la calreticuline. Si le peptide possède une extension N-terminale, l'aminopeptidase ERAP dégrade cette extension jusqu'à la forme finale de 8-9 acides aminés. Le peptide est ensuite chargé sur le CMH de classe I.

4. La présentation d'antigènes

Afin de pouvoir déclencher une réponse immunitaire adaptée, les lymphocytes T doivent reconnaître l'antigène pathogénique montré à la surface des cellules infectées ou des cellules présentatrices d'antigènes telles les cellules dendritiques et les macrophages. L'antigène étranger est amené à la surface de la cellule présentatrice grâce aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), qui sont des glycoprotéines spécialisées pouvant lier de façon non covalente les antigènes exogènes et endogènes (Janeway *et al.*, 2001). Les gènes codant pour le CMH sont situés dans un amas de gènes du génome où se retrouvent également de nombreux gènes impliqués dans la production du complexe peptide:CMH (Margulies et McCluskey, 2003). Il existe deux classes de CMH qui sont chacune ségréguées dans des compartiments cellulaires différents: le CMH de classe I résidant dans le RE qui lie les antigènes exprimés de façon endogènes, et le CMH de classe II résidant dans les organelles endo/phagocytaires qui lie les antigènes exogènes exprimés par les pathogènes internalisés. Ces CMHs ont la particularité d'être polygéniques et hautement polymorphiques. Cela signifie qu'en plus d'avoir plusieurs gènes codant pour les CMHs, chaque CMH est le produit d'une variabilité génétique qui permet d'accroître grandement la quantité de peptides pouvant être présentés aux lymphocytes T, et ce pour chaque individu et chaque population à risque pour un pathogène infectieux (Janeway *et al.*, 2001). Cette variabilité des CMHs à l'intérieur des populations permet d'éviter qu'un pathogène qui se serait adapté à la survie dans un individu particulier contamine facilement le reste de la population.

4.1 La présentation d'antigènes par le CMH de classe I

4.1.1 Structure du complexe de chargement du peptide sur le CMH de classe I

La stimulation des lymphocytes T CD8⁺ par les antigènes endogènes se fait via leur liaison au CMH de classe I. Le CMH de classe I consiste en une chaîne α luminale possédant un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique (Figure 5). Suite à la synthèse de la molécule, la chaperone calnexine aide initialement la chaîne α à se replier correctement, puis la β_2 -microglobuline vient s'associer à la chaîne α avec l'aide de la calreticuline, qui remplace la calnexine, pour terminer le repliement (Cresswell, 2003). Deux autres chaperones, ERp57 et tapasine, viennent ensuite s'associer à ce complexe, pour former le complexe de chargement du peptide. La tapasine permet l'association de ce complexe au transporteur associé à la présentation d'antigène, TAP. TAP est composé de deux protéines transmembranaires, TAP1 et TAP2, et possède une affinité pour les chaînes de peptides du cytoplasme destinées à être apprêtées pour la présentation via le CMH de classe I (Cresswell, 2003).

4.1.2 Structure du protéasome 26S

Les antigènes pathogéniques de même que les protéines endogènes cellulaires du cytoplasme de la cellule hôte doivent être dégradés par le protéasome, un complexe protéolytique à multiples unités conservé pendant l'évolution, afin d'être éventuellement reconnues par le complexe de chargement du peptide sur le CMH de classe I (Rock *et al.*, 1994). En plus de dégrader les antigènes endogènes en peptides, le protéasome joue également un rôle essentiel dans la dégradation de la masse cellulaire de protéines, le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la régulation des voies de

transduction de signaux et de la transcription (Hershko et Ciechanover, 1998). Le protéasome des cellules de mammifères est composé d'un corps catalytique, appelé protéasome 20S, et d'un corps régulateur situé à chaque bout, appelé cap 19S (aussi appelé PA700) (Figure 6). L'ensemble du corps catalytique et des deux corps régulateurs est appelé protéasome 26S et possède une masse de 2,5 mégaDaltons. Le protéasome est localisé dans le cytoplasme et le noyau, et les protéines le constituant sont parmi les plus abondantes de la cellule.

Le corps catalytique 20S a une forme cylindrique et est composé de 4 anneaux heptamériques, possédant chacun 7 sous-unités différentes (Hartmann-Petersen *et al.*, 2002) (Figure 6). Les deux anneaux extérieurs sont composés des sous-unités de type α et joueraient un rôle dans l'interaction avec le cap 19S, de même que dans l'ouverture du canal intérieur pour l'accession à la chambre protéolytique (Groll *et al.*, 2000). Les deux anneaux intérieurs sont composés des sous-unités de type β et sont en charge de l'activité catalytique. Les sous-unités actives β_1 , β_3 et β_5 possèdent trois types d'activité protéolytique : (1) une activité similaire à la chymotrypsine qui clive après les résidus hydrophobes ; (2) une activité hydrolase peptidylglutamyl qui clive après les résidus acides ; (3) une activité similaire à la trypsine qui clive après les résidus basiques (Voges *et al.*, 1999). Il y aurait également une activité autocatalytique du type thréonine protéase qui permettrait aux sous-unités de s'activer (Voges *et al.*, 1999). Lors d'une réponse immunitaire, les cellules ayant été stimulées par l'interféron- γ expriment deux gènes situés dans la région génique comprenant les gènes du CMH et codant pour les protéines LMP-2 et LMP-7, ainsi qu'un autre gène situé dans une autre région génique et codant pour la protéine MECL (Kloetzel, 2001). Ces trois unités inductibles viennent remplacer les sous-unités constitutives β_1 (LMP-2), β_2 (MECL) et β_5 (LMP-7) du corps catalytique du protéasome 20S, ce qui modifie l'activité catalytique protéasomiale (Kloetzel, 2001). Ce nouveau complexe est appelé immunoprotéasome et certaines études ont suggéré qu'il

serait beaucoup plus apte à générer des peptides ayant une haute affinité pour le CMH de classe I (Cascio *et al.*, 2001 ; Goldberg *et al.*, 2002 ; Rock *et al.*, 2002).

Le cap 19S du protéasome est constitué de deux portions : (1) la base qui comprend 9 sous-unités différentes, dont six possédant une activité ATPasique, qui ont pour fonction d'interagir avec les anneaux α du corps 20S pour ouvrir le pore, et de déplier les substrats destinés à être dégradés (Braun *et al.*, 1999 ; Strickland *et al.*, 2000 ; Navon et Goldberg, 2001) ; (2) le couvercle qui comprend 8 sous-unités différentes, dont la sous-unité S5a (aussi appelée Rpn5) qui reconnaît les chaînes de polyubiquitine liées aux substrats destinés à être dégradés (Figure 6). Lors d'une stimulation par l'interféron- γ , une structure appelée PA28 peut venir remplacer le cap 19S.

4.1.3 Polyubiquitination des protéines

Afin d'être dégradées par le protéasome, les protéines doivent généralement être marquées par des chaînes de polyubiquitine. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés conservée au cours de l'évolution, qui est attachée aux résidus lysine des protéines de façon covalente par une réaction enzymatique appelée ubiquitination (Hershko et Ciechanover, 1998). L'ubiquitination simple des protéines joue un rôle dans le transport vésiculaire et l'internalisation de certains récepteurs, alors que la polyubiquitination cible les protéines pour la dégradation. L'attachement d'ubiquitines aux protéines est catalysée par l'action séquentielle de trois enzymes, soit les enzymes E1, E2 et E3 (Hershko et Ciechanover, 1998 ; Hershko et Ciechanover, 1992 ; Ciechanover, 1994) (Figure 7). L'enzyme activatrice E1 débute la réaction en activant la Gly en C-terminal de l'ubiquitine et en formant un lien thioester avec un de ses résidus Cys. L'ubiquitine activée est ensuite transférée à l'enzyme E2 conjugatrice, également via un lien thioester avec un résidu Cys de l'E2. La troisième étape est catalysée par l'enzyme E3 ligase qui lie de façon covalente

le C-terminal de l'ubiquitine activée au groupe amine- ϵ d'un résidu Lys du substrat protéique. Suite à la liaison de la première ubiquitine au substrat, la réaction de polyubiquitination via les enzymes E1, E2 et E3 se poursuit avec la liaison subséquente des ubiquitines sur un résidu Lys de l'ubiquitine déjà liée au substrat (habituellement la Lys⁴⁸), formant ainsi une chaîne multiple d'ubiquitines liées au substrat de façon covalente. Puisqu'il n'existe qu'une enzyme E1, la spécificité de la réaction est assurée par les enzymes E2, qui constituent une famille composée d'une vingtaine de membres, et les enzymes E3 dont la famille est composée de plus d'une centaine de membres (Hershko et Ciechanover, 1998). Les enzymes E3 sont particulièrement importantes dans la sélectivité des substrats puisqu'elles reconnaissent des domaines spécifiques sur les substrats, ce qui leur permet d'interagir avec eux pour le transfert de l'ubiquitine activée (Hartmann-Petersen *et al.*, 2003).

La réaction inverse à l'ubiquitination, la déubiquitination, existe également et se produit via quatre familles de protéases spécifiques à l'ubiquitine, les « ubiquitin-specific proteases (USPs) », aussi appelées « deubiquitinating enzymes (DUBs) ». Il a été démontré récemment que plusieurs USPs jouent un rôle important dans le maintien des fonctions normales de la cellule et qu'un dérèglement de leur activité peut mener à la transformation tumorale (Ovaa *et al.*, 2004).

4.1.4 Apprêtement des antigènes endogènes pour la présentation par le CMH de

classe I

Afin d'être présentées par le CMH de classe I, les protéines endogènes cellulaires ainsi que les protéines virales doivent être traitées et apprêtées de la bonne façon (Figure 8). La première consiste en l'ubiquitination des protéines destinées à être dégradées par le protéasome. La deuxième consiste en la dégradation des protéines polyubiquitinées en

peptides par le protéasome. Puisque le CMH de classe I lie des peptides possédant 8 à 9 acides aminés, seuls les peptides comportant au minimum cette longueur d'acides aminés seront sélectionnés pour l'étape suivante. Les peptides destinés à la présentation générés par le protéasome possèdent en général une extrémité C-terminale correctement coupée, mais peuvent avoir une extrémité N-terminale allongée (Goldberg *et al.*, 2002 ; Rock *et al.*, 2002). L'extension N-terminale protégerait la séquence peptidique centrale de la dégradation par les aminopeptidases cytosoliques telles TOP, TPPII et LAP (Goldberg *et al.*, 2002). À la troisième étape, le transporteur TAP situé sur la membrane du RE reconnaît les peptides spécifiques au CMH de classe I et les transporte dans la lumière du réticulum (Townsend *et al.*, 1989 ; Kelly *et al.*, 1992 ; Powis *et al.*, 1991 ; Attaya *et al.*, 1992 ; Van Kaer *et al.*, 1992). Ils sont ensuite pris en charge par le complexe de chargement du peptide consistant en la tapasine, ERp57 et la calreticuline. Si le peptide possède une extension N-terminale, l'aminopeptidase ERAP dégrade cette extension jusqu'à la forme finale de 8-9 acides aminés (Saric *et al.*, 2002 ; Serwold *et al.*, 2002 ; York *et al.*, 2002). Le peptide est ensuite chargé sur le CMH de classe I, ce qui permet à la molécule du CMH d'atteindre sa conformation finale. Ceci cause la dissociation du CMH de classe I du complexe de chargement du peptide et le complexe peptide:CMH est libre d'emprunter la voie de sécrétion passant par l'appareil de Golgi afin d'atteindre la membrane plasmique, où il pourra stimuler les lymphocytes T CD8⁺.

4.2 La présentation d'antigènes par le CMH de classe II

La stimulation des lymphocytes T CD4⁺ par les antigènes exogènes se fait via leur liaison au CMH de classe II. Le CMH de classe II possède une structure semblable au CMH de classe I, à la différence que la molécule possède deux chaînes dimérisées, une chaîne α et une chaîne β . Chaque chaîne possède deux domaines, β_1 , β_2 , α_1 et α_2 , avec β_2 et α_2 possédant une section transmembranaire et une courte extension cytoplasmique

(Janeway *et al.*, 2001). Puisque le CMH de classe II doit seulement se lier aux antigènes exogènes situés dans les organelles endo/phagocytaires, le dimère doit être protégé lors de sa synthèse dans le RE. La chaîne invariante (Ii) joue cette fonction en s'associant sous forme trimérique à trois molécules de CMH de classe II dans le réticulum et en occupant le site de liaison des peptides (Jasanoff *et al.*, 1998). Il s'occupe également du transport des molécules de CMH de classe II du réticulum au Golgi, puis aux vésicules du compartiment endocytaire (Brachet *et al.*, 1997). L'acidification des vésicules endocytaires active les protéases de ce compartiment, tel cathepsin S, qui clivent ensuite la chaîne invariante pour laisser seulement le fragment CLIP localisé dans le site de liaison des peptides exogènes (Janeway *et al.*, 2001). L'endocytose de protéines exogènes mène à leur dégradation par les protéases endosomiales, ce qui génère certains peptides possédant une affinité pour les CMH de classe II. Le compartiment endosomal où est localisé le CMH de classe II possède également une molécule similaire au classe II, HLA-DM (H-2M chez la souris), dont le rôle est de coordonner la relâche du fragment CLIP pour le remplacer par un peptide exogène au niveau du site de liaison des peptides du CMH de classe II (Jensen *et al.*, 1999). Le CMH de classe II couplé au peptide exogène est ensuite transporté à la surface où il pourra stimuler les lymphocytes T CD4⁺. Une autre molécule semblable au CMH de classe II, HLA-DO (H-2O chez la souris) est exprimée chez les cellules de l'épithélium du thymus et chez les lymphocytes B. HLA-DO agit comme régulateur négatif de HLA-DM en empêchant la relâche de CLIP et la liaison du CMH de classe II aux peptides exogènes générés (Denzin *et al.*, 1997 ; van Ham *et al.*, 1997). Au cours de la réponse inflammatoire, la stimulation par l'interféron- γ de ces cellules augmente l'expression de HLA-DM, ce qui atténue l'effet inhibiteur de HLA-DO et permet ainsi la présentation d'antigènes exogènes par ces cellules.

Suite à la phagocytose d'un pathogène, le phagosome acquiert, par fusion avec les endosomes, les protéases dégradant les protéines exogènes pathogéniques, ce qui mène également à une stimulation des lymphocytes T CD4⁺. Les peptides exogènes générés dans

le phagosome n'ont cependant pas besoin d'atteindre le compartiment endocytaire où réside le CMH de classe II, puisque le phagosome acquiert également toute la machinerie permettant le chargement des peptides sur le CMH de classe II, soit HLA-DM ainsi que le CMH de classe II lui-même (Ramachandra *et al.*, 1999).

5. La présentation croisée d'antigènes exogènes

Au cours de l'évolution, le système immunitaire s'est développé afin de devenir le plus robuste et le plus complexe possible dans le but d'éliminer de façon efficace les pathogènes responsables de plusieurs infections dommageables, et de minimiser la mise en place de mécanismes d'évasion par ces mêmes pathogènes. Comme on vient de le voir précédemment, deux mécanismes de présentation antigénique sont apparus chez les mammifères, soit la présentation d'antigènes exprimés de façon endogène par le CMH de classe I et la présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe II. Malgré le fait que toutes les cellules d'un organisme possèdent la voie de présentation via le CMH de classe I, seuls les phagocytes professionnels tels les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles, ainsi que les cellules B, possèdent la voie de présentation via le CMH de classe II. Dans ces phagocytes possédant les deux CMHs, les mécanismes de traitement et d'apprêtement des antigènes se déroulent dans des compartiments cellulaires ségrégués, soit le cytosol et le RE pour la présentation via le CMH de classe I, soit les endosomes et les phagosomes pour la présentation via le CMH de classe II. Selon ce raisonnement, les virus étant exprimés de façon endogènes mènent uniquement à la production de CD8⁺ spécifiques lors de la réponse immunitaire alors que les pathogènes cellulaires qui sont phagocytés et dégradés par les phagocytes devraient mener uniquement à la production de lymphocytes T CD4⁺. Cependant, en 1986, le groupe de Kaufmann observa que des souris infectées avec *Mycobacterium leprae* possédaient une population de lymphocytes T capables de lyser des macrophages infectés par *M. leprae.*, concluant que cette population

de lymphocytes T spécifiques à *M. leprae* jouait un rôle dans la pathogénèse de la lèpre (Chiplunkar *et al.*, 1986). En 1988, le même groupe démontra que des cellules de Schwann infectées par *M. leprae* et n'exprimant pas le CMH de classe II étaient lysées par des CD8⁺ spécifiques à *M. leprae* (Steinhoff et Kaufmann, 1988). Ils ont également constaté plus tard que des cellules de Schwann mises en contact avec l'ovalbumine (OVA) étaient lysées par des CD8⁺ spécifiques à l'OVA (Steinhoff *et al.*, 1990). Il semblait donc que les cellules de Schwann possédaient un mécanisme leur permettant d'être reconnues par les CD8⁺ spécifiques produits par des souris infectées par *M. leprae*. Le dogme de ségrégation des voies de présentation via le CMH de classe I et le CMH de classe II chez les phagocytes fut mis en doute en 1993 par deux groupes qui ont rapporté que des antigènes exogènes comme l'OVA (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1993) et provenant de bactéries (Pfeifer *et al.*, 1993) sont apprêtés dans les phagosomes des macrophages et présentés sur le CMH de classe I. La capacité des antigènes exogènes à être présentés sur le CMH de classe I au niveau cellulaire a ainsi été nommée « présentation croisée » (« cross-presentation ») alors que la stimulation des CD8⁺ *in vivo* a été appelée « stimulation croisée » (« cross-priming ») (Figure 9).

5.1 Voies de présentation croisée d'antigènes exogènes

Suivant les premiers travaux rapportant l'existence de la présentation croisée, la caractérisation de ce nouveau mécanisme de stimulation des CD8⁺ fut débutée en utilisant l'OVA comme antigène exogène. Il a ainsi été démontré que lorsque cette protéine est opsonisée sur des billes de latex pour forcer son internalisation par phagocytose, cette procédure est de 10³ à 10⁴ fois plus efficace que l'entrée de l'OVA par endocytose pour stimuler des CD8⁺ spécifiques à l'OVA (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1993 ; Harding *et al.*, 1994 ; Reis e Sousa *et al.*, 1995). La stimulation croisée des CD8⁺ dans les souris par des pathogènes intracellulaires incluant *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*,

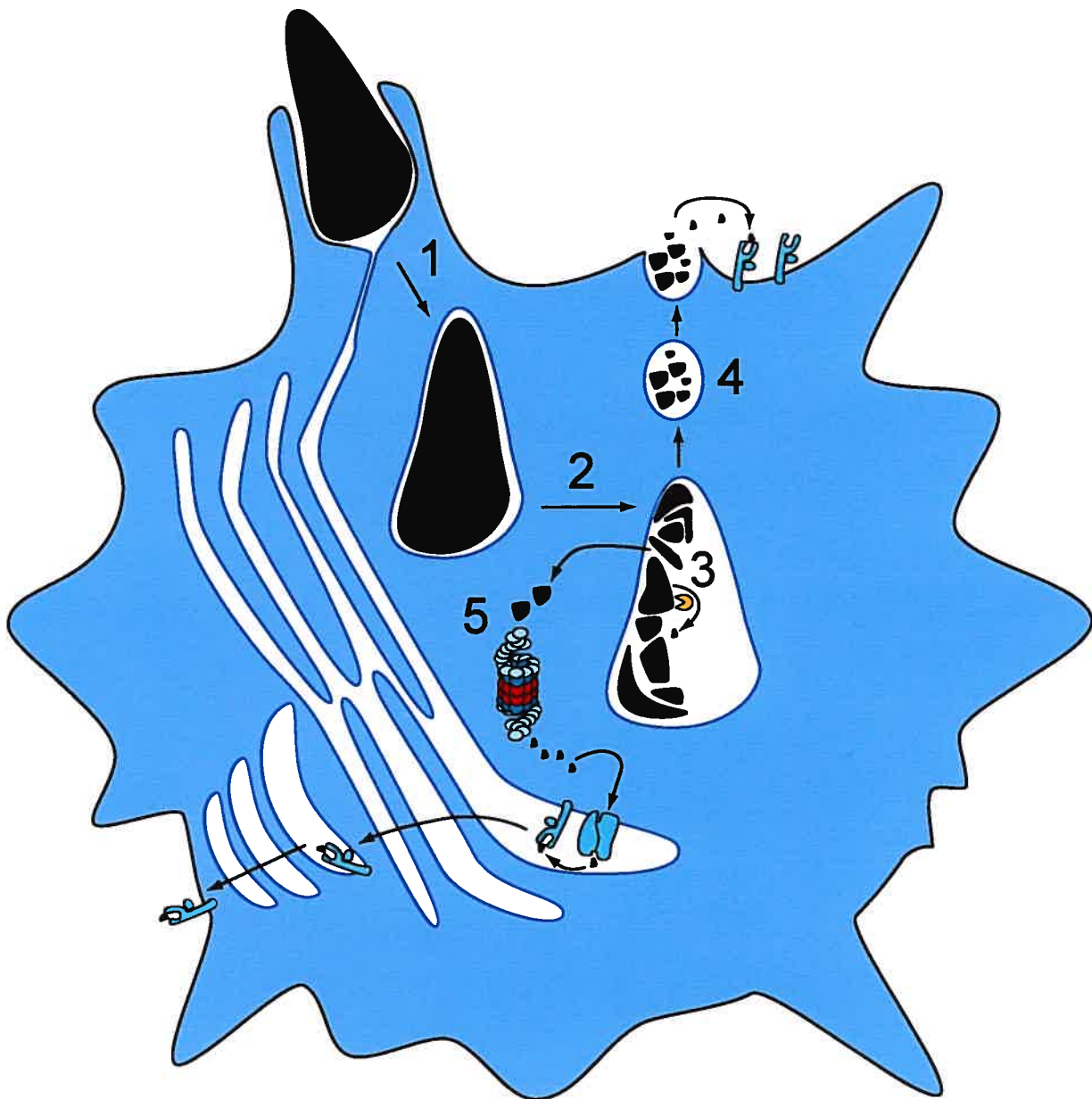


Figure 9. Modèles de présentation croisée d'antigènes exogènes

1, Phagocytose d'un pathogène. 2, Maturation des phagosomes. 3, Dégradation du pathogène en protéines, fragment de protéines et peptides exogènes. 4, Premier modèle de présentation croisée : la régurgitation de peptides et liaison au CMH de classe I de surface. 5, Deuxième modèle de présentation croisée : la voie « phagosome-au-cytosol » où les protéines exogènes sont transloquées dans le cytoplasme et dégradées par les protéasomes. Les peptides générés sont transloqués dans le RE par le transporteur TAP et chargés sur le CMH de classe I, puis acheminés à la surface par la voie de sécrétion.

Brucella abortus, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Leishmania major* a aussi été rapportée, suggérant un rôle de la présentation croisée et des CD8⁺ dans le contrôle des pathogènes (Pfeifer *et al.*, 1993 ; Oliveira *et al.*, 1995 ; Turner *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 1996 ; Canaday *et al.*, 1999 ; Belkaid *et al.*, 2002). Les cellules dendritiques furent plus tard démontrées comme étant aptes à présenter sur le CMH de classe I des antigènes exogènes de cellules apoptotiques, élargissant le rôle physiologique de la présentation croisée (Albert *et al.*, 1998 ; Albert *et al.*, 1998 ; Hoffmann *et al.*, 2000 ; Albert *et al.*, 2001 ; Propato *et al.*, 2001 ; Selenko *et al.*, 2001).

La présentation croisée d'antigènes exogènes sur le CMH de classe I demeure cependant un sujet hautement controversé en immunologie. En effet, certains groupes clament que la présentation croisée ne se produit pas physiologiquement ou avec des effets insignifiants (Zinkernagel *et al.*, 2002) alors que de façon opposée, d'autres groupes font valoir que la présentation croisée est un phénomène robuste (Chen *et al.*, 2004). Même les plus récents traités d'immunologie (Fundamental immunology de William Paul, 2003) mentionnent à peine le phénomène de présentation croisée et le décrivent comme étant très peu compris. Une partie importante de la controverse entourant la présentation croisée vient du fait que la machinerie responsable de la génération de peptides exogènes et endogènes réside dans des compartiments différents à l'intérieur de la cellule: le cytoplasme et le RE pour les peptides endogènes, et les organelles endo/phagocytaires pour les peptides exogènes.

5.2 Premier modèle : la régurgitation

Avec le dogme de la ségrégation des voies de présentation en tête, un modèle de régurgitation a été élaboré pour expliquer comment des peptides exogènes pouvaient atteindre un compartiment cellulaire contenant le CMH de classe I, dans ce cas-ci la

membrane plasmique (Harding *et al.*, 1994 ; Song *et al.*, 1996) (Figure 9). Dans ce modèle, les peptides exogènes sont générés soit entièrement ou en partie dans les phagosomes par des protéases lysosomiales, puis les peptides sont transportés en dehors de la cellule par exocytose ou des vésicules de recyclage. Il a également été suggéré récemment que des protéines régurgitées pouvaient être dégradées en peptides à l'extérieur de la cellule par des protéases sécrétées, suivi d'un échange de peptides avec le CMH de classe I de surface (Chen *et al.*, 2004). Cependant, dans ce type de modèle, les protéases lysosomiales des phagosomes ou celles sécrétées à l'extérieur seraient entièrement responsables de la génération de peptides exogènes avec une haute affinité pour le CMH de classe I. Deux études récentes ont démontré que les voies accessoires à la protéolyse par le protéasome sont beaucoup moins efficaces dans la production d'antigènes spécifiques au CMH de classe I (Kessler *et al.*, 2003) et qu'une génération efficace de peptides compétents pour la stimulation des CD8⁺ dépendait grandement du protéasome (Goldberg *et al.*, 2002 ; Cascio *et al.*, 2001). Dans cette dernière étude, la dégradation d'OVA par le protéasome a été démontrée comme étant très importante pour la génération du peptide immunodominant SIINFEKL (la séquence d'acides aminés 257 à 264 de l'OVA). Le protéasome produit une bonne quantité de peptides correctement coupés en C-terminal et allongés en N-terminal. Les extensions N-terminales sont ensuite raccourcies par une aminopeptidase résidente du RE récemment découverte, ERAP, en la forme finale de 8 acides aminés qui est chargée sur le CMH de classe I (Saric *et al.*, 2002 ; Serwold *et al.*, 2002 ; York *et al.*, 2002). Il se pourrait également que l'aminopeptidase cytosolique TPPII joue un rôle dans le raccourcissement des extensions N-terminales avant la translocation par TAP (Reits *et al.*, 2004). Il n'est cependant pas clair si le rôle de ces deux types d'aminopeptidases se chevauche. Des sous-espèces du protéasome appelées immunoprotéasomes, qui apparaissent suivant la stimulation par des cytokines tel l'interféron- γ , améliorent également la génération de peptides possédant une haute affinité pour le CMH de classe I (Belich *et al.*, 1994 ; Kelly *et al.*, 1991 ; Groettrup *et al.*, 1996 ; Nandi *et al.*, 1996 ; Hisamatsu *et al.*, 1996 ; Strobl *et al.*, 2001 ; Groettrup *et al.*, 2001). Pour conclure sur la

régurgitation, les mécanismes permettant la génération de peptides possédant une haute affinité pour le chargement sur le CMH de classe I par le système cytosolique du protéasome a été bien décrit, mais la génération de peptides à haute affinité par les protéases lysosomiales n'a pas été démontrée comme étant très efficace.

5.3 Deuxième modèle : la voie phagosome-au-cytosol

Un second modèle pour la présentation croisée a été élaboré avec la découverte d'une voie de transport « phagosome-au-cytosol » pour les antigènes exogènes (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1995) (Figure 9). Ces travaux représentent un avancement important dans la compréhension des événements moléculaires prenant place dans la présentation croisée, puisqu'il a été démontré que des antigènes exogènes peuvent être transportés de la lumière du phagosome au cytoplasme par un transporteur phagosomal inconnu, donnant ainsi accès au protéasome. Les antigènes rétrotransloqués et dégradés en peptides peuvent ensuite être transportés par TAP à l'intérieur du RE, traités par ERAP puis chargés sur le CMH de classe I. Les peptides exogènes prennent ensuite la même route que les peptides endogènes et voyagent via la voie de sécrétion pour atteindre la surface cellulaire. Ce modèle a permis d'expliquer comment des antigènes exogènes peuvent être apprêtés en peptides compétents et atteindre les compartiments ségrégués contenant le CMH de classe I.

Cependant, les résultats contradictoires qui ont été obtenus par différents groupes concernant le transport des peptides exogènes pour le chargement sur le CMH de classe I et le transport de ce complexe à la surface cellulaire ont créé la controverse autour de ce modèle. En effet, certains groupes ont rapporté que la présentation croisée peut s'effectuer indépendamment de TAP (Bachmann *et al.*, 1995 ; Song *et al.*, 1996 ; Schoenberger *et al.*, 1998 ; Song *et al.*, 1999 ; Gromme *et al.*, 1999 ; Ruedl *et al.*, 2002), ce qui dans ce cas

renforcerait le premier modèle de l'apprêtement vacuolaire/régurgitation des peptides, alors que d'autres ont démontré un besoin pour la présentation croisée d'utiliser le protéasome et TAP (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1996 ; Day *et al.*, 1994 ; Day *et al.*, 1997 ; Brossart *et al.*, 1997 ; Shen *et al.*, 1997 ; den Haan *et al.*, 2000 ; Chefalo *et al.*, 2003), ce qui dans ce cas renforcerait le modèle de la voie phagosome-au-cytosol avec un apprêtement par le protéasome et un transport par TAP dans le RE. Pour le transport à la surface cellulaire du complexe peptide exogène:CMH de classe I, certains ont observé que ce transport ne passait pas par le Golgi et était brefeldine A (BFA)-indépendant (Song *et al.*, 1996 ; Day *et al.*, 1997), favorisant le modèle de la régurgitation, alors que d'autres ont établi que le complexe voyageait via le Golgi dans un processus BFA-dépendant (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1995 ; Shen *et al.*, 1997 ; Brossart *et al.*, 1997), ce qui favoriserait dans ce cas-ci le modèle de la voie phagosome-au-cytosol.

Des études récentes ont également démontré que les peptides générés par le protéasome ont un temps très limité pour trouver TAP avant d'être rapidement dégradés par des protéases cytosoliques telles TPPII, TOP et LAP (Reits *et al.*, 2003). Considérant le fait que les protéines exogènes provenant du phagosome qui sont prises en charge par le protéasome sont beaucoup moins nombreuses que les protéines endogènes et que les peptides exogènes doivent compétitionner contre tous les peptides endogènes pour le transport par TAP et le chargement sur le CMH de classe I, il est assez surprenant de pouvoir encore observer une bonne stimulation des CD8⁺ par les protéines exogènes. Les résultats décrits plus loin au chapitre II de cette thèse permettent de lever le voile sur les portions nébuleuses des modèles de présentation croisée en démontrant que les phagosomes possèdent tous les éléments requis pour être auto-suffisants dans la présentation croisée d'antigènes exogènes (Houde *et al.*, 2003 ; Guermonprez *et al.*, 2003 ; Ackerman *et al.*, 2003). Cette découverte provient directement d'une étude protéomique (Garin *et al.*, 2001) et fonctionnelle (Gagnon *et al.*, 2002) démontrant que les phagosomes sont formés par le recrutement de membranes du RE dans les cellules présentatrices d'antigènes (APCs).

5.4 La stimulation croisée *in vivo* des CD8⁺ par des antigènes exogènes

Depuis les premières évidences *in vivo* de la production de CD8⁺ spécifiques contre *Mycobacterium leprae* chez des souris (Chiplunkar *et al.*, 1986), de nombreux groupes ont rapporté plusieurs cas de stimulation croisée («cross-priming») de CD8⁺ suite à l'infection par un pathogène cellulaire (Pfeifer *et al.*, 1993 ; Oliveira *et al.*, 1995 ; Turner *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 1996 ; Canaday *et al.*, 1999 ; Belkaid *et al.*, 2002). Plusieurs groupes ont également utilisé l'OVA comme modèle d'étude de la réponse immunitaire chez la souris puisque cette protéine est reconnue comme étrangère et provoque ainsi la production de lymphocytes T spécifiques. Par exemple, chez une souris injectée avec un ADN codant pour de l'OVA qui sera sécrétée (sOVA), il s'ensuit une production d'IgG₁ dépendante de la production de lymphocytes T CD4⁺ (Boyle *et al.*, 1997) ainsi qu'une production de CD8⁺ spécifiques à l'OVA. Si la souris est injectée avec de l'ADN codant pour de l'OVA sous forme membranaire (mOVA) ou cytoplasmique (cOVA), la production de CD8⁺ spécifiques à l'OVA est également observée (Boyle *et al.*, 1997). Il est cependant intéressant de constater que la réponse des CD8⁺ est plus forte dans le cas de la sOVA et la mOVA que dans le cas de la cOVA. Cette situation est surprenante puisqu'il aurait été logique de penser que l'OVA cytoplasmique puisse accéder facilement à la voie de présentation des protéines endogènes des cellules exprimant cette construction. Il semble cependant que pour générer une production de CD8⁺ spécifiques, les cellules exprimant l'OVA cytoplasmique doivent être phagocytées par des phagocytes professionnels non transfectés, qui peuvent ensuite traiter et apprêter la cOVA, puis stimuler la prolifération de CD8⁺ spécifiques (Boyle *et al.*, 1997).

La stimulation croisée des CD8⁺ est également observée pour différents cas de cellules infectées par des virus. Le cas de la protéine EBNA1 du virus Epstein-Barr est

typique de cette situation. La protéine EBNA1 possède un domaine répétitif formé de Gly-Ala qui lui permet d'inhiber sa dégradation par le protéasome (Levitskaya *et al.*, 1995 ; Levitskaya *et al.*, 1997). Les lymphocytes B infectés par le virus Epstein-Barr ne peuvent donc pas présenter à leur surface d'épitope provenant de EBNA1 afin de signaler leur infection au système immunitaire. Cette protéine est en grande partie responsable du fait que le virus Epstein-Barr ne peut pas être éliminé par l'organisme et est par conséquent présent dans 90% de la population (Masucci, 2004). Cependant, contrairement à ce qu'on pourrait penser, des CD8⁺ spécifiques à la protéine EBNA1 peuvent être détectés chez des individus infectés par le virus Epstein-Barr. Cette situation exceptionnelle est rendue possible grâce la phagocytose par des cellules dendritiques de cellules infectées par le virus Epstein-Barr. Les cellules dendritiques procèdent ensuite à un traitement de la protéine EBNA1 qui leur permet de présenter des épitopes provenant de EBNA1 sur des CMH de classe I à leur surface et ainsi stimuler la production de CD8⁺ spécifiques à EBNA1 (Subklewe *et al.*, 2001 ; Bickham *et al.*, 2003). Ces CD8⁺ ainsi générés pourraient jouer un rôle important dans le contrôle des lymphocytes B transformés en cellules tumorales par le virus Epstein-Barr (Bickham *et al.*, 2003).

Les exemples de stimulation croisée de CD8⁺ ne concernent pas seulement les pathogènes cellulaires et les cellules infectées par des virus, mais également les cellules tumorales. Plusieurs études ont démontré en effet chez différents types de tumeurs tels le cancer du sein et le cancer ovarien, que des cellules tumorales exprimant des protéines aberrantes étaient phagocytées par des cellules dendritiques qui stimulent ensuite la production de CD8⁺ spécifiques à ces cellules tumorales (Albert *et al.*, 1998). Il s'ensuit alors une régression des tumeurs causée par les CD8⁺. Le mécanisme engendrant ce processus n'est pas parfaitement clair, mais l'hypothèse avancée est que des cellules tumorales entrant en apoptose sont phagocytées par des cellules dendritiques, et suite à la présentation croisée d'un antigène tumoral aux CD8⁺ dans les ganglions lymphatiques, les

CD8⁺ prolifèrent et vont ensuite éliminer directement les cellules tumorales (Albert *et al.*, 1998a ; Albert *et al.*, 1998b ; Schuler et Steinman, 1997).

6. L'interféron- γ

L'interféron- γ est une cytokine qui joue un rôle majeur dans la coordination de plusieurs programmes cellulaires immunologiques via la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Une des cibles privilégiées de l'interféron- γ est le macrophage dont les fonctions microbicides sont suractivées par cette cytokine. L'interféron- γ stimule également chez le macrophage des mécanismes anti-tumoraux et anti-viraux, et augmente la présentation d'antigènes à la surface cellulaire (Boehm *et al.*, 1997 ; Schroder *et al.*, 2004). Cette cytokine provoque aussi l'attraction des lymphocytes et dirige la croissance, la maturation et la différenciation de plusieurs types cellulaires (Perussia *et al.*, 1983 ; Young et Hardy, 1995 ; Boehm *et al.*, 1997). Il a également été rapporté que l'interféron- γ accroît l'activité des cellules NK et régule des fonctions des lymphocytes B tels la production d'immunoglobulines et leur changement de classe (Carnaud *et al.*, 1999 ; Finkelman *et al.*, 1988). Des souris où le gène codant pour l'interféron- γ et son récepteur IFNGR1 sont supprimés ne montrent pas d'anomalies dans le développement de leur morphologie et de leur système immunitaire (Huang *et al.*, 1993). Cependant, ces souris montrent une déficience dans la résistance naturelle aux bactéries, parasites et infections virales tels que le virus vaccinia, le virus causant l'encéphalomyélite murine de Theiler, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, et plusieurs espèces de mycobactéries peu virulentes (Huang *et al.*, 1993 ; Pearl *et al.*, 2001 ; van den Broek *et al.*, 1995 ; Buchmeier et Schreiber, 1985 ; Kamijo *et al.*, 1993 ; Suzuki *et al.*, 1988).

6.1 Les classes d'interférons

L'interféron- γ est le seul membre du type II de la famille des interférons (Schroder *et al.*, 2004). Les autres interférons, α , β , ω et τ , font partie du type I (Schroder *et al.*, 2004). Les interférons ont été classés en deux types selon la spécificité à leur récepteur et l'homologie de séquence. Ainsi, les interférons du type I lient le récepteur IFNAR alors que l'interféron- γ lie son propre récepteur appelé IFNGR (Schroder *et al.*, 2004). L'interféron- γ est également encodé dans un locus chromosomique différent des autres interférons (Schroder *et al.*, 2004). L'interféron- γ est sécrété par les lymphocytes T CD4⁺ (T_H1) et T CD8⁺, ainsi que par les cellules NK, les APCs, les cellules B et les cellules NKT (Bach *et al.*, 1997 ; Young, 1996 ; Carnaud *et al.*, 1999 ; Frucht *et al.*, 2001 ; Gessani et Belardelli, 1998 ; Yoshimoto *et al.*, 1998 ; Flaishon *et al.*, 2000 ; Harris *et al.*, 2000). Dans le cas des interférons de type I, ils sont tous à divers degrés sécrétés par presque tous les types cellulaires (Schroder *et al.*, 2004). La production d'interféron- γ est contrôlée par les cytokines sécrétées par les APCs, soit l'IL-12 et l'IL-18, qui servent ici de lien entre l'infection et la production d'interféron- γ dans l'immunité innée (Golab *et al.* 2000 ; Munder *et al.*, 2001 ; Munder *et al.*, 1998 ; Fukao *et al.*, 2000 ; Otani *et al.*, 1999 ; Akira, 2000 ; Dinarello, 1999). L'IL-12 est sécrétée en particulier par les macrophages suite à la reconnaissance de pathogènes. Des chimiokines sont également sécrétées qui vont attirer les cellules NK au site de l'inflammation et l'IL-12 va stimuler la sécrétion d'interféron- γ chez ces cellules (Salazar-Mather *et al.*, 2000 ; Pien *et al.*, 2000). La sécrétion d'interféron- γ peut également être régulée de façon négative par l'IL-4, l'IL-10, le TGF- β et les glucocorticoïdes (Sen, 2001 ; Perussia *et al.*, 1983 ; Schindler *et al.*, 2001 ; Fukao *et al.*, 2001 ; Hochrein *et al.*, 2001). On croit que les deux types d'interférons ont évolué dans le but de se compléter les uns et les autres afin d'assurer la défense contre un large spectre de pathogènes.

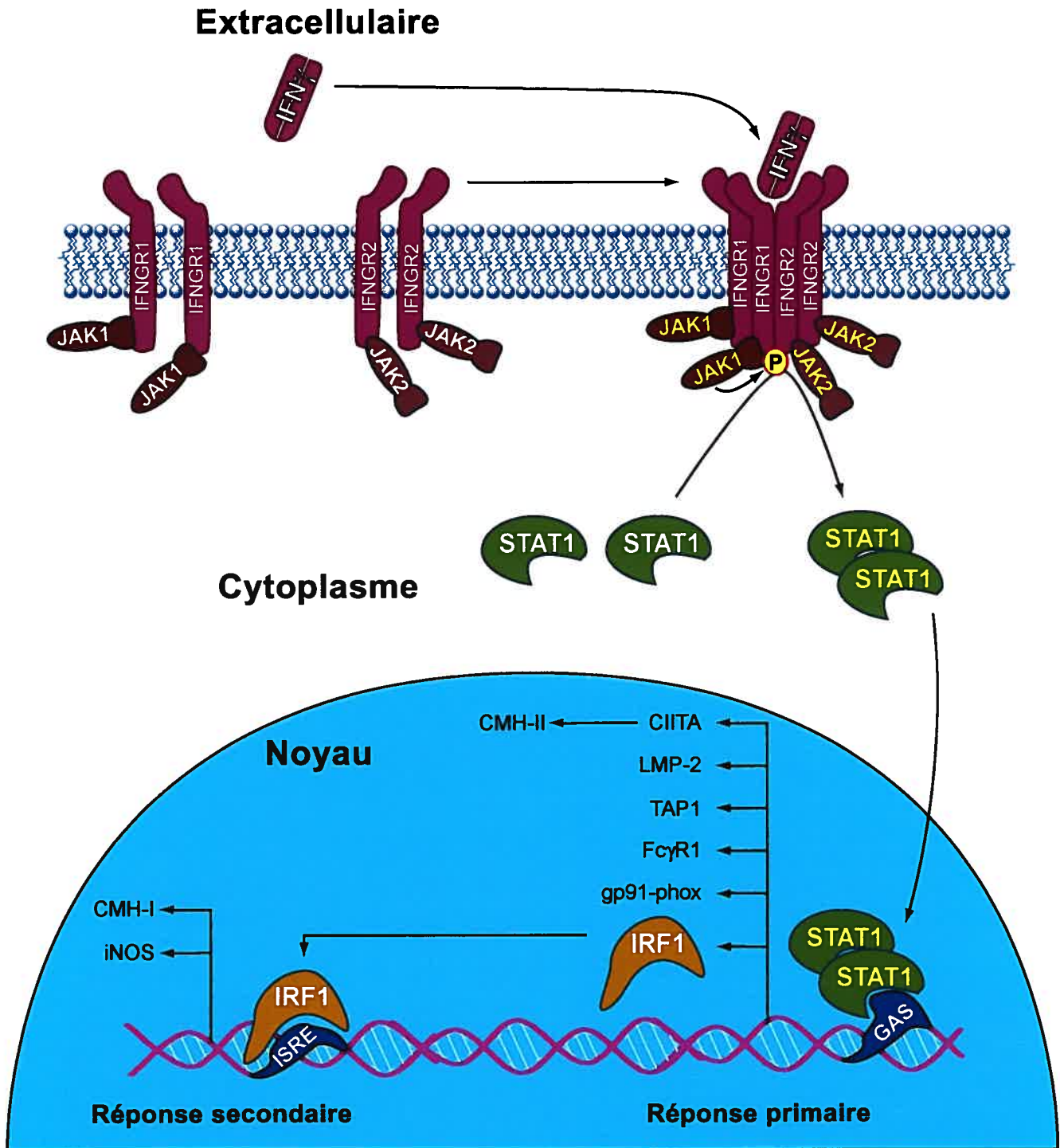


Figure 10. Transduction de signaux activés par l'interféron- γ

L'interféron- γ lie son récepteur composé de deux chaînes IFNGR1 et deux chaînes IFNGR2. Jak2 s'auto-phosphoryle et phosphoryle Jak1. Jak1 peut ensuite phosphoryler un résidu tyrosine des deux chaînes IFNGR1, formant un site d'ancrage liant les domaines SH2 de Stat1. Le recrutement de Stat1 en paire et sa phosphorylation induit sa dissociation sous forme d'homodimère qui entre dans le noyau et lie les éléments GAS pour activer la réponse primaire à l'interféron- γ . Parmi les gènes induits se retrouve IRF-1 qui active la réponse secondaire en liant les éléments ISRE.

6.2 Le récepteur de l'interféron- γ

Le récepteur de l'interféron- γ , IFNGR, comporte deux chaînes IFNGR1 servant à lier le ligand et deux chaînes IFNGR2 impliquées dans la transduction de signaux (Figure 10). La chaîne IFNGR2 est l'élément limitant dans la réponse à l'interféron- γ puisque la chaîne IFNGR1 est habituellement en surplus (Bach *et al.*, 1997 ; Bernabei *et al.*, 2001). La chaîne IFNGR2 est exprimée de façon constitutive, mais son expression peut être régulée selon l'état de la différenciation ou de l'activation cellulaire (Bach *et al.*, 1997). Les deux chaînes du récepteur de l'interféron- γ ne possèdent pas d'activité kinase ou phosphatase intrinsèque et doivent ainsi s'associer avec différentes protéines pour effectuer la transduction de signaux. Ainsi, le domaine intracellulaire de la chaîne IFNGR1 possède des motifs de liaison pour la tyrosine kinase Janus 1 (Jak1) et la protéine activatrice de transcription Stat1 (Kaplan *et al.*, 1996 ; Greenlund *et al.*, 1994 ; Farrar *et al.*, 1991 ; Farrar *et al.*, 1992). Ces motifs de liaison sont essentiels pour la phosphorylation du récepteur, la transduction de signaux et l'induction d'une réponse biologique. La région intracellulaire de la chaîne IFNGR2 contient un motif de liaison pour la tyrosine kinase Jak2 participant également à la transduction de signaux (Kotenko *et al.*, 1995 ; Bach *et al.*, 1996).

6.3 La transduction de signaux activés par l'interféron- γ

La transduction de signaux activés par l'interféron- γ se fait principalement via la voie Jak-Stat, qui est utilisée par plus de 50 cytokines, facteurs de croissance et hormones (Subramaniam *et al.*, 2001) (Figure 10). La signalisation via Jak-Stat requiert le recrutement du récepteur et l'activation des membres de la famille des tyrosine kinases Janus (Jaks 1-3 et Tyk2) et des Stats (Stats 1-6, ainsi que Stat5a et Stat5b) afin de contrôler la transcription des gènes cibles via des éléments de réponse (Schroder *et al.*, 2004). La

liaison de l'interféron- γ à son récepteur induit l'auto-phosphorylation de Jak2 et son activation, ce qui permet ensuite la phosphorylation de Jak1 par Jak2 (Briscoe *et al.*, 1996). Jak1 activé phosphoryle des tyrosines sur le résidu 440 de chaque chaîne IFNGR1, ce qui forme deux sites d'ancrage adjacents pouvant lier les domaines SH2 de Stat1 latent (Greenlund *et al.*, 1994 ; Igarashi *et al.*, 1994 ; Greelund *et al.*, 1995 ; Heim *et al.*, 1995). Stat1 est recruté au récepteur en paire et phosphorylé probablement par Jak2 près de son extrémité C-terminale sur la tyrosine 701 (Briscoe *et al.*, 1996). La phosphorylation de Stat1 induit sa dissociation du récepteur sous forme d'homodimère (Greenlund *et al.*, 1995). L'activation de Stat1 suite à la liaison de l'interféron- γ à son récepteur se fait en moins d'une minute (Greenlund *et al.*, 1994 ; Igarashi *et al.*, 1994). L'homodimère Stat1 activé entre ensuite dans le noyau et se lie aux éléments GAS des promoteurs de gènes répondant à l'interféron- γ (Darnell *et al.*, 1994 ; Schindler et Darnell, 1995 ; Ramana *et al.*, 2000). Les promoteurs contenant les éléments GAS sont formés de la séquence consensus TTCN(2-4)GAA (Decker *et al.*, 1997). La première vague de transcription initiée par l'interféron- γ se produit en 15 à 30 minutes (Kerr et Stark, 1991). Plusieurs gènes ainsi induits sont des facteurs de transcription, tel que IRF-1, qui sont eux-mêmes activés par l'interféron- γ et capables de catalyser la deuxième vague de transcription. Pendant cette deuxième vague, plusieurs gènes comprenant des éléments GAS ainsi que des éléments ISRE (élément de réponse stimulé par l'interféron- γ) seront activés (Paludan, 1998).

6.4 Les effets cellulaires de l'interféron- γ

6.4.1 Effets sur la présentation d'antigènes par le CMH de classe I

Les interférons du type I et II activent plusieurs fonctions dans la voie de présentation d'antigènes sur le CMH de classe I. Cette activation permet d'augmenter la quantité et la diversité des peptides présentés à la surface cellulaire. L'augmentation de la quantité de CMH de classe I à la surface cellulaire par l'interféron- γ est importante pour la réponse de l'hôte aux pathogènes intracellulaires puisque cela augmente la possibilité de reconnaissance des peptides étrangers par les lymphocytes T cytotoxiques et favorise l'induction de l'immunité à médiation cellulaire. L'interféron- γ stimule aussi le remplacement de sous-unités constitutives du protéasome, soit les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ du corps catalytique par les sous-unités LMP-2, MECL et LMP-7 afin de former l'immunoprotéasome qui favorise l'augmentation de la quantité, de la qualité et du répertoire de peptides pouvant être chargés sur le CMH de classe I (Belich *et al.*, 1994 ; Kelly *et al.*, 1991 ; Groettrup *et al.*, 1996 ; Nandi *et al.*, 1996 ; Hisamatsu *et al.*, 1996 ; Strobl *et al.*, 2001 ; Groettrup *et al.*, 2001). La spécificité du clivage des peptides par l'immunoprotéasome pourrait permettre la production de peptides plus aptes à lier le CMH de classe I et ainsi augmenter l'efficacité du système. En augmentant les niveaux et la diversité des épitopes présentés aux lymphocytes T CD8⁺, l'interféron- γ favorise ainsi une meilleure surveillance immunitaire des pathogènes. L'interféron- γ provoque également l'expression de PA28 qui s'associe au protéasome et altère sa spécificité de clivage (Dick *et al.*, 1996 ; Groettrup *et al.*, 1996). Le transporteur TAP est également un élément de la voie de présentation via le CMH de classe I qui est induit par l'interféron- γ de même que plusieurs chaperones impliquées dans le chargement du peptide sur le CMH de classe I.

6.4.2 Effets sur la présentation d'antigènes par le CMH de classe II

De tous les interférons, seul l'interféron- γ peut efficacement accroître la présentation d'antigènes via le CMH de classe II et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Boehm *et al.*, 1997 ; Mach *et al.*, 1996). L'interféron- γ augmente les niveaux de CMH de classe II dans les cellules exprimant de façon constitutive ces molécules, soit les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages (Mach *et al.*, 1996). Cette cytokine est également capable d'induire l'expression de CMH de classe II dans les phagocytes non-professionnels (Billiau *et al.*, 1988). La quantité de complexes peptide:CMH de classe II est également augmentée par l'interféron- γ grâce à la modulation positive de l'expression de la chaîne invariante, des cathepsines B, H et L, des protéases lysosomiales et de HLA-DM impliqué dans l'accessibilité des peptides au site de liaison de peptides du CMH de classe II (Mach *et al.*, 1996 ; Kern *et al.*, 1995 ; Figueiredo *et al.*, 1989 ; Chang et Flavell, 1995 ; Cresswell, 1994 ; Wolf et Ploegh, 1995 ; Lah *et al.*, 1995 ; Lafuse *et al.*, 1995). Une des cibles privilégiées de l'interféron- γ est le facteur CIITA qui coordonne la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la présentation via le CMH de classe II (Boss, 1997). Lorsque CIITA est muté chez la souris, on assiste à une perte totale de l'expression constitutive et de l'induction des molécules du CMH de classe II, ce qui démontre l'importance de l'interféron- γ dans ce processus (Chang *et al.*, 1996).

6.4.3 Effets sur le développement de la réponse T_{H1}

L'interféron- γ est un produit majeur des lymphocytes T_{H1} et dirige la réponse immunitaire vers un phénotype du type T_{H1}. Cette réponse T_{H1} se produit puisque l'interféron- γ active l'immunité à médiation cellulaire via l'activation des cellules NK, l'augmentation des interactions entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices

d'antigènes et par l'activation des macrophages (Boehm *et al.*, 1997). Les populations de lymphocytes T_H2 sont inhibées par l'interféron- γ , via l'inhibition de l'expression de l'IL-4, ce qui favorise encore plus la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ en un phénotype T_H1 (Morinobu et Kumagai, 1998 ; Schroder *et al.*, 2004). L'expression de l'IL-12 par les T_H1 est induite par l'interféron- γ et joue un rôle essentiel dans la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ en un phénotype T_H1 lors de la réponse primaire à un antigène (Schroder *et al.*, 2004 ; Yoshida *et al.*, 1994). Le LPS ainsi que d'autres patrons moléculaires associés aux pathogènes induisent directement la sécrétion d'IL-12 par les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles et provoquent par le fait même l'induction de la sécrétion d'interféron- γ par les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs, stimulés par des antigènes et par les cellules NK (Heufler *et al.*, 1996 ; Coutelier *et al.*, 1995 ; Bliss *et al.*, 1999 ; Cassatella *et al.*, 1995 ; Macatonia *et al.*, 1995 ; Lederer *et al.*, 1996). Puisque l'interféron- γ ainsi sécrété vient à son tour stimuler la sécrétion d'IL-12, il s'établit une boucle d'induction positive qui serait importante pour l'initiation et la stabilisation de la réponse T_H1 (Yoshida *et al.*, 1994 ; Kubin *et al.*, 1994). Une autre cytokine, l'IL-18, est également induite et joue aussi un rôle dans ce processus en agissant en synergie avec l'IL-12 (Akira, 2000 ; Dinarello, 1999).

6.4.4 L'état antiviral induit par l'interféron- γ

L'invasion virale induit habituellement une réponse impliquant les interférons du type I (Taniguchi et Takaoka, 2002). Par la suite, l'interféron- γ est également induit et jouerait un rôle dans la coordination de la réponse immunitaire et dans l'établissement d'un état antiviral à long terme (Huang *et al.*, 1993 ; Muller *et al.*, 1994 ; Lu *et al.*, 1998 ; Cantin *et al.*, 1999). Les mécanismes antiviraux induits par l'interféron- γ incluent des enzymes antivirales telle la PKR, une sérine/thréonine kinase. PKR est exprimé de façon constitutive sous une forme inactive et peut s'autophosphoryler suite à un signal d'activation (Meurs *et*

al., 1990 ; Beretta *et al.*, 1996). L'ARN double brin ainsi que l'héparine sont des activateurs connus de la PKR (Hovanessian et Galabru, 1987). PKR activé peut ensuite phosphoryler et inactiver le facteur eIF-2 α , impliqué dans la traduction, ce qui inhibe la synthèse des protéines cellulaires et par le fait même la synthèse des protéines virales (Meurs *et al.*, 1990).

6.4.5 Effets sur le cycle cellulaire, la croissance et l'apoptose

Suite à la production en masse des macrophages par la moëlle osseuse, les macrophages vont proliférer, se différencier et acquérir leurs fonctions microbicides spécialisées, ou mourir par apoptose dépendante de la présence de stimuli extracellulaires (Xaus *et al.*, 2001). Plusieurs études rapportent que l'interféron- γ cause l'arrêt du cycle cellulaire des macrophages et fournit un signal de survie, alors que certains autres travaux suggèrent que l'interféron- γ agit comme signal pro-apoptotique. Au niveau des effets sur le cycle cellulaire, un des effets de l'interféron- γ le plus facilement observable est l'inhibition de la croissance cellulaire. Cette propriété serait également propre aux interférons du type I. Cet effet sur la croissance serait médié par l'arrêt du cycle cellulaire au stade G1/S grâce à l'augmentation des niveaux des protéines Ink4 et des CKIs (« cyclin-dependent kinase inhibitors ») de la famille Cip/Kip (Xaus *et al.*, 1999 ; Harvat *et al.*, 1997 ; Matsuoka *et al.*, 1999 ; Kominsky *et al.*, 1998 ; Sangfelt *et al.*, 1997 ; Hobeika *et al.*, 1997). L'interféron- γ induit l'expression des CKIs p21 et p27 qui inhibent respectivement les protéines du cycle cellulaire CDK2 et CDK4 (Mandal *et al.*, 1998 ; Chin *et al.*, 1996 ; Takami *et al.*, 2002). L'inhibition de ces CDKs entraîne la déphosphorylation de pRb, qui peut ainsi séquestrer le facteur de transcription E2F et prévenir la transcription des gènes permettant le passage de la cellule de la phase G1 à la phase S (Strunk *et al.*, 1985). Au niveau de l'apoptose induite par l'interféron- γ , il s'agirait d'un mécanisme de protection contre les pathogènes intracellulaires qui colonisent les macrophages. Dans ce cas-ci, la réponse à l'interféron- γ

pro- ou anti-apoptotique serait déterminée par les niveaux d'expression du facteur IRF-1 (Bernabei *et al.*, 2001a ; Novelli *et al.*, 1996 ; Bernabei *et al.*, 2001b). L'hypothèse serait que chez les cellules exprimant un haut niveau de récepteurs IFNGR, l'interféron- γ cause une activation très rapide de Stat1 qui produit ensuite une grande quantité d'IRF-1, ce qui déclencherait l'apoptose. Cependant, chez les cellules exprimant de bas niveaux de récepteurs IFNGR, Stat serait activé plus lentement et produirait ainsi moins d'IRF-1, ce qui serait insuffisant pour induire l'apoptose (Bernabei *et al.*, 2001a).

6.5.6 Activation des fonctions effectrices microbicides

Une des plus importantes fonctions de l'interféron- γ est d'activer les fonctions effectrices microbicides des macrophages. Les macrophages ainsi activés montrent un accroissement de la pinocytose et de la phagocytose ainsi qu'une augmentation de leur capacité à tuer les pathogènes (Schroder *et al.*, 2004). Parmi les mécanismes microbicides induits par l'interféron- γ , on retrouve l'induction du système de la NADPH oxydase (produisant des espèces réactives oxygénées, ROS), l'induction de la production de NO par iNOS (« inducible nitric oxyde synthase »), la déplétion de tryptophane et l'augmentation des enzymes lysosomiaux favorisant la destruction des pathogènes (Schroder *et al.*, 2004 ; Decker *et al.*, 2002). La production de ROS et de NO joue un rôle important particulièrement dans la destruction des bactéries, virus, protozoaires, helminthes, champignons et cellules tumorales puisque ces molécules possèdent l'avantage d'être de faible poids moléculaire et lipophiles, ce qui leur permet de traverser facilement les parois microbiennes pour exercer leurs effets (MacMicking *et al.*, 1997 ; Roos *et al.*, 1992 ; Nathan et Gabay, 1992). L'importance de ces molécules dans la défense de l'hôte est démontrée chez les souris déficientes en NADPH oxydase et iNOS qui sont fortement susceptibles aux infections par des pathogènes (Shiloh *et al.*, 1999). La cinétique d'apparition des deux types de molécules est différente, les ROS apparaissant en moins

d'une heure suite à un stimulus tandis que le NO apparaît 24 heures après la rencontre avec le pathogène (Schroder *et al.*, 2004).

6.5.6.1 Activation du système de la NADPH oxidase

Le système de la NADPH oxidase est composé de deux sous-unités localisées à la membrane phagosomale, gp91^{phox} et gp22^{phox}, et de deux sous-unités cytosoliques, p47^{phox} et p67^{phox}. Suite à la phagocytose, les composantes cytosoliques transloquent à la membrane afin de former le complexe actif qui génère l'anion superoxide O₂⁻ dans le phagosome grâce au transfert d'un électron à l'oxygène moléculaire (Schroder *et al.*, 2004). Ce phénomène est appelé choc respiratoire (« respiratory burst ») et l'anion superoxide ainsi généré réagit spontanément pour former le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les radicaux hydroxyl (·OH) et l'acide hypochlorique (HOCl) (MacMicking *et al.*, 1997). Ces espèces oxygénées peuvent également réagir avec les réactifs produits par iNOS afin de former plusieurs autres types d'espèces toxiques telle la peroxynitrite, ce qui permet de moduler la cytotoxicité par une bonne variété de mécanismes (MacMicking *et al.*, 1997 ; Radi *et al.*, 1991a ; Radi *et al.*, 1991b). Au niveau de ce système, l'interféron-γ augmente l'expression des sous-unités gp91^{phox} et p67^{phox} (Cassatella *et al.*, 1990 ; Newburger *et al.*, 1988 ; Gupta *et al.*, 1992 ; Cassatella *et al.*, 1989). L'importance biologique de la NADPH oxidase est illustrée par la maladie chronique granulomateuse où la NADPH oxidase est défectueuse, ce qui cause des infections récurrentes et souvent fatales (Schroder *et al.*, 2004).

6.5.6.2 Induction de la production de NO

Le NO est produit par les enzymes NOS1 à NOS3 lors de la conversion NADPH-dépendante de la L-arginine en L-citrulline (Schroder *et al.*, 2004). L'isoforme NOS2 aussi

appelée iNOS est inductible par l'interféron- γ ou des stimuli microbiens (MacMicking *et al.*, 1997). Le NO produit existe en général sous forme d'équilibre entre ses divers états redox qui ont différentes activités biologiques. De nombreuses évidences ont démontré l'importance cruciale du NO et de iNOS dans la défense de l'hôte. Ainsi, la production de NO stimulée par l'interféron- γ est associée avec une capacité accrue des macrophages pour la destruction des pathogènes phagocytés, ce qui est démontré par l'ajout de N-méthyl-L-arginine, un inhibiteur de iNOS, qui empêche les macrophages de tuer les pathogènes internalisés (Karupiah *et al.*, 1993 ; Green *et al.*, 1991 ; Green *et al.*, 1990 ; Denis, 1991). Les souris déficientes pour le gène iNOS démontrent une plus grande susceptibilité aux infections parasitaires et une réponse inflammatoire diminuée (Wei *et al.*, 1995). Il semblerait également que le NO ait un effet inhibiteur sur la réplication de certains virus (Karupiah *et al.*, 1993 ; Karupiah *et al.*, 1998 ; Guidotti *et al.*, 2000). L'interféron- γ stimule la production de NO à trois endroits différents de la cascade, soit via l'induction de l'argininosuccinate synthétase dont la fonction est de produire la L-arginine, soit via la GTP-cyclohydroxylase I dont la fonction est de fournir le cofacteur requis pour la production de NO, puis finalement via l'induction de l'enzyme iNOS (Di Silvio *et al.*, 1993 ; Baek *et al.*, 1993 ; Kwon *et al.*, 1989 ; Drapier *et al.*, 1988 ; Morris et Billiar, 1994). Une induction maximale de iNOS requiert une stimulation des cellules par l'interféron- γ et une stimulation subséquente par le LPS ou le TNF- α (Kamijo *et al.*, 1993 ; Kamijo *et al.*, 1994).

6.5.7 Effets sur le trafic des lymphocytes

En plus des effets microbicides via la production d'espèces oxygénées et de NO, l'interféron- γ joue également un rôle dans la coordination de la transition entre l'immunité innée et la réaction immunitaire adaptée. L'interféron- γ favorise le développement d'une réponse lymphocytaire de type T_H1 et met en oeuvre le changement de classe d'isotypes

sécrétés d'immunoglobulines chez les lymphocytes B (Huang *et al.*, 1993 ; Collins et Dunnick, 1993 ; Snapper et Paul, 1987). Cette cytokine joue aussi un rôle dans la régulation des interactions locales entre les lymphocytes et l'endothélium. Lorsque l'interféron- γ est produit localement au site d'inflammation avec le NO, il s'ensuit une dilatation des vaisseaux sanguins afin de causer un ralentissement de la circulation sanguine et une accumulation de sang au niveau des vaisseaux endommagés (Boehm *et al.*, 1997 ; Schroder *et al.*, 2004). L'induction par l'interféron- γ de plusieurs molécules d'adhésion telles ICAM-1 et VCAM-1 chez les lymphocytes et les parois endothéliales en parallèle avec l'induction de chemokines telles IP-10, MCP-1, MIP-1 α/β et RANTES favorise l'attraction des lymphocytes au site d'inflammation, l'interaction avec les paroi endothéliales et la diapédèse afin de permettre aux lymphocytes de pénétrer les tissus environnants (Boehm *et al.*, 1997). Le TNF- α et l'IL-1 β agissent en synergie avec l'interféron- γ dans la régulation de ces molécules (Boehm *et al.*, 1997).

6.5.8 Effets sur la réponse au LPS par les macrophages

Il est bien connu qu'une des conséquences de l'activation des macrophages par l'interféron- γ est d'augmenter la réponse au LPS ainsi que d'autres ligands des TLRs (« Toll-like receptors ») tels les motifs CpG non-méthylés provenant de l'ADN bactérien (Kamijo *et al.*, 1993 ; Lorsbach *et al.*, 1993 ; Jurkovich *et al.*, 1991 ; Sweet *et al.*, 1998). Le LPS, qui est un constituant de la paroi cellulaire des bactéries gram négatives, est reconnu par le récepteur TLR4 présent à la surface des macrophages et également dans le phagosome (Schroder *et al.*, 2004). L'interaction LPS:TLR4 provoque une cascade de signalisation impliquant la protéine adaptatrice MyD88 qui mène à l'activation de NF- κ B et de AP-1 et par le fait même à la transcription de plusieurs gènes de réponses impliqués dans la fonction immunitaire des macrophages (Sweet et Hume, 1996 ; Akira, 2000 ; Aderem et Ulevitch, 2000, Dobrovolskaia et Vogel, 2002 ; Kawai *et al.*, 1999). Pour certains de ces

gènes, tel le gène codant pour iNOS, un prétraitement avec l'interféron- γ est nécessaire afin que ces gènes soient induits à leur maximum (Kamijo *et al.*, 1993 ; Lorsbach *et al.*, 1993 ; Jurkovich *et al.*, 1991 ; Sweet *et al.*, 1998). Dans d'autres cas, l'interféron- γ peut changer la sensibilité de la réponse au LPS afin qu'une plus faible concentration de LPS provoque également une activation des gènes de réponse (Costelloe, 1997). L'interféron- γ induirait l'expression des protéines associées au récepteur TLR4 et à sa signalisation, telles MD-2, CD14, MyD88, ainsi que le récepteur TLR4 lui-même (Bosisio *et al.*, 2002 ; Mita *et al.*, 2001 ; Darmani *et al.*, 1994 ; Adib-Conquy et Cavaillon, 2002). L'interféron- γ empêcherait également l'inhibition de l'expression de TLR4 causée par le LPS afin de soutenir la réponse à cette molécule (Bosisio *et al.*, 2002). Plusieurs des gènes inductibles par l'interféron- γ sont également inductibles par le TNF- α , ce qui fait en sorte que ces deux facteurs combinés provoquent souvent une super-induction de ces gènes de réponse (Drapier *et al.*, 1988 ; Cassatella *et al.*, 1989 ; Huang *et al.*, 2002 ; Jahnke et Johnson, 1994). L'expression du TNF- α étant stimulée chez les macrophages par le LPS, cette cytokine agit de façon autocrine dans la génération de plusieurs effets liés au LPS chez le macrophage (Cheshire et Baldwin, 1997).

7. Objectifs et hypothèses de recherche

L'objectif principal de ce travail de recherche consistait à poursuivre l'analyse protéomique du phagosome débutée dans le laboratoire il y a quelques années (Garin *et al.*, 2001), et de découvrir de nouvelles fonctions associées au phagosome. Le deuxième objectif consistait à utiliser la base de données des protéines identifiées du phagosome afin de déterminer les effets de l'interféron- γ sur la modulation du protéome du phagosome.

Il a été démontré que le phagosome était enrichi de protéines provenant du RE, spécialement à des temps précoces de maturation (Garin *et al.*, 2001), et que le RE

participait à la formation des phagosomes naissants en étant recruté à la membrane plasmique lors de la phagocytose (Gagnon *et al.*, 2002). Nous avons donc décidé d'investiguer les fonctions possibles, autres que la phagocytose, des protéines du RE dans le phagosome. Parmi les protéines du RE recensées au niveau du phagosome, on retrouvait des molécules du CMH de classe I. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces molécules pourraient jouer un rôle dans un phénomène connu, mais peu caractérisé moléculairement : la présentation croisée d'antigènes exogènes. Les travaux présentés dans l'article 1 du chapitre II (Houde *et al.*, 2003) démontrent la caractérisation moléculaire de la présentation croisée d'antigènes et proposent un nouveau modèle où le phagosome possède tous les éléments requis pour être auto-suffisant dans toutes les étapes de la présentation croisée.

L'interféron- γ est une cytokine ayant de multiples effets sur le macrophage et favorisant principalement le potentiel microbicide et la présentation d'antigènes. Puisqu'il est difficile d'étudier les effets de l'interféron- γ sur un organelle entier tel que le phagosome par une approche traditionnelle étudiant les protéines une à la fois, nous avons décidé d'utiliser une approche protéomique impliquant la base de données des protéines identifiées du phagosome afin d'investiguer les effets de l'interféron- γ sur la modulation des propriétés fonctionnelles du phagosome. Nous avons émis l'hypothèse que l'interféron- γ modifiait la composition protéique du phagosome soit via une surexpression de certaines protéines et/ou une accélération de sa vitesse de maturation. Puisque plusieurs protéines impliquées dans la présentation croisée tels que les sous-unités inductibles de l'immunoprotéasome, le transporteur TAP et le CMH de classe I étaient connues comme étant modulées positivement par l'interféron- γ , nous avons également émis l'hypothèse que ces protéines étaient présentes en plus grande quantité au niveau du phagosome. Les travaux présentés dans l'article 2 du chapitre II (Houde *et al.*, en préparation) démontrent la caractérisation des effets de l'interféron- γ sur la modulation des propriétés fonctionnelles du phagosome tels que la microbicité, la dégradation protéique, l'acidification du compartiment, les interactions avec les endosomes et la présentation croisée.

Chapitre II : Résultats, Article 1

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.

Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation

Mathieu Houde^{1*}, Sylvie Bertholet^{2*}, Etienne Gagnon¹, Sylvain Brunet¹, Guillaume Goyette¹, Annie Laplante¹, Michael F. Princiotta³, Pierre Thibault⁴, David Sacks² and Michel Desjardins^{1,4}

¹*Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, C.P.6128, Succ centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7*

²*Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA*

³*Laboratory of Viral Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA*

⁴*Caprion Pharmaceuticals Inc., Montréal, Québec, Canada*

*these authors contributed equally to this work

The ability to process microbial antigens and present them at the surface of cells is an important aspect of our innate ability to clear infections. It is generally accepted that antigens in the cytoplasm are loaded in the endoplasmic reticulum and presented at the cell surface on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, whereas peptides present in endo/phagocytic compartments are presented on MHC class II molecules (Watts & Amigorena, 2001 ; Heath & Carbone, 2001). Despite the apparent segregation of the class I and class II pathways, antigens from intracellular pathogens including mycobacteria, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella abortus* and *Leishmania*, have been shown to elicit an MHC class-I-dependent CD8⁺ T-cell response (Pfeifer *et al.*, 1993 ; Oliveira & Splitter, 1995 ; Turner & Dockrell, 1996 ; Canaday *et al.*, 1999 ; Belkaid *et al.*, 2002), a process referred to as cross-presentation (Heath & Carbone, 2001). The cellular mechanisms allowing the cross-presentation pathway are poorly understood. Here we show that phagosomes display

the elements and properties needed to be self-sufficient for the cross-presentation of exogenous antigens, a newly ascribed function linked to phagocytosis mediated by the endoplasmic reticulum.

Until recently, little was known about the molecular mechanisms and cellular structures enabling the cross presentation pathway. A requirement for peptide regurgitation from the phagosome lumen, allowing their direct binding to MHC class I molecules at the surface of presenting cells, was ruled out and a phagosome to cytosol pathway for the retrotranslocation of exogenous peptides was shown to exist (Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1995). Although peptide transport activity allowing for the retrotranslocation of exogenous molecules from the phagosome lumen to the cytoplasm has been observed in dendritic cells (Rodriguez *et al.*, 1999), the phagosomal proteins involved in this process have not been identified. After peptide transfer to the cytosol, the proposed steps for cross presentation involves: (1) ubiquitination and proteasomal degradation in the cytoplasm to generate the correct peptides for MHC class I loading, (2) peptide transport in the endoplasmic reticulum (ER) lumen through the TAP complex to form MHC class-I-peptide complexes, and (3) transport to the cell surface through the secretory pathway. The finding that phagocytosis in macrophages proceeds by ER recruitment at the cell surface, a process referred to as ER-mediated phagocytosis (Gagnon *et al.*, 2002), suggested that antigens from intracellular pathogens could have a direct access, within phagosomes, to the ER machinery needed for MHC class I presentation.

Indications that phagosomes could be competent organelles for antigen cross-presentation came from proteomics analyses showing that proteins required for each step of the cross-presentation pathway, described above, are present on latex-bead-containing phagosomes (Supplementary Table 1). The cross-presentation of exogenous peptides requires a retrotranslocation step from the phagosome lumen to the cytoplasm to be processed by the proteasome. Confocal analysis showed that after internalization of latex

beads opsonized with fluorescent ovalbumin, a fluorescent signal is observed in the cytoplasm near phagosomes (Fig 1). Although the retrotranslocation machinery allowing this transfer is not known, a protein that might play this role on phagosomes is Sec61.

Indeed, Sec61 has been shown to mediate the retrotranslocation of proteins from the ER lumen to the cytoplasm (Wiertz *et al.*, 1996 ; Tirosh *et al.*, 2002), including the A1 subunit of cholera toxin (CTA1) (Schmitz *et al.*, 2000). When fluorescent CTA1 was examined in place of ovalbumin, a strong signal was also observed in the cytoplasm (Fig. 1), further suggesting that Sec61 might be involved in phagosomal retrotranslocation. In contrast to ovalbumin, which starts to be visible in the cytoplasm 60 min after phagocytosis of latex-OVA beads, the CTA1 signal is visible within 30 min. This difference might be explained by the fact that intraphagosomal processing of ovalbumin is required before its retrotranslocation (Rodriguez *et al.*, 1999). Interestingly, although the signal for CTA1 was also observed in the cytoplasm of cells not treated with MG-132, fluorescent ovalbumin was not observed in these conditions (results not shown). Since CTA1 is believed to be resistant to proteasomal degradation (Hazes & Read, 1997), these results suggest that ovalbumin could be rapidly degraded by proteasomes close to or associated with phagosomes.

Further experiments performed to investigate the distribution of proteasomes in J774 murine macrophages showed that although proteasomes are present in the total cell lysate, indicative of a cytoplasmic localization, they are also observed in the total membrane preparation, largely made of ER in these cells, and on phagosomes where multiple proteasome α -subunits were detected (Fig 2a). These results, in accordance with previous studies showing the presence of proteasomes in the cytoplasm, the nucleus and the ER (Rivett *et al.*, 1992 ; Brooks *et al.*, 2000), extend the cellular localization of this structure to phagosomes. Thus, the proteasomes present on phagosomes could come from the ER during ER-mediated phagocytosis. Analysis of the kinetics of association of

proteasomes to phagosomes indicated that while Sec61 is recruited at the earliest time point, proteasome α -subunits associate transiently to phagosomes and reach a peak at around 60 min after their formation (Fig. 2b). This indicates that proteasomes do not come directly from the ER during phagosome formation, but rather assemble on phagosomes to play a function at a precise point during phagolysosome biogenesis.

Immunofluorescence analysis supported the western blot data by showing a diffuse labeling for proteasome α - and β -subunits in the cytoplasm and around phagosomes (Fig. 2c). Immunofluorescence on isolated phagosomes (Gagnon *et al.*, 2002) indicated that about 70% of phagosomes displayed a discontinuous labeling for the proteasome α - and β -subunits (Fig. 2c, inset). Although this pattern of labeling is similar to the one previously observed for flotillin-1, a marker of lipid rafts on phagosomes (Dermine *et al.*, 2001), proteasomes are not present in phagosome rafts (Fig. 2d). The proteasomes present on phagosomes are part of high-molecular-weight complexes, as shown by western blotting of purified phagosome preparations separated by non-denaturing blue native electrophoresis (Schagger *et al.*, 1994) (Fig. 2e), in which the α 4, α 6, β 1, and β 5 subunits have been identified by mass spectrometry analyses. Finally, we were also able to show that proteasomes associate to the cytoplasmic side of phagosomes, based on their sensitivity to pronase (Fig. 2f).

Polyubiquitinated proteins are also present on the cytoplasmic side of phagosomes (pronase-sensitive) where they co-localize with proteasomes (Fig. 3a). A link between the ubiquitination process and proteasomal degradation on phagosomes was further highlighted when J774 macrophages were treated with the proteasome inhibitor MG-132. Indeed, the amount of polyubiquitinated proteins present on phagosomes increased with time when proteasome activity was inhibited (Fig. 3b), while it was lower and remained constant in untreated cells. These results are consistent with a continuous arrival and degradation of polyubiquitinated proteins on phagosomes. The nature of the polyubiquitinated proteins

present on phagosomes was investigated using a proteomics approach, which allowed for the identification of 23 proteins, including ovalbumin (QTAMVLVNAIV and NVMEERK) present in at least 5 bands (Supplementary Information, table 2).

The improved ability of cells to process and present antigens on MHC class I molecules upon interferon- γ (IFN- γ) treatment is related with the upregulation of subsets of proteasomes, referred to as immunoproteasomes, differing from their 'steady state' counterparts by the substitution of three β -subunits for the homologous subunits LMP2, LMP7 and MECL1. Treatment of J774 macrophages with IFN- γ resulted in the upregulation of the immunoproteasome subunit LMP2, as shown by immunofluorescence (Fig. 4a). Furthermore, western blot analysis indicated that immunoproteasomes associate with phagosomes upon IFN- γ treatment, a result confirmed by direct immunofluorescence on isolated organelles (Fig. 4a, inset). The peptides generated by proteasomal degradation could potentially gain access to the phagosome lumen since the TAP complex is present on this organelle, as shown by western blotting (Fig. 4b). Critical points that remained to be established were the presence of ovalbumin peptide/MHC class I complexes in the phagosome lumen, and how they are delivered to the cell surface for presentation to CD8⁺ T cells.

We showed that after phagocytosis of latex-OVA beads in BMA3.1A cells, the SIINFEKL ovalbumin peptide/MHC class I complex, recognized by the monoclonal antibody 25D1.16 (Porgador *et al.*, 1997), is present in the phagosome lumen (Fig. 4c), reaching a maximum level around 60-120 min after phagocytosis (not shown). Approximately 11% of the phagosomes contained detectable complexes in these conditions, a eightfold increase compared with phagosomes formed by the internalization of non-opsonized latex beads. The low signal here is due to the permeabilization procedure needed to detect molecules in the phagosome lumen. In these conditions, the value obtained

for LAMP1 (around 20% in contrast to about 80-90% in non-permeabilized phagosome preparations) is the maximal expected value with that assay.

Bone-marrow-derived macrophages from B/6 mice that had internalized latex-OVA beads stimulated the proliferation of OT-1 CD8⁺ T cells and their secretion of IFN- γ (Fig. 4d, e), as shown previously (Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1995). Identical results were obtained with the C57BL/6-derived macrophage cell lines BMA3.1A and BMC2 (not shown). CD8⁺ T-cell proliferation and IFN- γ secretion were abolished when bone marrow-derived macrophages from TAP1^{-/-} mice were used, indicating the involvement of a transport event through TAP (Fig. 4d, e). Evidence that these events are triggered by MHC-peptide complexes originating from the phagosome lumen was obtained using a system measuring the percentage of OT-1 CD8⁺ T cells producing IFN- γ after a co-culture with macrophages infected with recombinant vaccinia viruses expressing NP-SIINFEKL-GFP (Princiotta *et al.*, 2003) or macrophages that had internalized latex-OVA beads (Fig. 4f).

The conventional presentation of the abundant SIINFEKL peptide/MHC class I complexes generated from endogenously derived ovalbumin peptides, synthesized in the cell cytoplasm following vaccinia infection and reaching the surface through the secretory pathway, was almost completely inhibited by brefeldin A (Fig. 4f). In contrast, the presentation of complexes generated after phagocytosis of latex-OVA beads was only partially (35%) inhibited by this drug (Fig. 4f). The IFN- γ response was significantly greater than the background response elicited by macrophages following uptake of latex-BSA beads. The cell surface delivery of MHC-peptide complexes from endo/phagocytic organelles was also shown to occur via a brefeldin-A-insensitive route (Pfeifer *et al.*, 1993; MacAry *et al.*, 2001), so the significant level of cross-presentation of ovalbumin observed in the brefeldin-A-treated cells further supports the phagosome origin of the peptide/MHC class I complexes involved in CD8⁺ T-cell activation.

Our results demonstrate that phagosomes are able to process exogenous peptides for MHC class I cross-presentation, extending the competence of phagosomes previously shown to be functional for the processing of MHC class II complexes (Ramachandra *et al.*, 1999). Our working model (Fig. 4g) proposes that hydrolases (H) acquired sequentially during phagosome maturation initiate the processing of exogenous peptides in the phagosome lumen (Garin *et al.*, 2001 ; Muno *et al.*, 2000 ; Lennon-Dumenil *et al.*, 2002). Some of these peptides are then retrotranslocated to the cytoplasmic side of phagosomes by the Sec61/chaperones retrotranslocation machinery normally used for quality control (Wiertz *et al.*, 1996 ; Tsai *et al.*, 2002). The translocated proteins then have access to the ubiquitin/proteasome complex assembled on the cytoplasmic side of phagosomes, leading to the generation of MHC class I binding peptides. Although some of these peptides are likely to be transported in the ER lumen, some reach the lumen of phagosomes through the TAP complex present on phagosomes. The membrane recycling machinery of endo/phagocytic organelles (Mahnke *et al.*, 2000) could then be used for the delivery of MHC class-I-peptide complexes to the surface.

The constant sampling of self and foreign molecules by the immune system is part of a complex quality control process ensuring the recognition and clearance of aberrant cell forms during development, tumorigenesis and infection by microbial pathogens. Our results, and those presented in an accompanying paper (Guermónprez *et al.*, 2003), establish that the use of ER, an organelle specialized in quality control, to form part of the phagosome membrane serves not only to minimize the utilization of the plasma membrane, but also confers properties allowing phagosomes to be fully integrated within the immune recognition system and play a direct role in cross-presentation. Our results, together with findings showing that ovalbumin linked to beads internalized by phagocytosis is presented with MHC class I molecules up to 1×10^4 -fold more efficiently than soluble ovalbumin (Kovacsovic-Bankowski *et al.*, 1993), suggest that favouring the entry of exogenous

peptides by phagocytosis could improve immunization procedures for vaccination protocols and the development of more efficient immunotherapies against cancer.

Methods

Antibodies

Mouse anti-proteasome α -subunits monoclonal antibodies (mAb), rabbit anti-proteasome α/β -subunits polyclonal antibodies (pAb), rabbit anti-LMP-2 pAb and mouse anti-ubiquitin clone FK1 mAb were from Affiniti. Rabbit anti-rab5a pAb and goat anti-TAP1 mAb were from Santa Cruz. Rat anti-LAMP1 luminal ID4B mAb was from Developmental Studies Hybridoma Bank. Mouse anti-CD8 (CyChrome-conjugated), mouse anti-IFN- γ (PE-conjugated), and hamster anti-TCR (PE-conjugated) were from BD PharMingen. Rabbit anti-LAMP1 cytoplasmic pAb was a kind gift from S. Méresse. Rabbit anti-flotillin pAb was from R. Parton. Rabbit anti-Sec61p pAb was a gift from C. Nicchitta. Rabbit anti-calreticulin pAb was a gift from L. Rockeach. Mouse anti-OVA-MHCI complex 25D1.16 mAb was a gift from R. Germain and J. Yewdell.

Phagosome formation and isolation

All cell types were cultured as described (Belkaid *et al.*, 2002 ; Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1995 ; Gagnon *et al.*, 2002). Phagosomes were formed by the internalization of 0.8- μ m latex beads and isolated as described (Gagnon *et al.*, 2002). Phagosome lipid rafts were isolated after Triton X-100 solubilization and separation on an Optiprep gradient, as described (Dermine *et al.*, 2001).

Retrotranslocation assay

To determine if exogenous proteins present within the phagosome lumen can be retrotranslocated, phagosomes were formed in J774 macrophages by a 30 min internalization of latex beads opsonized with ovalbumin or the α subunit of cholera toxin

labeled with Alexa Fluor 488 according to standard Molecular Probes protocol. After an additional 60 min of incubation in presence of 5 μ M MG-132, an inhibitor of proteasome activity, cells were fixed and prepared for confocal microscopy.

Immunofluorescence and direct immunofluorescence on isolated phagosomes

Immunofluorescence on cells was performed using standard procedures described previously (Gagnon *et al.*, 2002). For the immunoproteasome, J774 cells were treated with IFN- γ 36h before phagosome formation. For all direct immunofluorescence analyses, isolated phagosomes containing 3.0- μ m latex beads were fixed in paraformaldehyde 4% for 10 min then washed three times with PBS/BSA 3% by quick spins. For the detection of the SIINFEKL/class I complex in the phagosome lumen, permeabilisation was required. In this case, after fixation, phagosomes were treated with 1% Triton X-100 at room temperature for 10 min and then washed 3 times with PBS/BSA 3%. Phagosomes were then blocked for 30 min with PBS/BSA 3% and the primary antibody added for 45 min. Phagosomes were washed three times and fluorescent secondary antibody was added for 30 min. After three washes, phagosomes were prepared for the confocal microscope.

Blue native electrophoresis

To determine if the proteasome subunits detected by fluorescence on phagosomes are present as a complex, we isolated phagosomes and performed blue native gel electrophoresis following a protocol described previously (Schagger *et al.*, 1994).

T-cell proliferation

CD8⁺ T cells from OT-I CD8⁺ transgenic mice were negatively selected by magnetic separation (MACS system and CD8⁺ T-cell purification kit, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's indications. Purified CD8⁺ T cells were further labeled with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes). The cells were resuspended at 5 X 10⁷ cells ml⁻¹ in PBS with 0.5 μ M

CFSE for 10 min at 37°C, and the reaction was stopped with 10% normal mouse serum. Cells were washed with cold PBS 0.1% BSA and plated at 10^6 per well in 24-well plate in DMEM 10% FCS. Antigen-pulsed macrophages were added for 72 h, at which time the cells were fixed in 4% paraformaldehyde. T-cell proliferation was measured by flow cytometry as expressed by the intensity of CFSE labeling. The lymphocytes were identified by characteristic size and granularity, in combination with anti-TCR β chain and anti-CD8 surface staining. For each sample, a minimum of 20,000 events was collected and analyzed using CellQuest software and a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Brefeldin A treatment, and interferon secretion assays

To assess the transport of MHC-peptide complexes to the cell surface, BMA3.1A macrophages were incubated with latex-OVA or vaccinia-OVA²¹ with or without brefeldin A ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) for 6-10 h at which time CD8⁺ T cells were added for an additional 4 h with BFA. For detection of intracellular IFN- γ , CD8⁺ T cells were further fixed, permeabilized and stained following standard procedures (Belkaid *et al.*, 2002). IFN- γ production in 72 h cell culture supernatants was quantified by ELISA using Endogen's antibody matched pairs and following manufacturer's protocol.

Proteomics analysis

Phagosome proteins were separated by SDS-PAGE on 5 cm minigels. Gel slices (24 in total) were excised, trypsin digested, and the resulting tryptic peptides extracted with 0.2 M urea in 50% aqueous acetonitrile. Each digested band was analyzed by nanoLC-MS/MS using a Waters CapLC coupled to Q-TOF Ultima. A total of 460 proteins were identified, including several proteins involved in each step of cross-presentation (Supplementary Table 1). The nature of the polyubiquitinated proteins present on phagosomes was also investigated using proteomics. In this case, after phagosome isolation, the polyubiquitinated proteins present on this organelle were purified by affinity for the S5A subunit of the

proteasome attached to Sepharose beads (Affiniti) (Supplementary Table 2). These proteins were then separated and analyzed as above.

References

Belkaid, Y., *et al.* CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 168, 3992-4000 (2002).

Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B. & Rivett, A.J. Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 352, Pt 3:611-615. (2000).

Canaday, D.H., *et al.* Activation of human CD8⁺ alpha beta TCR⁺ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J. Immunol.* 162, 372-379 (1999).

Dermine, J.F., *et al.* Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 18507-18512 (2001).

Gagnon, E., *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131 (2002).

Garin, J., *et al.* The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* 152, 165-180 (2001).

Guermonprez, P. *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402 (2003).

Hazes, B. & Read, R.J. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* 36, 11051-11054 (1997).

Heath, W.R. & Carbone, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 126-134 (2001).

Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246 (1995).

Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B. & Rock, K.L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 4942-4946 (1993).

Lennon-Dumenil, A.M., *et al.* Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J. Exp. Med.* 196, 529-540 (2002).

MacAry, P.A., *et al.* Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 3982-3987 (2001).

Mahnke, K., *et al.* The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell. Biol.* 151, 673-684 (2000).

Muno, D., Kominami, E. & Mizuochi, T. Generation of both MHC class I- and class II-restricted antigenic peptides from exogenously added ovalbumin in murine phagosomes. *FEBS Lett.* 478, 178-182 (2000).

Oliveira, S.C. & Splitter, G.A. CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45^{RBlo} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 25, 2551-2557 (1995).

Pfeifer, J.D., *et al.* Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359-62 (1993).

Porgador, A., Yewdell, J.W., Deng, Y., Bennink, J.R. & Germain, R.N. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6, 715-726 (1997).

Princiotta, M.F., *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354 (2003).

Ramachandra, L., Song, R. & Harding, C.V. Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide:class II MHC complexes. *J. Immunol.* 162, 3263-3272 (1999).

Rivett, A.J., Palmer, A. & Knecht, E. Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1165-1172 (1992).

Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 362-368 (1999).

Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 362-368 (1999).

Schagger, H., Cramer, W.A. & von Jagow, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220-230 (1994).

Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. & Herzog, V. Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell Biol.* 148, 1203-1212 (2000).

Tirosh, B., Furman, M.H., Tortorella, D. & Ploegh, H.L. Protein unfolding is not a prerequisite for ER-to-cytosol dislocation. *J. Biol. Chem.* 278, 6664-6672 (2002).

Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T.A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 246-255 (2002).

Turner, J. & Dockrell, H.M. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8⁺ T cells in vitro. *Immunology* 87, 339-342 (1996).

Watts, C. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation. *Semin. Immunol.* 13, 373-9 (2001).

Figure legends

Figure 1 Exogenous proteins internalized by phagocytosis are retrotranslocated to the cytoplasmic side of phagosomes. For latex-OVA, after the initial 30 min of fluorescent ovalbumin-latex bead internalization, the fluorescent signal was contained within phagosomes (30 min-0 min). A fluorescent signal was observed in the cytoplasm near phagosomes after 60 min of chase (30 min-60 min). Latex-CTA1, the α -subunit of cholera toxin, is also translocated from the phagosome lumen, albeit more rapidly than ovalbumin.

Figure 2 Proteasomes are present on phagosomes. **a**, Proteasome α -subunits are detected in the total cell lysate (TCL), the total membrane fraction (TM), and phagosomes (Phago). **b**, Proteasomes associate with phagosomes transiently, contrasting with the late association of LAMP1, and the early recruitment of Sec61. **c**, Immunofluorescence on cells and isolated organelles (inset) shows the association of proteasomes to phagosomes (arrowheads). **d**, Proteasomes are present in the TX-100 soluble fraction (non-raft) of phagosomes. Rab5a is a known non-raft protein. **e**, Blue native electrophoresis (BNE) indicates that proteasome α -subunits detected on phagosomes are present in a high-molecular-weight complex (440 kDa). Western blotting after SDS-PAGE confirmed the presence of α -subunits in that complex, while proteomics analysis allowed for the identification of several proteasome subunits. **f**, Proteasomes are present on the cytoplasmic side of phagosomes as shown by their sensitivity to pronase, like rab5 and the cytoplasmic tail of LAMP1. Pronase does not affect the luminal part of LAMP1 and calreticulin, present in the phagosome lumen.

Figure 3 Ubiquitinated proteins associate with proteasomes on the cytoplasmic side of phagosomes. **a**, Ubiquitinated proteins colocalize with proteasomes on phagosomes (left panels show one phagosome). The pronase assay (right panels) indicates that polyubiquitinated proteins are present on the cytoplasmic side of phagosomes. **b**, The level

of ubiquitinated proteins present on phagosomes isolated at different time points after formation remained constant (the 1-h time point is shown). In contrast, inhibition of proteasome activity with MG-132 led to the accumulation of polyubiquitinated proteins on phagosomes. Ctrl, control.

Figure 4 Exogenous proteins loaded in phagosomes can be presented by MHC class I complexes at the surface of macrophages and trigger a TAP-dependent CD8⁺ T-cell response. **a**, Treatment with IFN- γ increases the level of proteasome LMP-2 subunits in J774 macrophages and their association to phagosomes. **b**, TAP is present on phagosomes. **c**, The SIINFEKL/MHC I complex is present in the phagosome lumen. **d**, Internalization of latex-OVA in C57BL/6 macrophages triggers the proliferation of OT-I transgenic CD8⁺ T cells (red circle). Macrophages without bead ($m\emptyset$), or that had internalized latex-BSA did not induce the proliferation of T cells. As a positive control, incubation of macrophages with SIINFEKL peptide, allowing direct binding to MHC I at the cell surface, sustained the proliferation of T cells. The ability of macrophages to elicit a CD8 response is TAP-dependent as shown by the absence of CD8⁺ T-cell proliferation after latex-OVA internalization by macrophages from TAP^{-/-} mice. **e**, The same trend was observed for the secretion of IFN- γ by CD8⁺ T cells cultured with the various macrophages. **f**, A significant level of presentation of SIINFEKL/MHC I complexes following phagocytosis of latex-OVA is observed in cells treated with brefeldin A. In contrast, activation of T cells was almost completely abolished when macrophages infected with recombinant vaccinia viruses expressing NP-SIINFEKL- green fluorescent protein (GFP) were treated with BFA. BFA had no effect on the activation of T cells by the direct addition of the SIINFEKL peptide. **g**, Working model. See text.

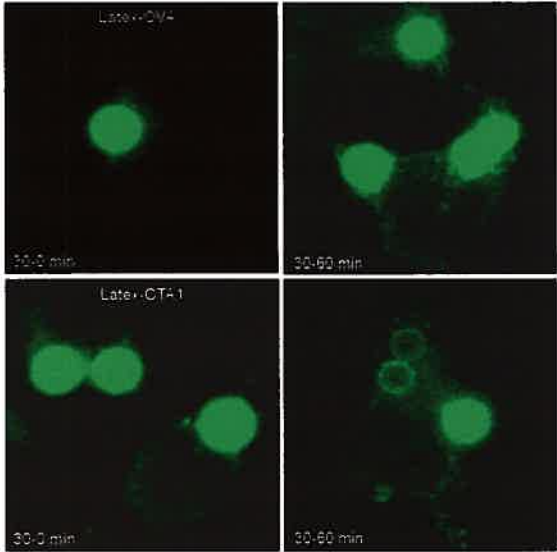


Figure 1. Exogenous proteins internalized by phagocytosis are retrotranslocated to the cytoplasmic side of phagosomes.

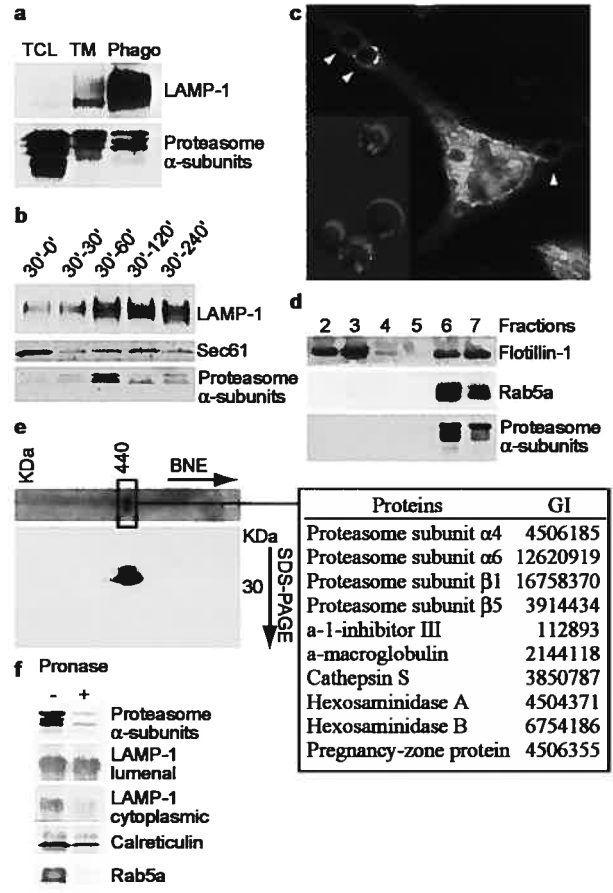


Figure 2. Proteasomes are present on phagosomes.

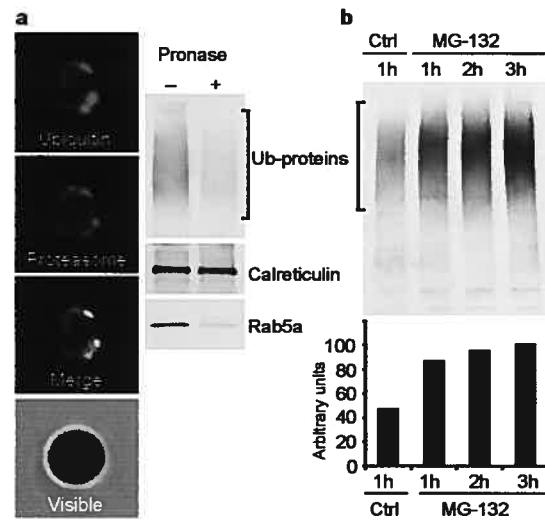


Figure 3. Ubiquitinated proteins associate with proteasomes on the cytoplasmic side of phagosomes.

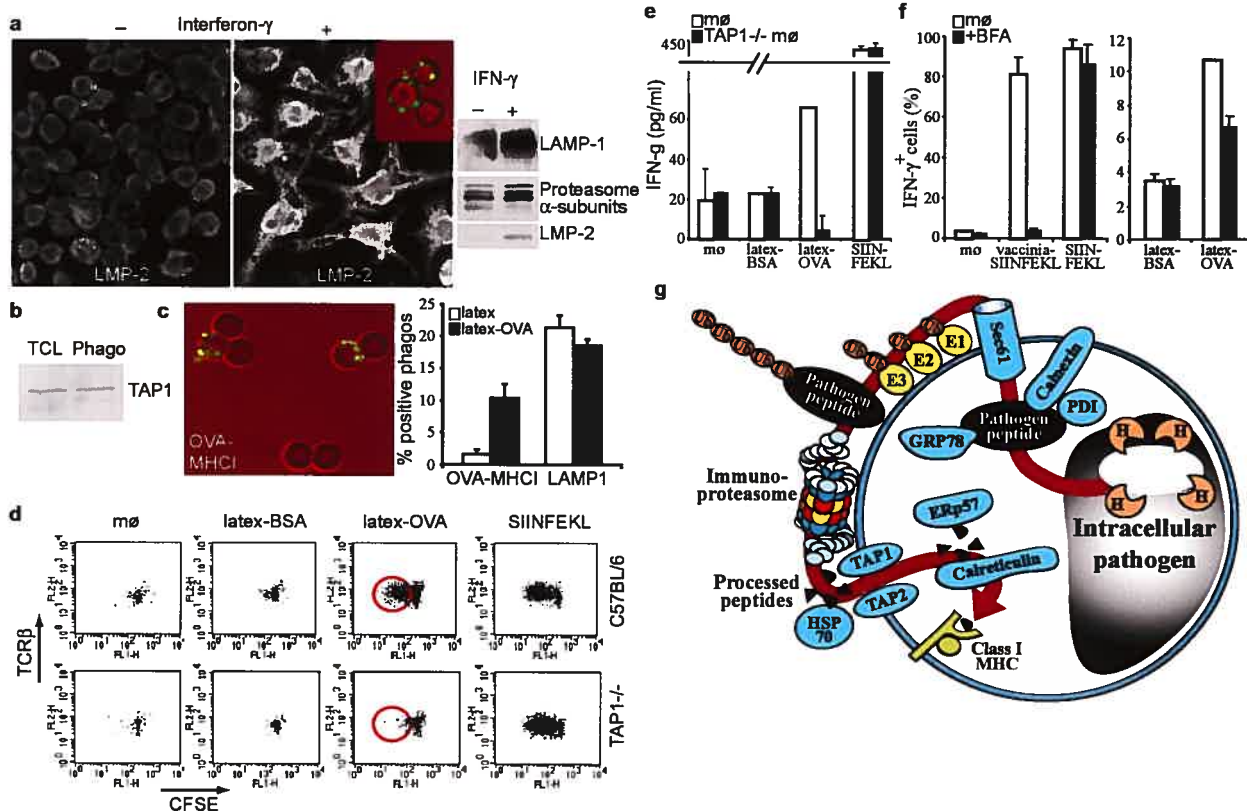


Figure 4. Exogenous proteins loaded in phagosomes can be presented by MHC class I complexes at the surface of macrophages and trigger a TAP-dependent CD8⁺ T-cell response.

Supplementary Information

Retrotranslocation				
Protein	GI#	Peptides	Remarks	Orientation
Calnexin	683793	APVPTGEVYFADSFDR, IADPDAVKPDDWDEDAPSK, KIPNPDFFEDLEPF	Retains incorrectly folded glycoprotein's in the E.R.	TM
Bip (GRP78, HSP70-5)	2506545	DAGTIAGLNVMR, DNHLLGTFDLTGIPPAPR, ELEEIVQPIISK, IEIESFFEGEDFSETLTR, IINEPTAAAIA YGLDK, ITITNDQNR, ITPSYVAFTPEGER, LTPEEIER, NQLTSNPENTVFDAK, SDIDEIVLVGGSTR, SQIFSTASDNQPTVTIK, TFAPEEISAMVLTK, TKPYIQVDIGGGQTK, VEIANDQGNR, VTHAVVTVPAYFNDAQR, VYEGERPLTK.	E.R. Chaperone	L
PDI (P55, ERP59)	129729	TGPAATTLSDTAAAESLVDSEVTVIGFFK, VDATEESDLAQYQVGR	Protein disulfide isomerase	L
Sec61p		None	Detected by WB	TM
Valosin containing protein (VCP, p97, TER- ATPase, CDC48)	20342005	EVDIGIPDATGR, LDQLIYIPLPDEK		ND
Ubiquitination				
Ubiquitin	136670	IQDKEGIPPDQQR, EGIPPDQQR, ESTLHLVLR, TLSDYNIQK, TITLEVEPSDTIENVK	Involved in the ATP- dependant selective degradation of cellular proteins, the maintenance of chromatin structure, the regulation of gene expression, the stress response and ribosome biogenesis.	C
Ubiquitin-activating	111228	None	Detected by WB	C

enzyme E1				
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (Ubiquitin-protein ligase N)	2501432	LLAEPVPGIK, TNEAQAIETAR	Catalyse the covalent attachment of ubiquitin to other proteins.	C
Ubiquitin-conjugating enzyme E2, 25 kDa (Ubiquitin-protein ligase; huntingtin interacting protein 2, HIP-2)	2507504	VDLVDENFTELR	Catalyses the covalent attachment of ubiquitin to other proteins. Mediates the selective degradation of short-lived and abnormal proteins. Ubiquitinates huntingtin.	C
Proteasomal degradation				
Proteasome subunit alpha type 4	4506185	LLDEVFFSEK	Alpha subunits were detected by WB. Part of a multicatalytic proteinase complex. Involved in ATP/ubiquitin-dependant non-lysosomal proteolytic pathway.	C
Proteasome subunit alpha type 6	9910829	YEAANWK, LYQVEYAFK, AINQGGLTSVAVR, LLDSTVTHLFK		
Proteasome subunit beta type 1	16758370	LSEGFSIHTR		
Proteasome subunit beta type 3	6755202	FGPYYTEPVIAGLDPK		
Proteasome subunit beta type 5	3914434	FLHGVIVAADSR		
LMP-2	392959	None	Detected by WB in INF-g treated cells.	

			LMP2 is one of the two proteasome subunits encoded by genes in the major histocompatibility complex class II region.	
Translocation				
TAP (p115)	1171952	DTVLENLR	Detected by WB	ND
Peptide Loading				
ERp57	16508150	DGEEAGAYDGPR, DLLTAYYDVDYEK, EATNPPIIQEEKPK, ELNDFISYLQR, FVMQEEFSR, GFPTIYFSPAN K		L
Calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP)	6680836	DKGLQTSQDAR EQFLDGDAWTNR IKDPDAAKPEDWDER KPEDWDEEMDGEWEPPIQNPEYK	E.R. chaperone, also found in T cell lytic granules.	L
H-2 Class I histocompatibility antigen	293736	RPEGDVTLR, WTAADMAAQITR	H2-Kd haplotype	ND

Table 1. Cross-presentation processing proteins identified from MS-MS analysis of phagosome.

Phagosomes formed by the internalization of latex beads for 60 min, followed by a 60 min chase were isolated. Phagosomes were lysed and proteins were separated by 2D or blue native electrophoresis. Gels obtained were cut, digested with trypsin and the resulting peptides analyzed by nanoLC-MS/MS using a QTOF Ultima™. Peptide, indicates the sequences identified for this protein. Orientation data were based on treatment of isolated phagosomes with pronase. L, lumen; TM, trans-membrane; C, cytoplasm; ND, not determined.

ACCESSION#	MW (KDA)	PTMD	COVERAGE (%)	DESCRIPTION
4929901	32.08	0	59.0	Chain A Glutathione S-Transferase
347019	70.93	0	16.1	Hsp72
11612489	72.46	0	8.4	Glucose regulated protein 78
839450	91.09	0	7.9	ubiquitin
20149594	83.28	0	7.3	Hsp90 β
13177700	35.98	0	6.1	Unknown protein for IMAGE:2989740
6680305	83.36	0	5.8	Hsp84
687239	93.92	0	5.2	Tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein
20072380	86.87	0	5.0	Similar to HLA-B-associated transcript 3
28528175	21.85	1	4.6	Similar to inhibin binding protein long isoform
16716545	36.18	7	3.5	Vomer nasal 1 receptor C1
8922669	96.47	0	3.4	Hypothetical protein FLJ10786
20846957	27.3	0	3.3	RIKEN cDNA 1110007C24
6755002	96.01	0	2.8	Programmed cell death 6 interacting protein
12840072	42.63	0	2.7	ISS-homolog to melanoma-associated antigen
26342997	46.31	0	2.2	Unnamed protein product

9506669	55.15	0	2.1	Hypothetical protein FLJ20261
479548	97.14	0	1.6	Glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1)
25052423	70.25	0	1.4	Similar to SPA-1 like protein p1294
23623807	73.45	0	1.4	Similar to zinc finger protein 118
19923595	98.67	0	1.3	Apoptosis related protein APR-5

Restricted database search with non specific cleavage

ACCESSION#	MW (KDA)	PTMD	COVERAGE (%)	DESCRIPTION	SEQUENCES
129293	42.75	0	3.7	Ovalbumin	pQTAMVLVNAIV pNVMEERK

Table 2. Protein identification from iterative LC-MS-MS analysis of phagosome-associated polypeptides isolated by affinity for the S5A subunit of the proteasome.

Phagosomes formed by the internalization of ovalbumin-opsonized latex beads for 60 min, followed by a 90 min chase in presence of MG-132 to inhibit proteasome activity, were isolated. The polyubiquitinated proteins present in this preparation were isolated by affinity for the S5A subunit of the proteasome. These proteins were then separated by SDS-PAGE on a 4-15% polyacrylamide gradient gel. The upper region of the unstained gel between 75 and 250 kDa, where polyubiquitinated proteins are observed in high amounts (see Fig. 3b), was then cut into 12 slices of about 1 mm. In gel digestion with trypsin was then performed and the resulting peptides analyzed by nanoLC-MS/MS using a QTOF Ultima™. Note that ovalbumin (QTAMVLVNAIV and NVMEERK) was identified in at least 5 slices of the gel. MW, molecular weight. PTMD, putative trans-membrane domain.

Coverage, indicates the % of the protein sequence covered by the peptides identified.

Chapitre II : Résultats, Article 2

Houde, M., Dermine, J.-F., Thibault, P., Desjardins, M. (2004) Modulation of phagosome functional properties by interferon- γ . *Article in preparation.*

Modulation of phagosome functional properties by interferon- γ

Mathieu Houde¹, Jean-François Dermine¹, Pierre Thibault^{2,3} and Michel Desjardins^{1,2,3*}

¹*Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4*

²*Caprion Pharmaceutical Inc., 7150 Alexander-Fleming, Montreal, Quebec, Canada, H4S 2C8*

³*Institut de recherche en immunovirologie et oncologie (IRIC), Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4*

*Address correspondence to M.D. [REDACTED]

Abstract

Interferon- γ is a key cytokine involved in the regulation of innate and adaptive immunity and induces the microbicidal and antigen presentation mechanisms of macrophages via a complex gene expression program. The phagosome is an organelle formed during the phagocytosis of a pathogen by macrophages that sequentially fuses with organelles of the endocytic pathway to acquire the cytotoxic elements essential for the killing and degradation of the internalized pathogen. Although it has been shown that elements of the phagosome are induced by stimulation of macrophages by interferon- γ , no global view of the effects of this cytokine on the whole proteome of this organelle exists. To better understand how interferon- γ modulates the phagosome functional properties, we have used a large-scale proteomics approach combined with traditional cellular biology techniques to characterize the phagosome proteome and identify proteins modulated by interferon- γ . A 2-D proteome map of the phagosome containing 395 identified protein spots was established

as a reference tool for this study. Interferon- γ positively modulated 35 proteins on phagosomes including proteases, chaperones, proton pump and signal transduction proteins. Increase of proteases levels or modification of their glycosylated state correlated with accelerated degradation of internalized pathogens and interferon- γ was shown to accelerate the fusion of early-phagosomes with endosomes and the acidification of phagosomes. The establishment of a 2-D proteome map of the phagosome has proven to be a quick and accurate reference tool for the characterization of the modulation of phagosome functional properties by interferon- γ .

Introduction

Phagocytosis is a process routinely used by professional phagocytes like macrophages, dendritic cells and neutrophils, to engulf large particles like cellular pathogens and apoptotic cells (Desjardins, 2003). Originally used by unicellular microorganisms like *Amoeba* as a source of nutriments, phagocytosis has evolved toward a key role in the innate immunity of mammals, giving a way for those pluricellular organisms to get rid of potentially dangerous unicellular pathogens. Thus, professional phagocytes play a central role in the first line of defence of the innate immune system and are also catalysts of the adaptive immune response against specific pathogens.

Phagocytosis occurs via the specific recognition of ligands on the extracellular body by the macrophage receptors located at the plasma membrane. A variety of receptors exists, such as the Fc receptor specific for IgGs, the complement receptor specific for C3b, the scavenger receptor specific low density lipoproteins and polysaccharides, the phosphatidylserine receptor for apoptotic bodies, and many others (Greenberg and Grinstein, 2002). Recognition of ligands by phagocytic receptors promotes signal transduction leading to the reorganization of cortical actin and pseudopodes extensions that encircle the large particle, which, upon membrane fusion, will become segregated in a new

organelle: the phagosome. It was recently shown for macrophages that the ER plays an important role in this process by fusing with the plasma membrane at the phagocytic cup and supplying the nascent phagosome with membranes, forming as such a hybrid phagosome containing membranes from the plasma membrane and the ER (Gagnon *et al.*, 2002). ER has also been implicated in phagocytosis by dendritic cells (Guermouprez *et al.*, 2003 ; Ackerman *et al.*, 2003) and unicellular microorganisms such as *Dictyostelium* (Mueller-Taubenberger *et al.*, 2001). This process named ER-mediated phagocytosis could explain how phagocytes can internalize a large number of particles without diminishing significantly their size and without impairing their cellular functions (Desjardins, 2003).

After their formation, phagosomes start a complex maturation process that will gradually transform them into organelles efficient for the killing and the degradation of pathogens. Analysis of the maturation of phagosomes show that they fuse sequentially with early endosomes, late endosomes and lysosomes allowing for the gradual acquisition of proteins from these compartments (Desjardins *et al.*, 1994a ; Desjardins *et al.*, 1994b ; Desjardins, 1995 ; Desjardins *et al.*, 1997). Rab5a has been shown to play a key role in fusion events with the early endosomes (Duclos *et al.*, 2000) by a mechanism named “kiss and run” (Desjardins, 1995) where the phagosomes and the early endosomes membranes interact transiently (Desjardins *et al.*, 1997 ; Duclos *et al.*, 2003). Protein constituents acquired by phagosomes during their maturation have been analyzed by a large-scale proteomics approach showing that phagosomes were composed of many hundreds of proteins (Garin *et al.*, 2001). This analysis has yielded a comprehensive view of the phagosome’s different sets of proteins that can be grouped according to their roles in diverse processes such as degradation, acidification, membrane fusion and signal transduction. However, many surprising findings also came from this proteomics study, namely the presence of ER proteins and lipid raft constituents. It was later shown that ER plays a major role in phagocytosis, explaining the presence of ER constituents in early phagosomes (Gagnon *et al.*, 2002) and that the phagosome membrane is heterogeneous

with the presence of microdomains playing a role in membrane fusion and targeted by pathogens such as *Leishmania* (Dermine *et al.*, 2001 ; Dermine *et al.*, *in preparation*). Further proteomics analyses of the macrophages phagosome have also shown that these organelles display all the constituents involved in MHC class I (MHC-I) antigen presentation and are self-sufficient for antigen cross-presentation (Houde *et al.*, 2003). This observation has also been reported in dendritic cells (Guermontprez *et al.*, 2003 ; Ackerman *et al.*, 2003).

Innate and adaptive immunities are processes tightly regulated by cytokines like interferon- γ (IFN- γ). IFN- γ is a type II interferon and the only member in this category. Other interferons like α , β , ω and τ are part of the type I family of interferons. The two types of interferons differ regarding their sequence homology and the receptor they ligate, type I interferons being ligands of IFNAR and type II interferon being a ligand of IFNGR (Schroder *et al.*, 2004). The two types of interferons also differ regarding the cell populations secreting them, with type II interferon being secreted by T CD4⁺ (T_H1) and T CD8⁺ lymphocytes, natural killer cells (NK), antigen presenting cells (APC), B cells and natural killer T cells (NKT) (Bach *et al.*, 1997 ; Young, 1996 ; Carnaud *et al.*, 1999 ; Frucht *et al.*, 2001 ; Gessani et Belardelli, 1998 ; Yoshimoto *et al.*, 1998 ; Flaishon *et al.*, 2000 ; Harris *et al.*, 2000). As to the type I interferons, they are secreted at various degrees by nearly all cell types (Schroder *et al.*, 2004). IFN- γ production is controlled by cytokines secreted by APCs like IL-12 and IL-18, which link infections with the production of IFN- γ in innate immunity (Golab *et al.*, 2000 ; Munder *et al.*, 2001 ; Munder *et al.*, 1998 ; Fukao *et al.*, 2000 ; Otani *et al.*, 1999 ; Akira, 2000 ; Dinarello, 1999).

IFN- γ signals its effect by binding to the IFNGR receptor and activating the Jak-Stat signal transduction pathway (Boehm *et al.*, 1997). Following this, the activated Stat homodimer can enter the nucleus and activate the transcription of genes possessing the GAS response element in their promoter (Darnell *et al.*, 1994 ; Schindler and Darnell, 1995

; Ramana *et al.*, 2000). This first wave of transcription includes proteins such as CIITA, LMP-2, TAP1, FcγR1, gp91^{phox} and IRF1 (Boehm *et al.*, 1997). Transcription factors like IRF1 induced in the first wave catalyse a second wave of transcription through the ISRE response element of other genes like iNOS and MHC-I (Boehm *et al.*, 1997 ; Paludan, 1998). The coactivator CIITA induced in the first wave is also important for the expression of MHC class II (MHC-II) (Boss, 1997 ; Chang *et al.*, 1996).

The complex gene activation promoted by IFN-γ is responsible for many of the cellular effects caused by this cytokine on the target cell. IFN-γ promotes antigen presentation through MHC-I by inducing expression of key elements of this pathway such as the MHC-I chain, the LMP-2, LMP-7 and MECL subunits of immunoproteasomes, the TAP transporter and other chaperones implicated in the process (Belich *et al.*, 1994 ; Kelly *et al.*, 1991 ; Groettrup *et al.*, 1996 ; Nandi *et al.*, 1996 ; Hisamatsu *et al.*, 1996 ; Strobl *et al.*, 2001 ; Groettrup *et al.*, 2001). IFN-γ also promotes antigen presentation via MHC-II by increasing the levels of the MHC-II molecules in cells expressing them and by inducing the expression of the invariant chain, HLA-DM, cathepsin B, H and L which are all implicated in the MHC-II pathway (Mach *et al.*, 1996 ; Kern *et al.*, 1995 ; Figueiredo *et al.*, 1989 ; Chang et Flavell, 1995 ; Cresswell, 1994 ; Wolf et Ploegh, 1995 ; Lah *et al.*, 1995 ; Lafuse *et al.*, 1995). IFN-γ plays an important role in the activation of microbicidal functions of macrophages by inducing the expression of NADPH oxidase and iNOS, which are responsible for the generation of reactive oxygen species (ROS) during oxidative burst and nitric oxide (NO) respectively (Schroder *et al.*, 2004). These molecules kill the engulfed microorganisms and their importance has been demonstrated in mice deficient in NADPH oxidase and iNOS, which are highly susceptible to pathogenic infections (Shiloh *et al.*, 1999). IFN-γ is also important in the priming of macrophages for the LPS response and the induction of an antiviral state (Schroder *et al.*, 2004).

The complexity of the response of cells like macrophages to a stimulation by IFN- γ makes it difficult to study the modulation of protein expression by this cytokine using traditional cell biology approaches. Studies based on the hybridization of labeled RNA populations to high-density oligonucleotide arrays have been performed in the past and have shown the complex modulation of genes regulated by IFN- γ (Der *et al.*, 1998). However no large-scale study has shown the effect of IFN- γ on the reorganization of a complex organelle like the phagosome. Here, we have used a proteomics approach combined with a standard cell biology approach to study the global effect of IFN- γ on the phagosome proteome and its functional properties.

Experimental procedures

Antibodies

Rabbit anti-rab5a and anti-rab7 polyclonal antibody (pAb) and goat anti-TAP1 monoclonal antibody (mAb) were from Santa Cruz. Rat anti-LAMP1 luminal ID4B mAb was from Developmental Studies Hybridoma Bank. Mouse anti H-2K^d MHC-I mAb was from BD Pharmingen. Rabbit anti-LMP-2 pAb was from Affiniti. Rabbit anti-calnexin and anti-calreticulin pAb were a gift from J.J.M. Bergeron. Chicken anti-v-ATPase pAb was a gift from S. Breton.

Cell culture

The murine macrophage-like cell line RAW 264.7 was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium high glucose (Life Technologies Inc.) supplemented with 10% complement-heat-inactivated FBS, 10 mM Hepes pH 7.3, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. 100 U/mL IFN- γ (Calbiochem) was added 24 hours prior to each experiment. *Leishmania donovani* promastigotes (Sudanese strain 1S) transfected with the luciferase expression vector pGEM72f/anealuc (St-Denis *et al.*, 1999) were grown at 26°C in the presence of 50 μ g/mL G418 in RPMI 1640 with

glutamine (Life Technologies Inc.) supplemented with 20% complement heat inactivated FBS (Hyclone, Logan, UT), 10 mM adenine, 0.0005% hemin, 1 µg/mL 6-biopterin, 0.0001% biotin, 20 mM MES, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at pH 5.5. Promastigotes were grown to stationary or late stationary phases prior to each experiment.

Phagosome formation and isolation

After cells were grown to approximately 80% confluence in 100 mm Petri dishes, phagosomes were formed and isolated as previously described (Desjardins *et al.*, 1994). Briefly, 0.8 µm blue latex beads were fed to macrophages at a 1:50 dilution in culture medium for 1 h (pulse). Macrophages were washed with PBS to remove non-internalized beads and culture medium was added to allow phagosomes to mature in macrophages according to the required amount of time (chase). Macrophages were then scraped on ice to stop maturation, washed with cold PBS and resuspended in cold homogenisation buffer (8.5% sucrose) containing proteases inhibitors. Cells were mechanically broken using a syringe and a 0.22 µm needle while keeping the nucleus intact. Nucleus and cell debris were centrifuged and the supernatant containing the latex beads-phagosomes was brought to 40% sucrose by adding an equal volume of 62% sucrose. The supernatant was loaded on top of a 1 mL cushion of 62% sucrose, followed by the addition of 2 mL of 35% sucrose, 2 mL of 25% sucrose and 2 mL of 10% sucrose solutions to form a discontinuous sucrose gradient. Ultracentrifugation of the sucrose gradients was performed in a swinging bucket rotor (SW41, Beckman Instruments) for 1 h at 100,000g. Latex beads-phagosomes were collected from the interface of the 10% and 25% sucrose solutions and washed one time in ice cold PBS containing proteases inhibitors. Phagosomes pellet was resuspended in ice-cold PBS and the density of latex beads was measured by light-scattering at 600 nm as previously described (Gotthardt *et al.*, 2002) using an Ultrospec 2100 pro spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, England). Control and IFN-γ-treated samples were adjusted so that they contain the same number and same concentration of

latex beads. Quantification of proteins was performed using RCDC (Bio Rad). Phagosomes were either lysed in Laemmli buffer or in 2-D lysis/rehydration buffer.

Oxidative burst analysis

Macrophages, pretreated or not with IFN- γ for 24 hours, internalized latex beads, then were labeled with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe to quantify ROS formation during oxidative burst as previously described (Keston and Brandt, 1965 ; Brandt and Keston, 1965 ; Bass *et al.*, 1983). Increase of fluorescence, indicating the presence of oxidizing agent, emitted by the DCFH-DA probe was measured by flow cytometry with a FACSCalibur (Becton Dickinson, Mississauga, Canada) with 20000 events gated and results analyzed with BD CellQuest Pro (BD Biosciences). For ROS visualization with cerium perhydroxide (CeCl_3) precipitate by electronic microscopy (Vazquez-Torres *et al.*, 2000), *Escherichia coli* bacteria were internalized for 1 h by macrophages pretreated or not with IFN- γ for 24 hours. Macrophages were washed with 0.1 M Tris maleate buffer, pH 7.5 at 37°C, preincubated with 0.1 M Tris maleate, 7% (w/v) sucrose, 1 mM aminotriazole buffer, pH 7.5, for 10 min at 37°C, and subsequently incubated with 0.1 M Tris maleate, 7% (w/v) sucrose, 1 mM aminotriazole, 1 mM CeCl_3 , 0.71 mM NADH, 0.71 mM NADPH buffer, pH 7.5, for 20 min at 37°C, followed by a wash with 0.1 M Tris maleate, 7% sucrose. Cells were then fixed with 1% glutaraldehyde, post-fixed in OsO_4 and processed for flat embedding in Epon 812 as described previously (Desjardins *et al.*, 1994).

Immunofluorescence and acidification analysis

Immunofluorescence on cells was performed using standard procedures described previously (Dermine *et al.*, 2001). Briefly, macrophages were grown on coverslips and pretreated or not with IFN- γ for 24 hours. For acidification experiments, macrophages were preincubated with 100 nM LysoTracker (Molecular Probes) for 30 min, washed in PBS, and phagosomes were formed by internalization of 3.0 μ white BSA-Alexa latex beads in medium containing LysoTracker. Chase was also performed in medium containing

LysoTracker. Cells were then fixed in PFA 4%, washed and rehydrated in PBS and coverslips were mounted on slides with Gelvatol, and observed with a confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). For other immunofluorescence experiments involving antibodies, macrophages were fixed in methanol/acetone (80:20) at -20°C for 20 min followed by PBS wash and rehydration. Coverslips were blocked for 10 min in PBS, 2% bovine serum albumin (BSA fraction V, Sigma, St-Louis, MO), 0.2% gelatin then incubated with primary antibodies for 1 h, washed in PBS, BSA 1% and incubated with secondary antibodies coupled to Alexa (Molecular probes) for 30 min. Coverslips were washed in PBS, mounted on slides with Gelvatol, and observed by confocal microscopy. Images and total immunofluorescence of observed fields were analyzed using Leica Confocal Software.

High resolution 2-D gel electrophoresis

Isolated phagosomal proteins were separated by 2-D gel electrophoresis as previously described (Garin *et al.*, 2001). Briefly, isolated phagosomes were resuspended in lysis/rehydration buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 40 mM DTE, 20 mM Tris, 2% IPG buffer and bromophenol blue) and vortexed for 1 hour. Sample loading in the first dimension was performed overnight. by in-gel reswelling of linear immobilized pH-gradient 7 cm or 18 cm strips (Amersham Biosciences). First dimension isoelectric focusing separation (IEF) was done on each strip. After that, strips were equilibrated in a 13 mM DTT solution for 10 min and then in a 2.5% iodoacetamide solution for 5 min. Second dimension was performed using standard SDS-PAGE. The resulting gels were then silver stained for protein patterns analysis with the ImageMaster software (Amersham Biosciences) or processed for mass spectrometry (MS) analysis.

Mass spectrometry analysis

Phagosomal proteins separated on 2-D gels were analysed as described previously (Garin *et al.*, 2001 ; Houde *et al.*, 2003). Briefly, protein spots from 2-D gels were excised, unstained

and trypsin digested with the resulting tryptic peptides extracted with 0.2 M urea in 50% aqueous acetonitrile. Each digested spot was analysed by nanoLC-MS/MS using a Waters CapLC coupled to Q-TOF Ultima.

Parasite degradation

Parasite degradation experiments were performed as previously described (Duclos *et al.*, 2000). Macrophages, pretreated or not with IFN- γ for 24 h, were infected for 1 h by *Leishmania donovani* promastigotes stably expressing luciferase enzyme at a ratio of ten parasites per macrophages. Uningested *Leishmania* were removed by 4 washes in PBS, followed by different chase times in culture medium. Cells were lysed in lysis reagent (Promega, Madison, WI) containing proteases inhibitors for 30 min at 4°C. Cell lysate was mixed 1 : 1 with luciferase assay reagent (Promega, Madison, WI) and luciferase activity was measured by a LUMIstar Galaxy (BMG Labortechnologies, Offenburg, Germany).

Western blotting

For western blot analysis, the same quantity of latex beads-phagosomes, as determined by light-scattering with the spectrophotometer, from control and IFN- γ -treated samples were used. Western blots were performed according to standard procedures with proteins separated on 12% or 10% SDS-PAGE followed by electroblotting on Hybond-ECL membranes (Amersham Biosciences) and immunodetection with antibodies. Secondary antibodies used were either coupled to horseradish peroxidase ensuing a signal visualization by ECL (Roche Diagnostics), or were coupled to Alexa ensuing a signal visualization with a Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

Results

Interferon- γ promotes microbicidal and antigen presentation pathways in macrophages

Global effects of IFN- γ on RAW macrophages were first verified to ensure a genuine effect of this cytokine on this cultured cell line. Activation of microbicidal functions by IFN- γ were analyzed by looking at the induction of ROS generated during the oxidative burst. The DCFH-DA probe, specific for ROS, shows in cells treated with IFN- γ for 24 hours a significant increase of ROS levels following internalization of latex beads (Fig 1 a). A similar induction was detected in cells treated for 36 hours with IFN- γ (not shown). Oxidative burst in macrophages stimulated by IFN- γ that have internalized *E. coli* bacteria can also be visualized by electronic microscopy with the presence of a CeCl₃ deposit indicating the presence of ROS in phagosomes containing the bacteria (Fig 1b). Activation of the MHC-I presentation pathway was then investigated. Immunofluorescence and confocal microscopy analysis with antibodies specific against MHC-I and TAP1, two elements known to be induced by IFN- γ , show a significant increase of their protein levels following a 24 h treatment with IFN- γ (Fig 1c). A similar result is also detected for LMP-2, an IFN- γ -inducible subunit of the proteasome (Fig 1d). Protein levels of LMP-2 were also analysed by western blot and show a significant induction following IFN- γ treatment (Fig 1d). These results show that IFN- γ has a significant inducing effect in various pathways involved in microbicidity and antigen presentation known to be activated by this cytokine in the macrophages used in this study.

Establishment of a 2-D proteome map of the phagosome

To study the global effect of IFN- γ on phagosomes, a 2-D gel map of this organelle was generated by a proteomics approach (Fig 2a). First, mature phagosomes were formed by the internalization of latex beads in RAW macrophages for 1 h followed by a chase of 1 h to allow fusion and acquisition of proteins from the endocytic pathway. After isolation of the latex beads-phagosomes, a 2-D electrophoresis was performed to separate proteins according to their isoelectric points and their molecular weights. Proteins were silver stained and the 2-D gel was scanned at a high resolution. The 2-D gel image was separated into sectors and each protein spot within a sector was assigned a unique numerical value consisting of 4 numbers. The first number corresponds to the column of the sector, the second number corresponds to the line and the last two numbers correspond to the protein spot within the sector. After assigning a unique numerical identifier to each protein spot on the 2-D gel, the spots were excised and treated for mass spectrometry protein identification. 395 spots were identified corresponding to 162 different proteins. Identified protein spots are shown in Table 1 and Table 2 shows a collapsed view of the phagosome proteome map with proteins divided according to their cellular functions. Repartition of phagosomal proteins according to their functions is resumed in Figure 2b.

Modulation of phagosomal proteome by interferon- γ

Phagosomes purified from macrophages treated or not with IFN- γ for 24 h were analyzed by looking at positively modulated protein spots on 2-D gels generated with the samples (Fig 3a). Control 2-D gel and IFN- γ 2-D gel were scanned at a high resolution and protein patterns were analyzed with the ImageMaster software to quantify protein spots upregulated by IFN- γ . Following this, gels were compared with the previously generated 2-D proteome map (Fig 2a) and modulated spots were assigned either the numerical value of their counterpart on the 2-D proteome map, or the value “U” for unidentified if they had no

identified counterpart on the 2-D map. Results are shown in Table 3. 46 identified spots corresponding to 35 proteins were upregulated by IFN- γ on the phagosome. Of those, 33 spots corresponding to 28 proteins had a two-fold increase, 10 spots corresponding to 9 proteins had a three-fold increase and three spots corresponding to two proteins had a 4-fold or more increase. Identified proteins modulated by IFN- γ were collapsed and separated according to their cellular functions (Table 4). The identified proteins can be separated into 12 classes according to their functions (Fig 3b). 75 upregulated spots were classified as unidentified because either their counterpart had not been identified on the 2-D proteome map or spots matching did not allow a 95% certainty match. The results obtained by pattern comparisons were validated by doing western blots with antibodies specific against different proteins (Fig 3c). The chaperones calnexin and calreticulin, the immunoproteasome inducible subunit LMP-2, the transporter associated with antigen processing subunit 1 (TAP1), the small GTPases Rab5a and Rab7, and the v-ATPase proton pump 30 kDa E subunit were upregulated in phagosomes from IFN- γ -treated macrophages. The upregulation of calreticulin and v-ATPase observed by western blot correlates with the upregulation observed on 2-D gels (Fig 3a and 3c, spot 2500 for calreticulin and 7300 for v-ATPase). Although protein spots identified as forms of the protease cathepsin B are upregulated on 2-D gels (Fig 3a and 3c, spots 3314 and 3315), the protein levels did not vary when observed by western blot (Fig 3c), which correlates to other unmodulated protein spots of cathepsin B on the 2-D gels (Fig 3c, spots 3316 and 3317). However, the positively modulated protein spots 3314 and 3315 of cathepsin B are shifted by comparison with the unmodulated spots 3316 and 3317, which correlates with the shift observed by western blot (Fig 3c). This shift corresponds to a deglycosylated state of cathepsin B induced by IFN- γ . The highly glycosylated protein LAMP-1, enriched in phagosomes, did not vary and serves as a control of the quantity of phagosomes loaded on gels (Fig 3c).

Degradation of *Leishmania donovani* parasite is accelerated in macrophages stimulated by interferon- γ

As IFN- γ modifies the forms of many proteases in phagosomes, as seen by an increase of the levels of different protein spots corresponding to proteases on the 2-D gels (Table 4 and Fig 3c), we investigated this effect on the degradation of parasites internalized by macrophages treated with IFN- γ . We used the parasite *Leishmania donovani* stably expressing the luciferase enzyme to measure the rate of degradation of this microorganism in phagosomes (Fig 4). Luciferase activity values were converted to percentage to compare control and IFN- γ -treated macrophages. Already after 1 h of maturation, phagosomes from IFN- γ -treated cells display on average less luciferase activity, with 46% of activity left in control and 36% left in IFN- γ sample. After 3 h and 6 h of maturation, phagosomes from IFN- γ -treated macrophages display significantly less luciferase activity, with a three-fold difference at 6 h (9% of activity left in control and 3% of activity left in IFN- γ sample). Thus, a modification to the forms of proteases in phagosomes from IFN- γ -treated macrophages correlates with an acceleration of protein degradation.

Modulation of phagosome acidification by interferon- γ

Since IFN- γ stimulates the levels of different v-ATPase subunits on phagosomes (Table 4 and Fig 3c), we looked at the acidification of this organelle during maturation (Fig 5). Phagosomes were formed from the internalization of latex beads coated with fluorescent BSA and acidification of this compartment was looked at using a fluorescent LysoTracker probe that is active at acidic pHs. We can observe that few early phagosomes (30'-0') from control macrophages display an acidic environment (10%) as opposed to early phagosomes from IFN- γ -treated macrophages, which are more positives for an acidic environment (30%). After 1 h of maturation, we can still detect more acidic phagosomes in IFN- γ -treated

cells than in control cells (64% for IFN- γ and 34% for control). At later maturation points, almost all phagosomes display an acidic environment as indicated by the fluorescent signal emitted by the LysoTracker probe. The improvement of acidification by IFN- γ in early phagosomes indicates faster fusion with endosomes and acquisition of the v-ATPase proton pump responsible for the compartment acidic environment.

Discussion

IFN- γ produces a large and complex variety of effects on cells of the immune system. Those effects range from boosting the microbicidal properties of macrophages to improving antigen presentation and cellular states such as growth, maturation, differentiation and apoptosis (Boehm *et al.*, 1997 ; Schroder *et al.*, 2004). As such, conventional approaches consisting of studying proteins involved in IFN- γ -stimulated pathways one by one can answer specific questions but fail to give a global view of the effects of this cytokine on a whole cell or organelle. Studies have been done using oligonucleotide arrays to get a large-scale view of genes differentially regulated by IFN- γ (Der *et al.*, 1998). As informative as those studies are, they cannot however precisely give information on the exact state of an organelle within an IFN- γ -treated cell.

In the present study, we used a large-scale proteomics approach combined with standard cell biology techniques to characterize the modulation of phagosome functional properties by IFN- γ . The results reported here were planned in a three-step strategy: (1) Identification of the phagosome proteome by mass spectrometry analysis (Garin *et al.*, 2001 ; Houde *et al.*, 2003 ; Brunet *et al.*, unpublished data ; and the results presented here) and establishment of a 2-D proteome map, (2) Identification of the IFN- γ -modulated phagosome proteome and (3) validation of the proteomics data via a standard cell biology approach.

Establishment of a 2-D proteome map of the phagosome for rapid protein analysis

In the first step of the strategy applied here, over 600 proteins were identified by mass spectrometry on phagosomes (Garin *et al.*, 2001 ; Houde *et al.*, 2003 ; Brunet *et al.*, unpublished data ; and the results presented here). However, these identifications, with the exception of the Garin *et al.* and this study, were obtained with a gel-free approach which makes it very hard to visualize and quantify proteins modulated by a cytokine like IFN- γ . To facilitate the study of the phagosome proteome modulation by IFN- γ , a 2-D gel approach was used to allow comparison of spot patterns between treated and non-treated cells. Mass spectrometry analysis of excised protein spots from a 2-D gel has allowed the identification of 395 spots (Fig 2a and Table 1). As proteins within a 2-D gel migrate to their precise pKa and molecular weight, patterns such as star constellations can be observed. Those protein spot patterns stay relatively identical from one experiment to another, making 2-D gels valuable tools for rapid protein identification by pattern comparison. Once such a 2-D proteome map has been established, protein patterns from control and IFN- γ -treated samples can be analyzed and modulated spots compared to the 2-D protein map for possible identification. Standard cell biology techniques can then be used to validate protein identifications obtained with the 2-D map.

Interferon- γ -treated macrophages present higher levels or modified states of different classes of proteins involved in microbicidal activity, degradation, membrane fusion, acidification, antigen presentation and signal transduction

The proteomics analysis of the phagosome proteome modulated by IFN- γ has yielded a global view of the effects of this cytokine on a complex organelle within the macrophage. We divided the 35 modulated proteins identified into 12 classes according to their cellular functions (Fig 3b and Table 4). Different types of proteases, including thiol proteases of the papain family cathepsin B, cathepsin C, cathepsin S and cathepsin Z, the

aspartyl protease cathepsin D and the serine carboxypeptidase cathepsin A are positively modulated in phagosomes from IFN- γ -treated macrophages. Cathepsins B, C, D, S and Z are well documented to play an important role in the catabolism of internalized proteins (Barrett, 1977) and cathepsin A has been reported to associate with beta-galactosidase, alpha-neuraminidase and N-acetylaminogalacto-6-sulfate sulfatase to assure their stability and activity (Morreau *et al.*, 1992 ; Rudenko *et al.*, 1995 ; Bonten et d'Azzo, 2000 ; Ostrowska *et al.*, 2003). IFN- γ has already been described as increasing the levels and activities of cathepsin B (Lah *et al.*, 1995), cathepsin D (Rossman *et al.*, 1990) and cathepsin S (Beers *et al.*, 2003). Although we do not observe any increase in the levels of cathepsin B in phagosomes, we can clearly see the apparition of lesser glycosylated forms of this protease (Fig 3c). The use of 2-D gels to study proteases like cathepsins allows for the visualization of different forms of these proteins separated according to their isoelectric point (Table 1). Use of 1-D gels condensates these forms in one molecular weight making it difficult to notice changes such as glycosylation. As such, modification of the glycosylated state of cathepsin B or other proteases by IFN- γ could correlate with a higher degradative potential in phagosomes. It has been reported that when cathepsin B is expressed in yeast, purified enzyme fractions displaying higher glycosylation have reduced enzymatic activity (Hasnain *et al.*, 1992). However, it has also been reported that glycosylation of cathepsin B does not influence its activity (Mach *et al.*, 1992 ; Iacobuzio-Donahue *et al.*, 1997). We show here that a phagosome proteome containing modified forms but not elevated levels of proteases like cathepsin B correlates with accelerated pathogen degradation as shown by the catabolism of luciferase expressed by *Leishmania* (Fig 4). Further studies will be necessary to clarify the effect of protease glycosylation on parasite degradation in phagosomes.

Cathepsin S plays a role in regulating MHC-II exogenous antigen presentation (Nakagawa *et al.*, 1999), a process taking place in mature phagosomes (Ramachandra *et al.*, 1999). It has been shown recently that cathepsin S plays an important role in generating

peptides for TAP-independent MHC-I cross-presentation (Shen *et al.*, 2004). However, we have shown previously (Houde *et al.*, 2003) that phagosomes contain all the elements to efficiently process exogenous antigens by a TAP-dependent pathway via a recruitment of proteasomes to the phagosomal membrane. As we have demonstrated in this precedent paper, immunoproteasomes are recruited to phagosomes from IFN- γ -treated macrophages as seen by an increase of the LMP-2 inducible subunit shown here (Fig 3c). We also demonstrate here that the TAP transporter is upregulated on phagosomes. TAP-dependent and independent pathways seem to coexist together in phagosomes and it would be interesting in the future to use a proteomics approach to characterize the contribution of both pathways to the degradation of exogenous antigens during cross-presentation. We also show here that phagosomes from IFN- γ -treated macrophages display increased levels of chaperones including BIP, calnexin, calreticulin, endoplasmin, PDIs and HSP-60 (Figure 3a, 3c and Table 4). The presence of ER chaperones on phagosomes is not surprising as the ER was shown to be recruited to the macrophage's plasma membrane to participate in the formation of nascent phagosomes, a process referred to as ER-mediated phagocytosis (Gagnon *et al.*, 2002). Endoplasmin, also named ERp99, has already been described as being upregulated in cells treated with IFN- γ (Anderson *et al.*, 1994). Calreticulin could possibly play a role in cross-presentation of exogenous antigen on MHC-I molecules in phagosomes (Houde *et al.*, 2003 ; Guermonprez *et al.*, 2003 ; Ackerman *et al.*, 2003). It has been well described that MHC-I presentation was improved in cells treated with IFN- γ and the presence in phagosomes of higher levels of proteins involved in this process, including calreticulin, LMP-2, MHC-I and TAP1, suggests that cross-presentation could be favored in phagosomes from interferon- γ -treated macrophages.

Interferon- γ accelerates fusion between endosomes and phagosomes and increases the acidification of the phagosomal compartment

Phagosomes from IFN- γ -treated macrophages display higher acidity in early time points (Fig 5). An acidic environment is important for the activation of many lysosomal proteases. The accelerated acidification of phagosomes correlates with higher levels of the v-ATPase proton pump shown by the proteomics and standard cell biology analysis of the compartment (Fig 3a, 3c and Table 3) and also with the higher levels of the small GTPases Rab5a and Rab7 (Fig 3c). Rab5a has been described as having its expression and activity increased by IFN- γ (Alvarez-Dominguez and Stahl, 1998). An active mutant of Rab5a has also been shown to accelerate phagosome maturation (Alvarez-Dominguez and Stahl, 1999). As Rab5a is essential for kiss-and-run type interactions with early endosomes (Duclos *et al.*, 2003 ; Desjardins, 1995), and its levels are increased on phagosomes from IFN- γ -treated macrophages, a faster rate of fusion between early phagosomes and early endosomes involving Rab5a could explain how phagosomes can acquire an optimal acidic environment important for the microbicidal functions of the organelle more rapidly. We also show here an increase of the levels of Rab7 on phagosomes from IFN- γ -treated macrophages. Rab7 is a small GTPase that controls traffic between early and late endosomes/lysosomes (Feng *et al.*, 1995 ; Vitelli *et al.*, 1997), and is involved in fusion events between phagosomes and late endosomes/lysosomes (Via *et al.*, 1997). The importance of Rab7 has been shown in Mycobacterial infections, where Rab7 is excluded from phagosomes containing Mycobacterium and fusion of late endosomes/lysosomes with phagosomes does not occur (Via *et al.*, 1997). The recruitment of Rab7 is also impaired in an infection of macrophages by *Leishmania* (Scianimanico *et al.*, 1999). Alvarez-Dominguez and Stahl have shown that, in contrary to Rab5a, levels of Rab7 do not increase in macrophages stimulated by IFN- γ (Alvarez-Dominguez and Stahl, 1998), a result that seems to contradict our observation of higher levels of Rab7 in phagosomes from IFN- γ -treated macrophages (Fig 3c). However, higher levels of Rab7 in phagosomes could come

from an enhanced redistribution of this small GTPase instead of enhanced protein expression. Higher levels of Rab7 in phagosomes could play a role similar to Rab5a and enhance phagosomal acidification by favoring interactions with late endosomes.

Obviously, the analysis of the modulation of the functional properties of the phagosome by IFN- γ or any other cytokines or drugs proves to be quite a challenge. New tools using large-scale proteomics approaches greatly increase the efficiency of the research and the accuracy of the global cellular view of the phenomenon. 2-D proteome maps have the advantage of providing accurate references for quick analysis of protein regulation. However, many transmembrane proteins, such as LAMP-1, will not appear on 2-D maps due to technical limitations of the gel-based approach. We are currently working on a gel-free approach using an algorithm developed for mass spectrometry quantitation (Houde *et al.*, in preparation) that will hopefully complement the 2-D gel approach used in this study. Combination of different approaches using large-scale proteomics characterization and traditional cell biology techniques should open a new era for cellular and organelle research.

Acknowledgements We wish to thank Annie Laplante, Guillaume Goyette and Jonathan Boulais for technical assistance, Jacques Thibodeau and Serge Sénéchal for the use of the FACSCalibur and Sylvain Brunet for critical reading of this work. This work was supported by the Canadian Institute for Health Research and Genome Canada/Québec.

Competing interests statement The authors declare that they have no competing financial interests.

References

Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R., Cresswell, P. (2003) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 12889-12894.

Akira, S. (2000) The role of IL-18 in innate immunity *Curr. Opin. Immunol.* 12, 59-63.

Alvarez-Dominguez, C., Stahl, P.D (1999) Increased expression of Rab5a correlates directly with accelerated maturation of *Listeria monocytogenes* phagosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 11459-11462.

Alvarez-Dominguez, C., Stahl, P.D. (1998) Interferon-gamma selectively induces Rab5a synthesis and processing in mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 273, 33901-33904.

Anderson, S.L., Shen, T., Lou, J., Xing, L., Blachere, N.E., Srivastava, P.K., Rubin, B.Y. (1994) The endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is transcriptionally upregulated in interferon-treated cells. *J. Exp. Med.* 180, 1565-1569.

Bach, E. A., Aguet, M., Schreiber, R. D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563-591.

Barrett, A. J. (1977) Cathepsin D and other carboxyl proteinases. Barrett, A. J. eds. *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, 209-248 Elsevier North-Holland Biomedical Press New York.

Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M. (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130, 1910-1917.

Belich, M. P., Glynn, R. J., Senger, G., Sheer, D., Trowsdale, J. (1994) Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins *Curr. Biol.* 4, 769-776.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749-795.

Bonten, E.J., d'Azzo, A. (2000) Lysosomal neuraminidase. Catalytic activation in insect cells is controlled by the protective protein/cathepsin A. *J. Biol. Chem.* 275, 37657-37663.

Boss, J. M. (1997) Regulation of transcription of MHC class II genes *Curr. Opin. Immunol.* 9, 107-113.

Brandt, R., Keston, A.S. (1965) Synthesis of diacetyldichlorofluorescein : a stable reagent for fluorometric analysis. *Anal. Biochem.* 11, 6-9.

Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A. (1999) Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells *J. Immunol.* 163, 4647-4650.

Chang, C. H., Guerder, S., Hong, S. C., van Ewijk, W., Flavell, R. A. (1996) Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression *Immunity* 4, 167-178.

Chang, C. H., Flavell, R. A. (1995) Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation *J. Exp. Med.* 181, 765-767.

Cresswell, P. (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.

Darnell, J. E., Jr, Kerr, I. M., Stark, G. R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins *Science* 264, 1415-1421.

Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95,15623-8.

Dermine, J.F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G., and Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 18507-18512.

Dermine, J.F., Goyette, G., Letarte, S., Houde, M., Turco, S.J., Desjardins, M. (2004) *Leishmania* survival strategy in macrophages relies on the disruption of phagosome microdomains by its lipophosphoglycan. *In preparation.*

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

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

Desjardins, M., Nzala, N.N., Corsini, R., 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.

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

Desjardins, M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 280-291.

Dinarello, C. A. (1999) IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 11-24.

Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H., and Desjardins, M. (2000) Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell Sci.* 113, 3531-3541.

Duclos, S., Corsini, S., Desjardins, M. (2003) Remodeling of endosomes during lysosomes biogenesis involves 'kiss and run' fusion events regulated by rab5. *J. Cell Sci.* 116(Pt5), 907-918.

Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A. (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol.* 131, 1435-52.

Figueiredo, F., Koerner, T. J., Adams, D. O. (1989) Molecular mechanisms regulating the expression of class II histocompatibility molecules on macrophages. Effects of inductive and suppressive signals on gene transcription *J. Immunol.* 143, 3781-3786.

Flaishon, L., Hershkoviz, R., Lantner, F., Lider, O., Alon, R., Levo, Y., Flavell, R. A., Shachar, I. (2000) Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells *J. Exp. Med.* 192, 1381-1388.

Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J. J., Koyasu, S. (2001) IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge *Trends Immunol.* 22, 556-560.

Fukao, T., Matsuda, S., Koyasu, S. (2000) Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells *J. Immunol.* 164, 64-71.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J.M., Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., Desjardins, M. (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* 152, 165-180.

Gessani, S., Belardelli, F. (1998) IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 117-123.

Golab, J., Zagozdzon Stoklosa, T., Kaminski, R., Kozar, K., Jakobisiak, M. (2000) Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18—a bridge too far? *Immunol. Lett.* 72, 153-157.

Gotthardt, D., Warnatz, H.J., Henschel, O., Bruckert, F., Schleicher, M., Soldati, T. (2002) High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. 13, 3508-3520.

Greenberg, S., Grinstein, S. (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 136–145.

Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., Kloetzel, P. M. (1996) A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome *Eur. J. Immunol.* 26, 863-869.

Groettrup, M., Khan, S., Schwarz, K., Schmidtke, G. (2001) Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* 83, 367-372.

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

Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L., Lund, F. E. (2000) Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells *Nat. Immunol.* 1, 475-482.

Hasnain, S., Hirama, T., Tam, A., Mort, J.S. (1992) Characterization of recombinant rat cathepsin B and nonglycosylated mutants expressed in yeast. New insights into the pH dependence of cathepsin B-catalyzed hydrolyses. *J. Biol. Chem.* 267, 4713-4721.

Hisamatsu, H., Shimbara, N., Saito, Y., Kristensen, P., Hendil, K. B., Fujiwara, T., Takahashi, E., Tanahashi, N., Tamura, T., Ichihara, A., Tanaka, K. (1996) Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma *J. Exp. Med.* 183, 1807-1816.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.

Iacobuzio-Donahue, C.A., Shuja, S., Cai, J., Peng, P., Murnane, M.J. (1997) Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression. *J. Biol. Chem.* 272, 29190-29199.

Kelly, A., Powis, S. H., Glynne, R., Radley, E., Beck, S., Trowsdale, J. (1991) Second proteasome-related gene in the human MHC class II region *Nature* 353, 667-668.

Kern, I., Steimle, V., Siegrist, C. A., Mach, B. (1995) The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes *Int. Immunol.* 7, 1295-1299.

Keston, A.S., Brandt, R. (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 11, 1-5.

Lafuse, W. P., Brown, D., Castle, L., Zwillig, B. S. (1995) IFN-gamma increases cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages *J. Leukoc. Biol.* 57, 663-669.

Lah, T. T., Hawley, M., Rock, K. L., Goldberg, A. L. (1995) Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages *FEBS Lett.* 363, 85-89.

Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., Reith, W. (1996) Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease *Annu. Rev. Immunol.* 14, 301-331.

Mach, L., Stuwe, K., Hagen, A., Ballaun, C., Glossl, J. (1992) Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem. J.* 282 (Pt2), 577-582.

Morreau, H., Galjart, N.J., Willemsen, R., Gillemans, N., Zhou, X.Y., d'Azzo, A. (1992) Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267, 17949-17956.

Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., Modolell, M. (1998) Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation *J. Exp. Med.* 187, 2103-2108.

Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., Modolell, M. (2001) Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18—a bridge built on solid ground *Immunol. Lett.* 75, 159-160.

Nakagawa, T.Y., W.H. Brissette, P.D. Lira, R.J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J.D. McNeish, S.E. Eastman, E.D. Howard, S.R. Clarke, et al. 1999. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity*. 10:207–217.

Nandi, D., Jiang, H., Monaco, J. J. (1996) Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit *J. Immunol.* 156, 2361-2364.

Ostrowska, H., Krukowska, K., Kalinowska, J., Orłowska, M., Lengiewicz, I. (2003) Lysosomal high molecular weight multienzyme complex. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8, 19-24.

Otani, T., Nakamura, S., Toki, M., Motoda, R., Kurimoto, M., Orita, K. (1999) Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice *Cell. Immunol.* 198, 111-119.

Paludan, S. R. (1998) Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship *Scand. J. Immunol.* 48, 459-468.

Ramachandra, L., Song, R., Harding, C.V. (1999) Phagocytic processing of antigens for presentation by class II major histocompatibility complex molecules. *Cell. Microbiol.* 1, 205-214.

Ramana, C. V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H., Stark, G. R. (2000) Complex roles of Stat1 in regulating gene expression *Oncogene* 19, 2619-2627.

Rossmann, M. D., Maida, B. T., Douglas, S. D. (1990) Monocyte-derived macrophage and alveolar macrophage fibronectin production and cathepsin D activity. *Cell. Immunol.* 126, 268-277.

Rudenko, G., Bonten, E., d'Azzo, A., Hol, W.G. (1995) Three-dimensional structure of the human 'protective protein': structure of the precursor form suggests a complex activation mechanism. *Structure*. 3, 1249-1259.

Schindler, C., Darnell, J. E., Jr (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway *Annu. Rev. Biochem.* 64, 621-651.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. et Hume, D.A. (2004) Interféron- α : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163-189.

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

Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., Rock, K.L. (2004) Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation In Vivo. *Immunity* 21, 155-165.

Shiloh, M. U., MacMicking, J. D., Nicholson, S., Brause, J. E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., Nathan, C. (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase *Immunity* 10, 29-38.

St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F., Descoteaux, A. (1999) Role of protein kinase C- α in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J. Immunol.* 163, 5505-5511.

Strobl, B., Arulampalam, V., Is'harc, H., Newman, S. J., Schlaak, J. F., Watling, D., Costa-Pereira, A. P., Schaper, F., Behrmann, I., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., Horn, F., Heinrich, P. C., Kerr, I. M. (2001) A completely foreign receptor can mediate an interferon-gamma-like response *EMBO J.* 20, 5431-5442.

Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D.W., Lucia, S.M., Dinauer, M.C., Mastroeni, P., Fang, F.C. (2000) Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 287, 1655-8.

Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A., Deretic, V. (1997) Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. Biol. Chem.* 272, 13326-13331.

Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C.B., Bucci, C. (1997) Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 4391-4397.

Wolf, P. R., Ploegh, H. L. (1995) How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 267-306.

Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., Nakanishi, K. (1998) IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production *J. Immunol.* 161, 3400-3407.

Young, H. A. (1996) Regulation of interferon-gamma gene expression *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 563-568.

Figure legends

Figure 1. Interferon- γ promotes microbicidal and antigen presentation pathways in macrophages.

a, Induction of oxidative burst by IFN- γ . Oxidative burst was measured in IFN- γ -pretreated RAW macrophages that had had internalized latex beads for 1 h followed by a 1 h chase. Cells labeled with a DCFH-DA probe sensitive to ROS species were analyzed by flow cytometry with 20,000 events gated. *Black*, control cells; *red*, IFN- γ -treated cells. **b**, Visualization of ROS species formed during oxidative burst. Oxidative burst was visualized in RAW macrophages treated with IFN- γ that had internalized *E. coli* for 1 h, followed by cerium perhydroxide precipitate labeling of the formed ROS species. *Inset*, phagosome containing *E. coli* labeled cerium perhydroxide precipitate. **c**, Induction of MHC-I antigen presentation pathway by IFN- γ . RAW macrophages were treated or not with IFN- γ for 24 h, then labeled with antibodies specific for MHC-I (left panels) and TAP1 (right panels). The intensity of the immunofluorescence signal was measured by confocal analysis (graphic panels). **d**, Induction of proteasome subunit LMP-2 by IFN- γ . RAW macrophages were treated or not with IFN- γ for 24 h, then cells were analyzed for the induction of LMP-2 with a specific antibody by western blot (left panel) or immunofluorescence (right panels). The intensity of the immunofluorescence signal was measured by confocal analysis (graphic panels).

Figure 2. Establishment of a 2-D proteome map of the phagosome.

Phagosomes formed from a 1 h internalization of latex beads followed by a 1 h chase were purified from RAW macrophages. A 2-D electrophoresis was performed to separate proteins from lysed phagosomes and protein spots were silver stained. **a**, Establishment of a 2-D proteome map of the phagosome. The 2-D gel was scanned and the image was divided in sectors. Protein spots were assigned a 4-digit numerical value with the first number corresponding to the sector's column, second number corresponding to the sector's line and

last two numbers corresponding to the spot within the sector. **b**, Functional classification of proteins identified of the 2-D proteome map.

Figure 3. Positive modulation of phagosomal proteins by interferon- γ .

RAW macrophages were treated or not for 24 h with IFN- γ . Phagosomes were then formed by the internalization of latex beads for 1 h followed by a 1 h chase and isolated. Latex beads-containing phagosomes and phagosomal proteins were quantified and the same amount of phagosomes were lysed in rehydration buffer or Laemmli buffer. **a**, Positive modulation of phagosome proteome by IFN- γ . 2-D electrophoresis was performed and proteins were silver stained. Expression pattern of proteins from the control and IFN- γ 2-D gels was analyzed with ImageMaster for upregulation by IFN- γ and proteins were identified by matching spot patterns with the 2-D proteome map. *Black IDs* : 2-fold increase, *Green IDs* : 3-fold increase, *Red IDs* : 4-fold increase, *U* : unidentified spot. **b**, Functional classification of proteins positively modulated by IFN- γ . Proteins identified with the 2-D proteome map were classified in 12 categories according to their cellular functions reported in literature. **c**, Modulation of phagosomal proteins by IFN- γ . Western blots were performed using different antibodies specific against proteins from the phagosome to validate results obtained with 2-D gels. Calnexin, LMP-2, TAP1, Rab5a, Rab7, calreticulin and v-ATPase were upregulated in phagosomes from IFN- γ -treated macrophages (*right panels*). The upregulation of calreticulin and v-ATPase correlates respectively with the corresponding protein spots 2500 and 7300 of the 2-D gel (*left panels*). The amount of Cathepin B did not vary but the glycosylated state of the protein was changed as shown by a shift of the band (*right panels*, red arrowhead). The modification to the glycosylated state of cathepsin B correlates with the corresponding upregulated protein spots 3314 and 3315 of the 2-D gel (*left panels*). Protein spots 3316 and 3317 are unmodulated forms of cathepsin B. LAMP-1, a highly enriched glycoprotein in phagosomes, did not vary.

Figure 4. Degradation of *Leishmania donovani* is accelerated in macrophages stimulated by interferon- γ .

RAW macrophages were treated or not for 24 h with IFN- γ then infected with *Leishmania donovani* stably expressing luciferase for 1 h (1'-0') followed by 1 h (1'-1'), 3 h (1'-3') or 6 h (1'-6') chase. After *Leishmania*-containing macrophages have been lysed, luciferase activity was measured. After 1 h of chase, 46% of luciferase activity remained in control and 36% in IFN- γ -treated macrophages. After 3 h of chase, 14% of luciferase activity remained in control and 10% in IFN- γ -treated macrophages. After 6 h of chase, 9% of luciferase activity remained in control and 3% in IFN- γ -treated macrophages. Results were the average of triplicates of the percentage of initial luciferase activity left and error bars represent the standard deviation. * : significant difference between control and IFN- γ sample.

Figure 5. Improvement of early-phagosome acidification by interferon- γ .

RAW macrophages were treated or not for 24 h with IFN- γ , then phagosomes were formed by fluorescent BSA-opsonized latex beads internalization for 30 min (30'-0') or 1 h (1'-0') followed by a chase of 1 h (1'-1') or 3 h (1'-3'). A LysoTracker probe was included during the internalization and chase times. Cells were analyzed by confocal microscopy and LysoTracker-positive phagosomes corresponding to an acidic vacuole were counted. At the earliest time point (30'-0'), 10% of phagosomes from control and 30% of phagosomes from IFN- γ -treated macrophages were positives. At 1'-0', 34% of phagosomes from control and 65% of phagosomes from IFN- γ -treated macrophages were positives. At later time points (1'-1' and 1'-3'), there was no significant difference between control and IFN- γ -treated macrophages regarding the number of LysoTracker-positive phagosomes. *Panels:* Cells representative of one experiment. Results presented are the average of three independent experiments and error bars represent the standard deviation. * : significant difference between control and IFN- γ sample.

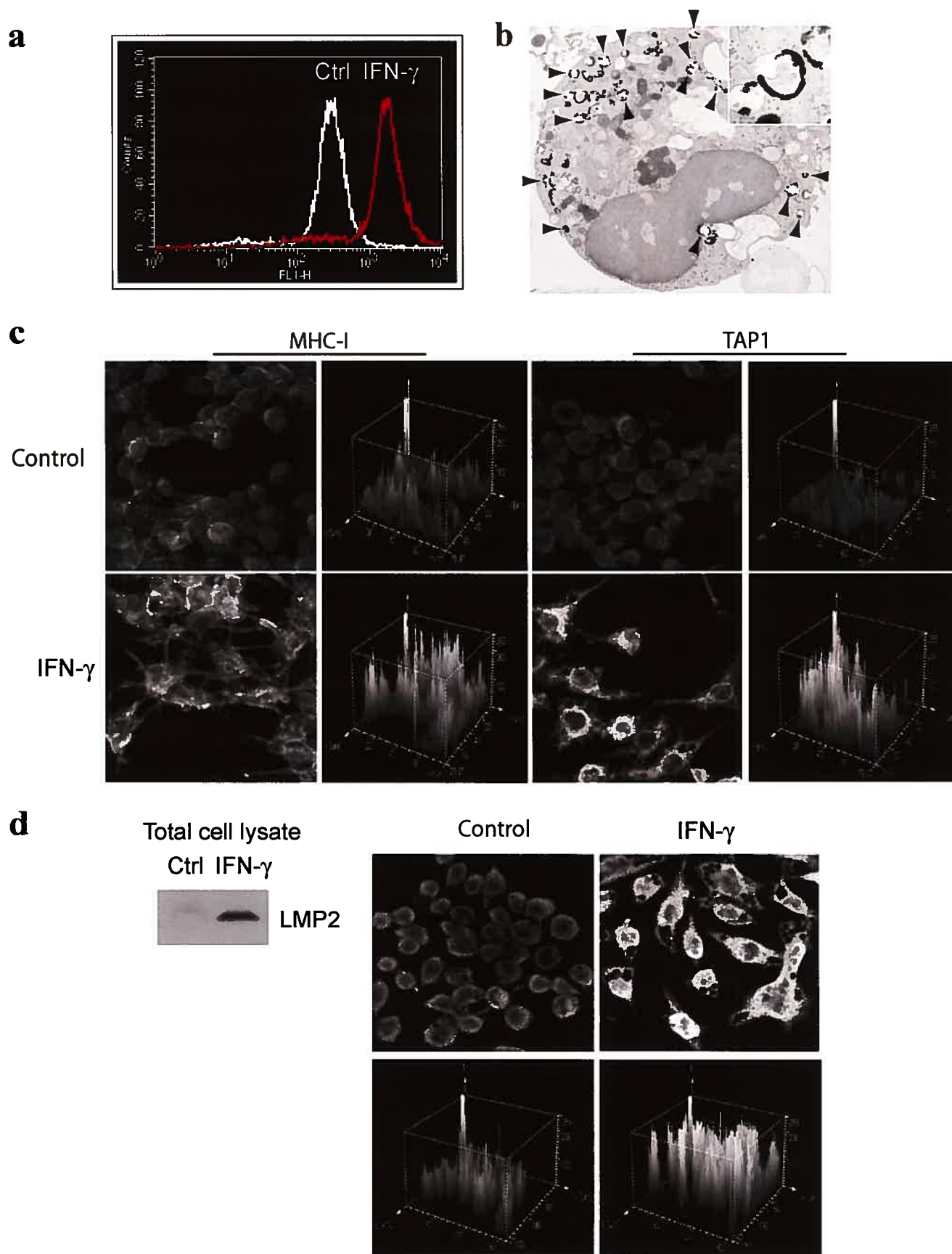


Figure 1. Interferon- γ promotes microbicidal and antigen presentation pathways in macrophages

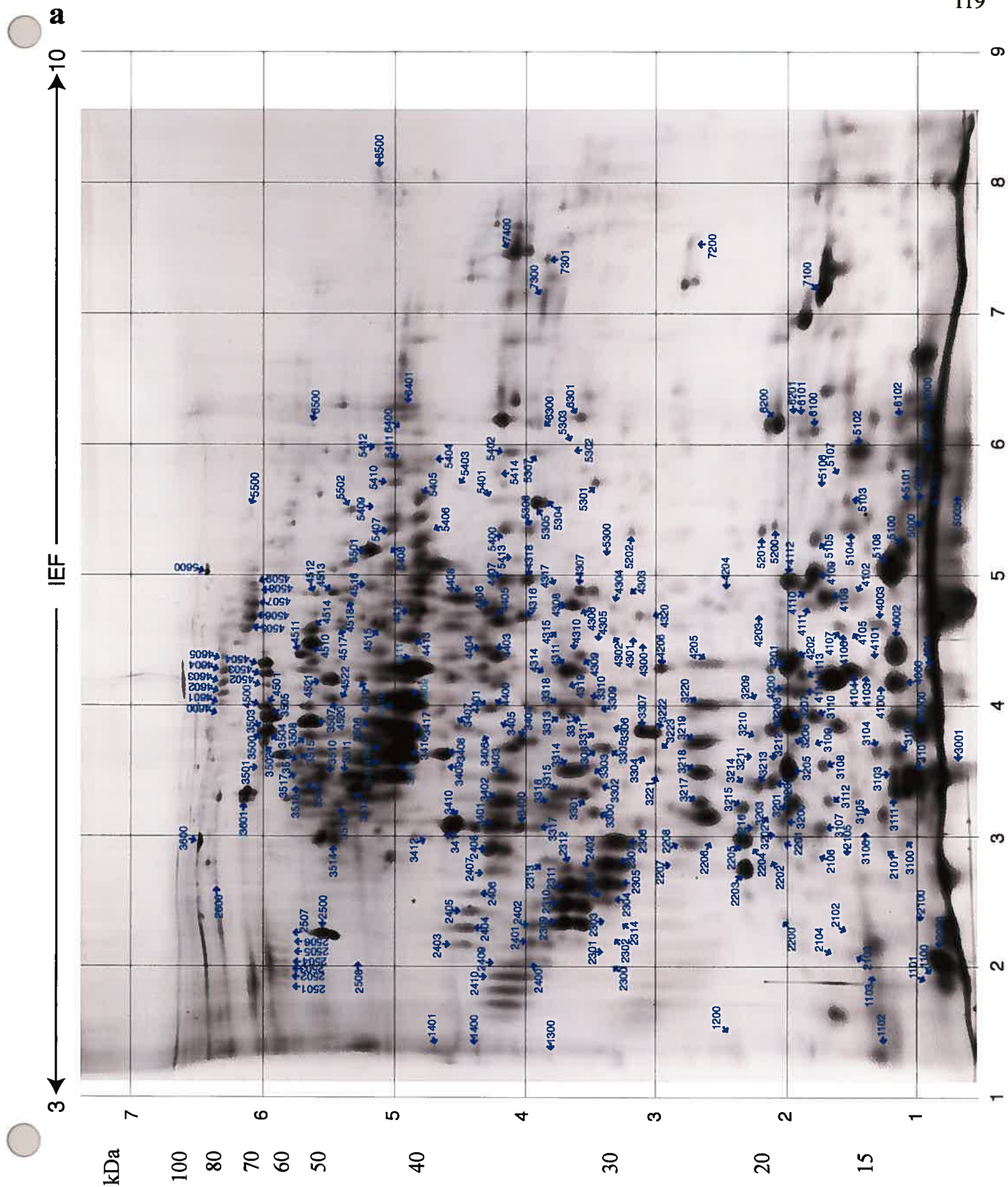


Figure 2. Establishment of a 2-D proteome map of the phagosome

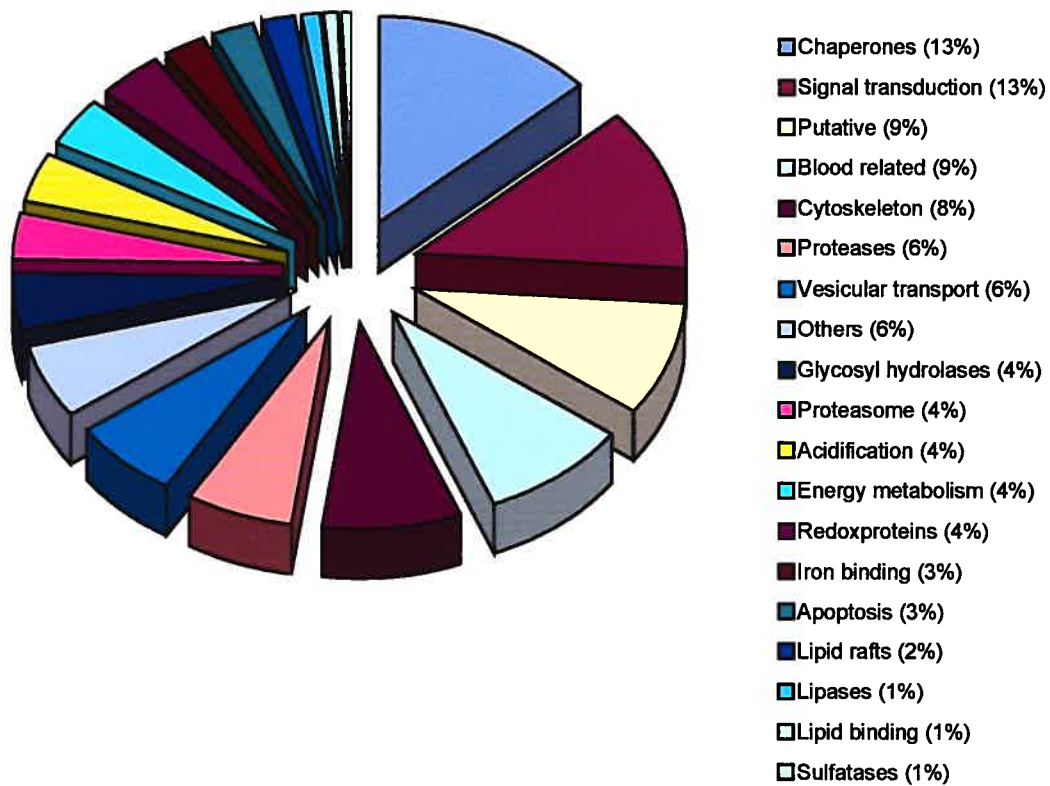
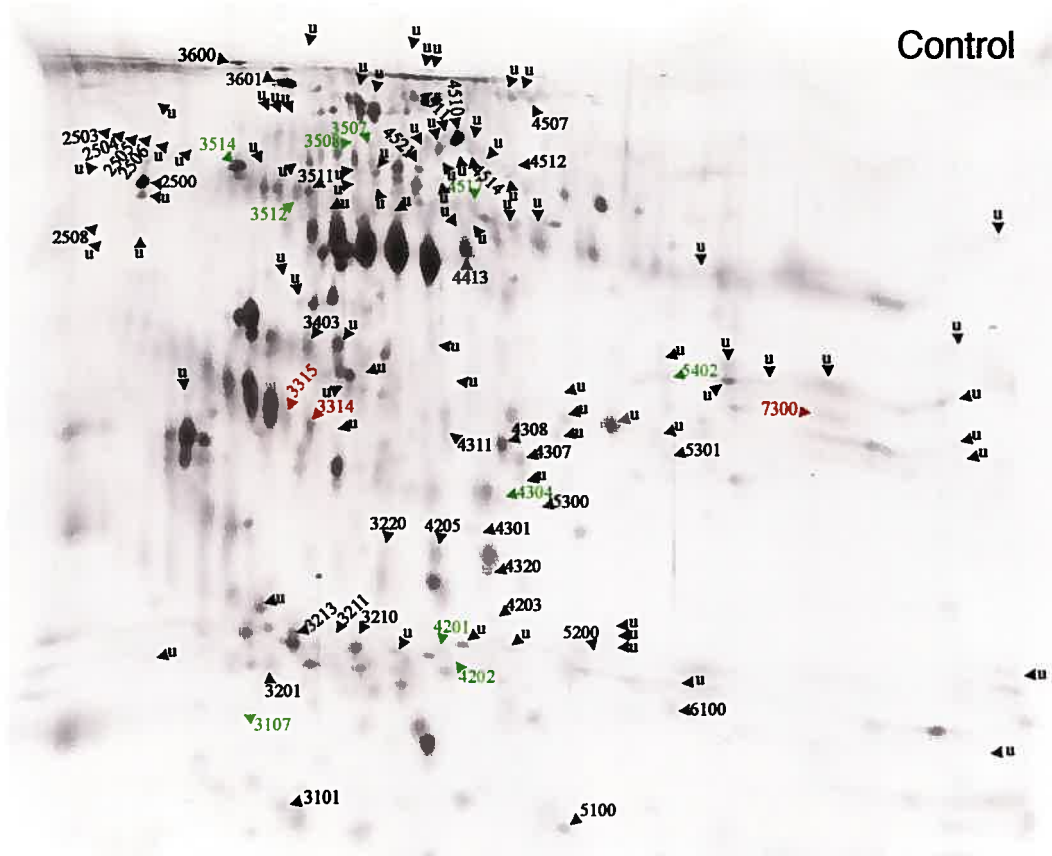
b

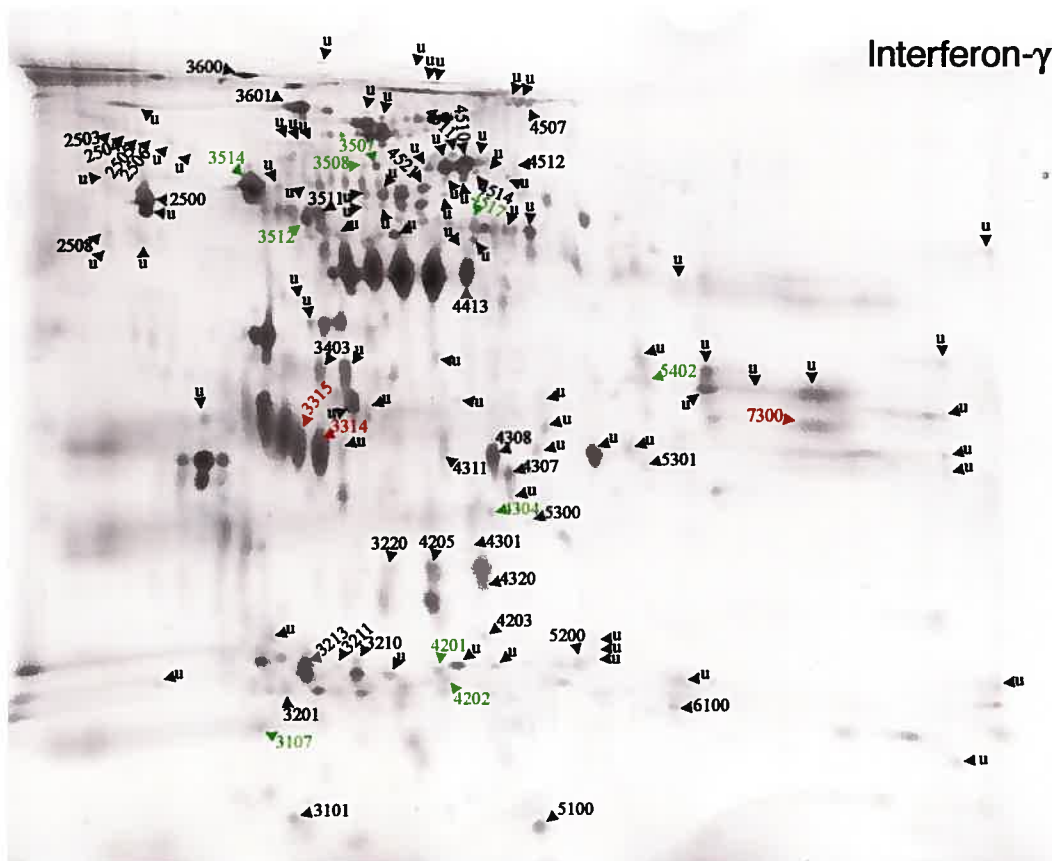
Figure 2. Establishment of a 2-D proteome map of the phagosome

a



Control

121



Interferon- γ

Figure 3. Positive modulation of phagosomal proteins by interferon- γ

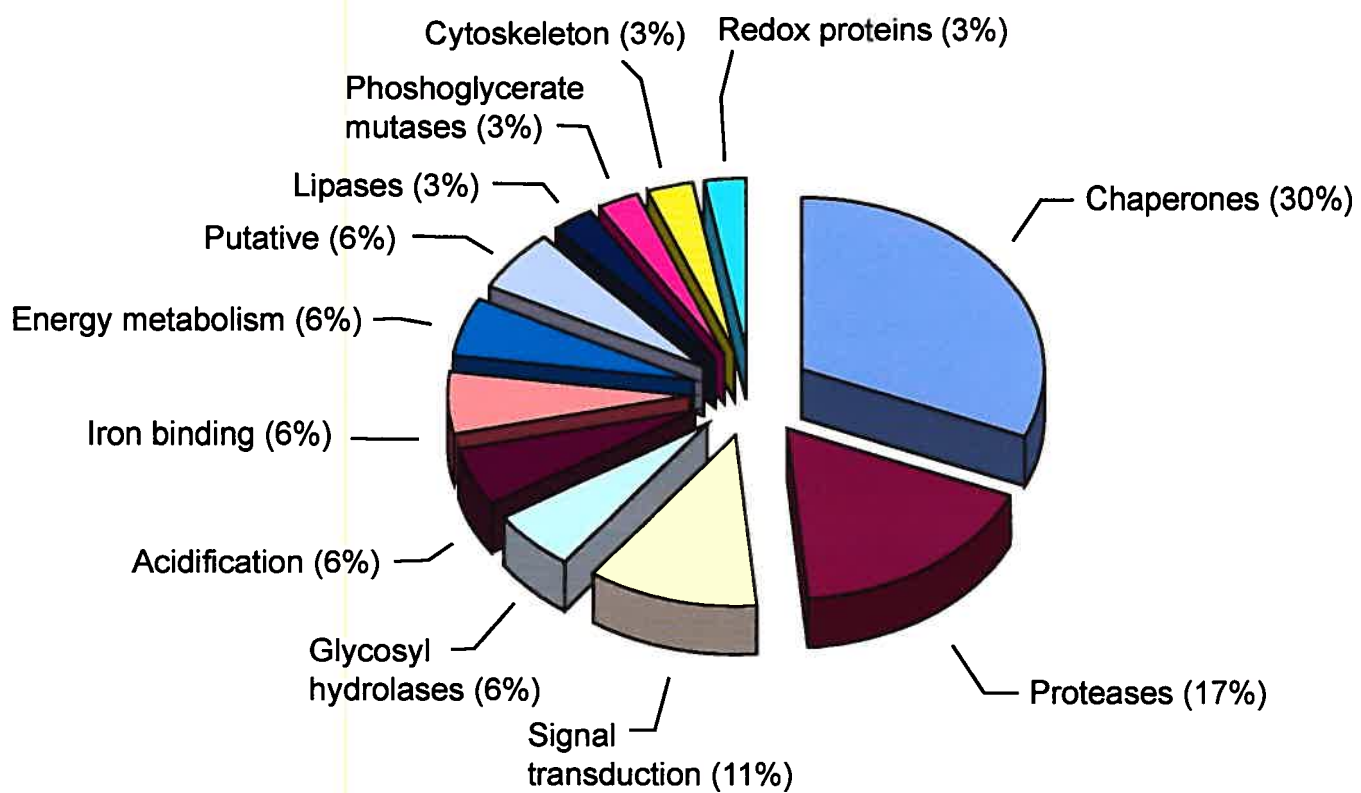
b

Figure 3. Positive modulation of phagosomal proteins by interferon- γ

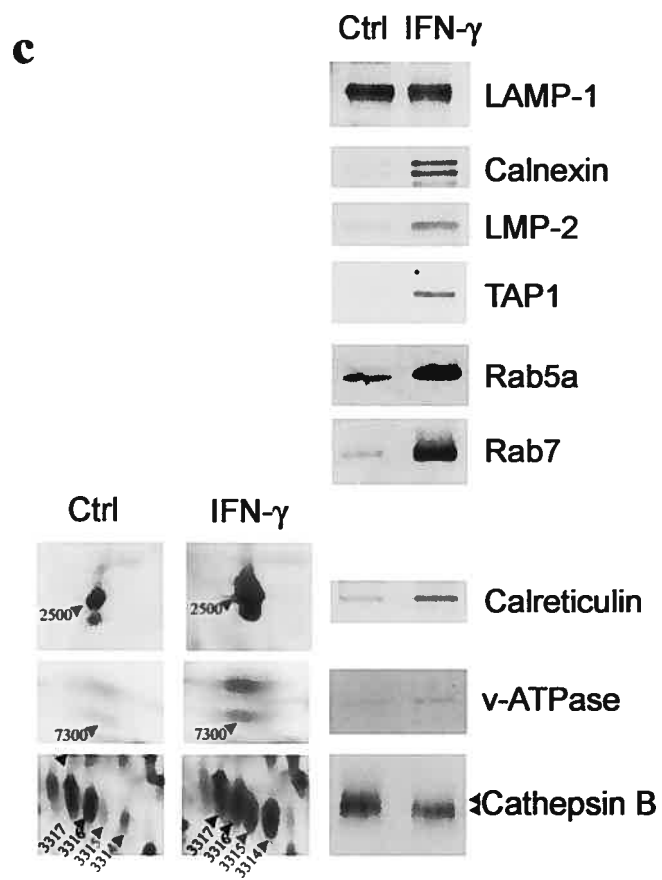


Figure 3. Positive modulation of phagosomal proteins by interferon- γ

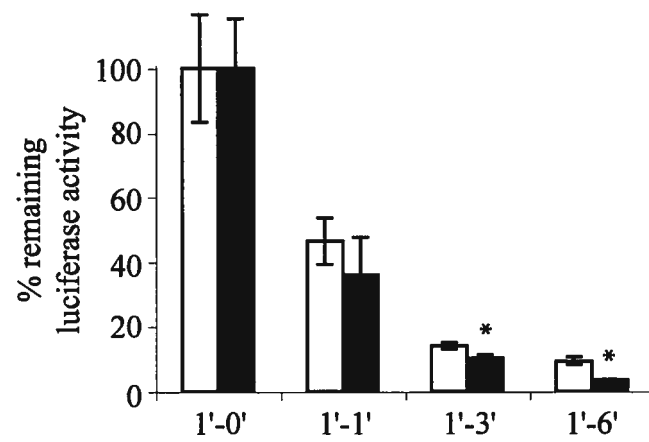


Fig 4. Degradation of *Leishmania donovani* is accelerated in macrophages stimulated by interferon- γ

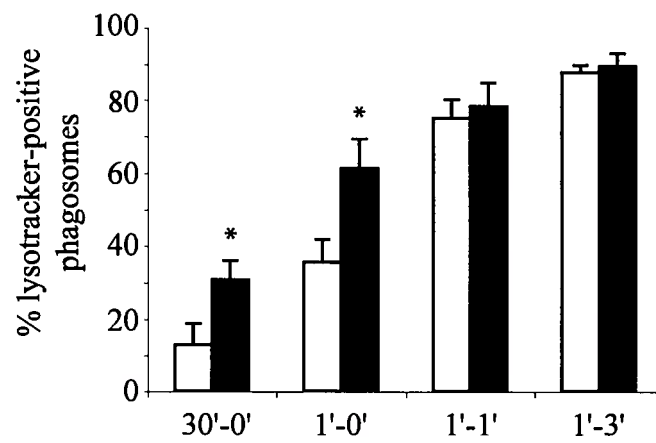
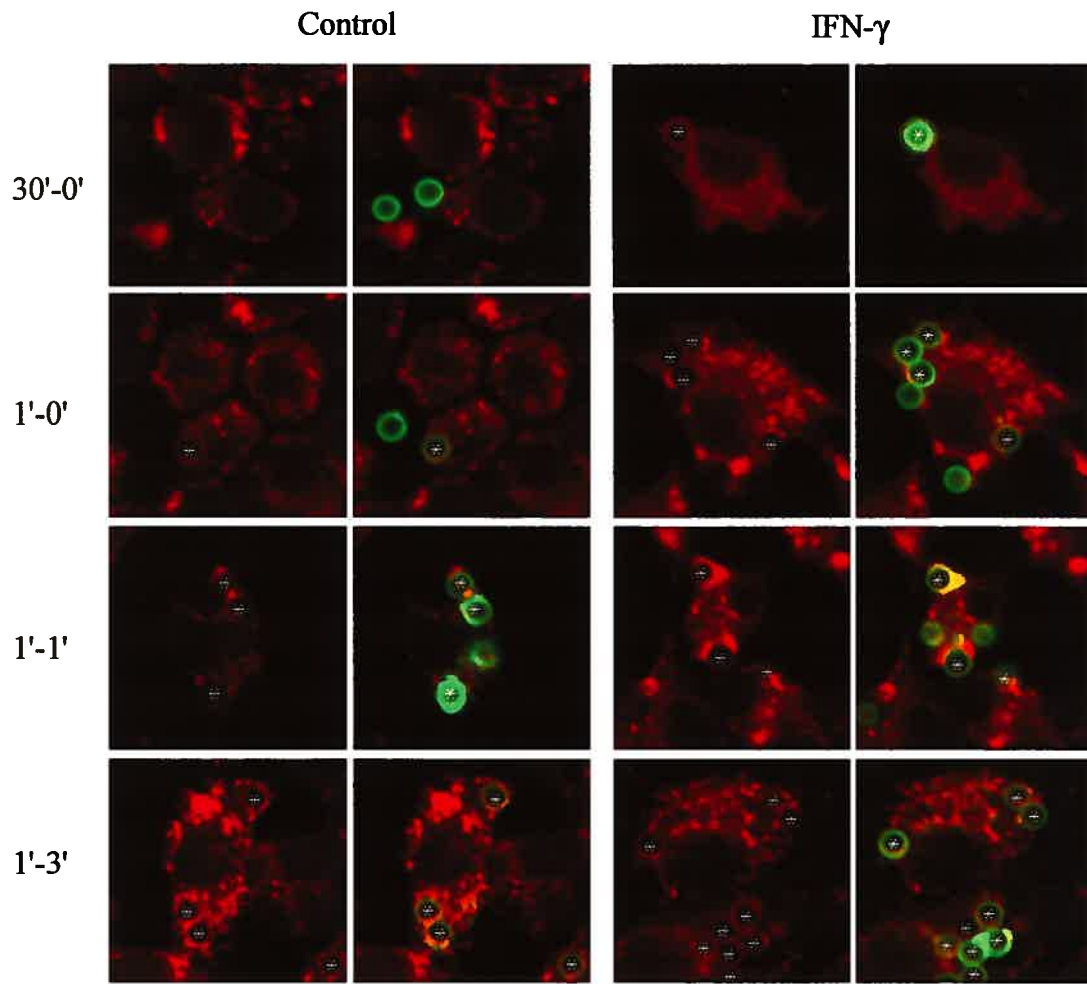


Fig 5. Improvement of early-phagosome acidification by interferon- γ

ID	Protein	Accession number *			
			2307 Gamma-interferon lysosomal thiol reductase precursor	P13284	3108 Actin alpha-cardiac I49465
			2308 Guanine nucleotide-binding protein G(I), alpha-2 subunit	P04897	3109 major outer membrane lipoprotein I Q08085
1100	Sulfated glycoprotein 1 precursor (SGP-1; prosaposin)	Q61207	2309 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	3110 Ferritin heavy chain P09528
1101	Sulfated glycoprotein 1 precursor (SGP-1, prosaposin)	Q61207	2310 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	3111 EST 2720177 AA710259
1102	Sulfated glycoprotein 1 precursor (SGP-1, prosaposin)	Q61207	2311 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	3112 EST 1538929 W89611
1103	ATP synthase delta chain (F-type ATPase)	P35434	2312 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	3200 alpha-2-macroglobulin Q61838
1103	Sulfated glycoprotein 1 precursor (SGP-1, prosaposin)	Q61207	2313 Tropomyosin 5	P21107	3200 Cyclophilin C-associated protein A48231
1200	RAB-15	P35289	2314 Gamma-interferon lysosomal thiol reductase	P13284	3200 RAP-2B P17964
1200	RAB-7	P51150	2400 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	3201 alpha-2-macroglobulin Q61838
1400	Guanine nucleotide-binding protein G(I)(G(S)Y(G)(T), beta subunit 2	P54312	2401 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	3201 Cyclophilin C-associated protein A48231
1400	Vacuolar ATP synthase subunit E (V-ATPase E subunit)	P50518	2402 14-3-3	P35215	3202 alpha-2-macroglobulin Q61838
1401	Lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase precursor (LAL)	P38571	2402 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	3202 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2000	Cold acclimation protein A	P93607	2403 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3203 KIAA0175 gene product NP_055606
2000	flagellin	Q8TLH4	2404 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3204 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2000	major outer membrane lipoprotein I	Q08085	2405 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3204 G18.2 protein NP_071390
2100	flagellin	Q8TLH4	2406 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3204 Hypothetical 20.7 KDA protein Q9Y3L5
2100	major outer membrane lipoprotein I	Q08085	2407 Cathepsin Z	Q9WUU7	3204 Lymphocyte antigen 86 (MD-1) NP_034875
2101	Beta-interferon-induced protein	JC1241	2408 Cathepsin Z	Q9WUU7	3204 Peroxiredoxin 2 (thioredoxin peroxidase I) Q61171
2101	Guanine nucleotide-binding protein G(I), alpha-2 subunit	P04897	2409 Serine carboxypeptidase I	P07519	3205 Epididymal secretory protein Q9Z0J0
2102	Bovine Serum Albumin	Q7M3A0	2410 Serine carboxypeptidase I	P07519	3205 Lymphocyte antigen 86 (MD-1) NP_034875
2102	Ribosomal protein P2	P42899	2500 Calreticulin	P14211	3206 alpha-antichymotrypsin P01011
2103	major outer membrane lipoprotein I	Q08085	2501 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3206 antitrypsin P34955
2103	Ribosomal protein P2	P42899	2502 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3207 alpha-antichymotrypsin P01011
2104	Cathepsin Z	Q9WUU7	2503 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3207 Epididymal secretory protein Q9Z0J0
2104	Ribosomal protein P2	P42899	2504 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3207 Ferritin heavy chain P09528
2105	RNA polymerase II transcription factor SIII p18 subunit	Q9XWU4	2505 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3207 Riken cDNA 1500031N16 gene AAH05712
2106	Myosin regulatory light chain 2, brain	S45709	2506 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3208 RAB-1A P05711
2200	Cyclophilin C-associated protein	A48231	2507 Cyclophilin C-associated protein	A48231	3208 RAB-1B P10536
2201	alpha-2-macroglobulin	Q61838	2508 Reticulocalbin 1	O70341	3209 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2201	Cyclophilin C-associated protein	A48231	2600 Heat shock protein beta, 90 kDa (HSP 90-beta)	P11499	3209 LMW I kinnogen KGHUL1
2202	Putative 12834709	BAB23012	3000 Vacuolar ATP synthase subunit F (V-ATPase F subunit)	P50408	3210 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2203	Cathepsin L	P06797	3001 Calcium binding protein A6 (calyculin)	NP_035443	3211 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2204	Cathepsin L	P06797	3001 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I)	P53634	3212 alpha-antichymotrypsin P01011
2205	alpha-2-macroglobulin	Q61838	3100 Putative 12854958	BAB30178	3212 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2206	alpha-2-macroglobulin	Q61838	3101 alpha-2-antiplasmin	P08697	3212 Modified LacZ 208984
2207	C4BP alpha chain	Q99N98	3101 Cathepsin D	P18242	3212 Peroxiredoxin 2 (thioredoxin peroxidase I) Q61171
2208	C4BP alpha chain	Q99N98	3101 complement component 9	Q9UGI4	3212 Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) (RKIP) P30086
2300	Cathepsin Z	Q9WUU7	3102 Cathepsin D	P18242	3213 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2301	Cathepsin Z	Q9WUU7	3103 Galectin-1	P16045	3214 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2302	Cathepsin Z	Q9WUU7	3104 Cathepsin D	P18242	3215 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2303	Cathepsin Z	Q9WUU7	3105 Beta-interferon-induced protein	JC1241	3215 Cathepsin L P06797
2304	Gamma-interferon lysosomal thiol reductase	P13284	3106 Cathepsin D	P18242	3216 Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I) P53634
2305	Gamma-interferon lysosomal thiol reductase precursor	P13284	3107 Cytochrome B5	P56395	3217 alpha-2-macroglobulin Q61838
2306	Gamma-interferon lysosomal thiol reductase precursor	P13284	3107 Putative 12844045	BAB26214	3217 Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) CAB42866

3218 Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	CAB42866	3401 Cathepsin Z	Q9WUU7	4003 Putative 12841285	BAB25145
3218 major outer membrane lipoprotein I	Q08085	3402 Cathepsin Z	Q9WUU7	4100 Putative 559059	AAA51041
3219 Actin gamma	P02571	3403 Cathepsin Z	Q9WUU7	4101 Fatty acid-binding protein, epidermal (E-FABP)	Q05816
3219 Cathepsin S	O70370	3404 Soluble NSF attachment protein alpha (SNAP-alpha)	P54921	4101 oxidase IV, cytochrome	Q83ZQ2
3219 Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	CAB42866	3405 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T), beta subunit 2	P54312	4101 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531
3219 major outer membrane lipoprotein I	Q08085	3406 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T), beta subunit 1	P04901	4102 alpha-1-antitrypsin	P34955
3220 Cathepsin S	O70370	3407 Soluble NSF attachment protein gamma (SNAP-gamma)	Q99747	4103 Ferritin light chain 2	P49945
3220 Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	CAB42866	3408 Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	P08752	4104 Ferritin light chain 1	P29391
3221 apolipoprotein A-I precursor	P15497	3409 Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	P08752	4105 Ferritin light chain 1	P29391
3221 Cathepsin S	O70370	3410 Vacuolar ATP synthase subunit D (V-ATPase D subunit)	P51863	4105 Putative 12844045	BAB26214
3221 major outer membrane lipoprotein I	Q08085	3411 Vacuolar ATP synthase subunit D (V-ATPase D subunit)	P51863	4106 Histone H2b	I48401
3221 RHO GDP-dissociation inhibitor 1 (RHO GDI 1)	P19803	3412 Ribosomal protein SA 40S	P08865	4106 Ubiquitin-conjugated enzyme E2-17 KDA	Q16781
3222 Cathepsin S	O70370	3413 Actin gamma	P02571	4107 Cathepsin D	P18242
3222 GRB2-related adaptor protein 2 (GADS protein)	Q63059	3414 Actin beta	P02570	4108 Superoxide dismutase (Cu-Zn)	P08228
3223 Ubiquitin-conjugating enzyme E2, 25 kDa (ubiquitin-protein ligase, huntingin interacting protein 2, HIP-2)	P27924	3415 Actin beta	P02570	4109 Putative 12852682	BAB29501
3300 Cathepsin D	P18242	3416 Cathepsin D	P18242	4109 Superoxide dismutase (Cu-Zn)	P08228
3301 Cathepsin L	P06797	3417 Cathepsin D	P18242	4110 HMW I kininogen	KGHUH1
3302 Cathepsin D	P18242	3500 Heat shock cognate protein, 71 kDa	P08109	4110 Putative 12852682	BAB29501
3303 Cathepsin L	P06797	3501 Heat shock cognate protein, 71 kDa	P08109	4111 major outer membrane lipoprotein I	Q08085
3304 ABC transporter	O70595	3502 Lamin B1	P14733	4111 Putative 12852682	BAB29501
3305 Actin gamma	P02571	3503 dnaK-type molecular chaperone hsc70	A45935	4112 Epididymal secretory protein	Q920J0
3305 alpha-antichymotrypsin	P01011	3504 Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (V-ATPase A subunit 1)	P50516	4113 Ferritin heavy chain	P09528
3305 Cathepsin D	P18242	3505 Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (V-ATPase A subunit 1)	P50516	4113 Stathmin	P54227
3306 Cathepsin S	O70370	3506 Transferrin	P02787	4114 Ferritin heavy chain	P09528
3307 apolipoprotein A-I precursor	P15497	3507 Heat shock protein, 60 kDa (HSP-60)	P19226	4200 Epididymal secretory protein	Q920J0
3308 Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	P04897	3508 Heat shock protein, 60 kDa (HSP-60)	P19226	4201 Epididymal secretory protein	Q920J0
3309 Actin gamma	P02571	3509 Tubulin, alpha-6 chain	P05216	4201 Ferritin light chain 1	P29391
3309 Prohibitin	P24142	3510 Vimentin	P20152	4202 Ferritin heavy chain	P09528
3310 antitrypsin	P34955	3511 Protein disulfide isomerase A6 precursor (calcium-binding protein 1; CABP1)	Q63081	4203 Adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	P08030
3310 Prohibitin	P24142	3512 ATP synthase beta chain (F-type ATPase)	P10719	4204 Peroxiredoxin 3 (thioredoxin-dependant peroxide reductase)	P20108
3310 Putative 12832533	BAB22149	3513 Tubulin, beta-5 chain	P05218	4205 Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	CAB42866
3310 Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (V-ATPase A subunit 1)	P50516	3514 Protein disulfide isomerase (PDI)	P09103	4206 Cathepsin S	O70370
3312 Actin beta	P02570	3515 Beta hexosaminidase, alpha chain	P29416	4206 major outer membrane lipoprotein I	Q08085
3312 Actin gamma	P02571	3516 Beta hexosaminidase, alpha chain	P29416	4300 Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)	P29354
3313 Cathepsin D	P18242	3517 Beta hexosaminidase, alpha chain	P29416	4301 Peroxiredoxin 3 (thioredoxin-dependant peroxide reductase)	P20108
3314 Cathepsin B	P10605	3518 Beta hexosaminidase, alpha chain	P29416	4301 Voltage-dependant anion-selective channel protein 1 (VDAC-1)	Q60932
3315 Cathepsin B	P10605	3600 Endoplasmic	P08113	4302 Peroxiredoxin 1-CYS (anti-oxidant protein 2; acidic calcium independant phospholipase A2)	NP_031476
3316 Cathepsin B	P10605	3601 BIP (glucose-related protein, GRP 78)	P20029	4303 major outer membrane lipoprotein I	Q08085
3317 Cathepsin B	P10605	4000 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	4303 Proteasome subunit beta type 3	NP_036101
3318 alpha-antiproteinase precursor	P18242	4001 Cytochrome P450	Q06766	4304 Peroxiredoxin 4 (thioredoxin peroxidase A0372)	O08807
3318 Cathepsin D	P18242	4001 Ubiquitin	P02248	4305 GAG-POL polyprotein	387153
3318 Vimentin	P20152	4002 GAG protein	387153	4306 major outer membrane lipoprotein I	Q08085
3400 Annexin 5	P48036	4003 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	4307 ERP29	P52555

4307 Putative 12836245	BAB23570	4507 Beta-glucuronidase	P12265	5301 Phosphoglycerate mutase, brain form (PGAM-B)	P25113
4307 TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)	P50592	4508 Beta-glucuronidase	P12265	5302 major outer membrane lipoprotein I	Q08085
4308 Cathepsin D	P18242	4509 Beta-glucuronidase	P12265	5303 Putative 12833245	BAB22451
4309 alpha-antiproteinase precursor	P97277	4510 Protein disulfide isomerase A3 (Disulfide isomerase ER-60)	P27773	5304 GAG protein	387153
4309 Cathepsin D	P18242	4511 T-complex protein 1, epsilon subunit (TCP-1-epsilon)	P80316	5305 Syntenin (scaffold protein PBP1)	NP_058087
4310 (clone RV-DBA/2- aged) GAG	387153	4512 T-complex protein 1, beta subunit (TCP-1-beta)	P80314	5306 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531
4310 alpha-antiproteinase precursor	P97277	4513 Coronin-like protein p57	P31146	5307 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531
4311 alpha-2-macroglobulin	Q61838	4514 T-complex protein 1, alpha subunit B (TCP-1-alpha)	P11983	5400 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531
4311 alpha-antiproteinase precursor	P97277	4515 Heat shock protein, 60 kDa (HSP-60)	P19226	5401 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531
4311 Cathepsin D	P18242	4516 Enolase alpha	P17182	5402 Annexin 2	P07356
4314 alpha-2-macroglobulin	Q61838	4517 Beta hexosaminidase, beta chain	P20060	5402 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531
4314 alpha-antiproteinase precursor	P97277	4518 Beta hexosaminidase, beta chain	P20060	5403 BSA	P02769
4314 Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subunit A isoform 3 (V-ATPase 116-kDa isoform A3)	Q13488	4519 Actin-like protein 3	P32391	5404 MPS1	I52603
4315 (clone RV-DBA/2- aged) GAG	387153	4520 Vacuolar ATP synthase subunit B (V-ATPase B subunit 2)	P50517	5405 Macrophage capping protein	P24452
4315 alpha-2-macroglobulin	Q61838	4521 Vacuolar ATP synthase subunit B (V-ATPase B subunit 2)	P50517	5406 MPS1	I52603
4315 alpha-antiproteinase precursor	P97277	4522 Vacuolar ATP synthase subunit B (V-ATPase B subunit 2)	P50517	5407 MPS1	I52603
4315 antitrypsin	P34955	4600 antitrypsin	P34955	5408 MPS1	I52603
4316 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531	4601 antitrypsin	P34955	5409 Arylsulfatase B (N-acetylgalactosamine-4-sulfatase)	P50429
4317 (clone RV-DBA/2- aged) GAG	387153	4602 antitrypsin	P34955	5410 MPS1	I52603
4318 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531	4603 antitrypsin	P34955	5411 MPS1	I52603
4319 F-actin capping protein beta subunit (CAPZ beta)	P47757	4604 antitrypsin	P34955	5412 Flotillin	O08917
4320 Coronin-like protein p57	P31146	4605 antitrypsin	P34955	5413 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531
4320 GRB2-related adaptor protein 2 (GADS protein)	Q63059	5000 GAG protein	387153	5414 Aldose reductase (AR)	P45376
4400 Guanine nucleotide-binding protein G(IYG(S)YG(T), beta subunit 2)	P54312	5001 GAG protein	387153	5500 Vesicular-fusion protein NSF	P46460
4401 Guanine nucleotide-binding protein G(IYG(S)YG(T), beta subunit 1)	P04901	5002 GAG protein	387153	5501 Enolase alpha	P17182
4403 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531	5003 albumin	P02769	5502 Beta hexosaminidase, beta chain	P20060
4404 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531	5003 alpha-globin	CAA23748	5600 Alix	O88695
4405 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531	5003 Polyubiquitin (fragment)	Q28169	6000 GAG protein	387153
4406 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531	5004 Heat shock protein, 10 kDa (HSP10)	Q64433	6000 hemoglobin a chain	P01966
4407 Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531	5100 Mitogen activated protein 1, binding protein (MEK binding partner 1)	NP_064304	6100 Nucleoside diphosphate kinase B (NDK-B)	Q01768
4408 Legumain	O89017	5101 Transthyretin	P02766	6101 Epididymal secretory protein	Q9Z0J0
4409 Cathepsin D	P18242	5102 alpha-antiproteinase precursor	P97277	6101 Modified LacZ	208984
4410 Cathepsin D	P18242	5103 Nucleoside diphosphate kinase A (NDK-A)	P15532	6102 Transthyretin	P02766
4411 Cathepsin D	P18242	5104 alpha-antiproteinase precursor	P97277	6200 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675
4412 dnaK-type molecular chaperone hsc70	A45935	5105 antitrypsin	P34955	6201 Beta-galactosidase	Q59750
4413 Cathepsin D	P18242	5106 Peptidylprolyl isomerase A (PPIase; Cyclophilin A)	P17742	6201 Epididymal secretory protein	Q9Z0J0
4500 dnaK-type molecular chaperone hsc70	A45935	5107 Histone H2b	I48401	6300 Vacuolar ATP synthase subunit E (V-ATPase E subunit)	P50518
4501 Actin-like protein 3	P32391	5107 Stromal cell derived factor receptor 2	NP_033172	6301 Deoxyribonuclease II	P56542
4502 Bovine Serum Albumin	Q7M3A0	5108 Transthyretin	P02766	6400 MPS1	I52603
4503 Bovine Serum Albumin	Q7M3A0	5200 Cathepsin A (lysosomal protective protein) (cathepsin A)	P16675	6401 MPS1	I52603
4504 Bovine Serum Albumin	Q7M3A0	5201 Deoxyribonuclease II	P56542	6500 Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1)	P40124
4505 Beta-glucuronidase	P12265	5202 Voltage-dependant anion-selective channel protein 1 (VDAC-1)	Q60932	7100 Modified LacZ	208984
4506 Beta-glucuronidase	P12265	5300 Proteasome subunit alpha type 6	Q9QUM9	7200 Peroxiredoxin 1 (thioredoxin peroxidase 2)	P35700
		5301 major outer membrane lipoprotein I	Q08085	7300 Vacuolar ATP synthase subunit E (V-ATPase E subunit)	P50518

7301 Galectin-3	P16110
7400 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P16858
8500 Elongation factor 1-alpha 1	P10126

Protein	Accession number	Remarks	Protein	Accession number	Remarks
Cytoskeleton			Heat shock-related protein 2, 70 kDa (HSP-70.2)	P17156	In cooperation with other chaperones, HSP70s stabilize preexistent proteins against aggregation and mediate the folding of newly translated polypeptides in the cytosol as well as within organelles. These chaperones participate in all these processes through their ability to recognize nonnative conformations of other proteins. They bind extended peptide segments with a net hydrophobic character exposed by polypeptides during translation and membrane translocation, or following stress-induced damage. Belongs to the heat shock protein 70 family
Actin alpha-cardiac	I49465	Involved in cell motility.	Heat shock-related protein, 70 kDa	P16627	Belongs to the heat shock protein 70 family
Actin beta	P02570	Cytoskeletal proteins.	Prohibitin	P24142	Inhibits DNA synthesis. Has a role in regulating proliferation. Act as a membrane bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins.
Actin gamma	P02571	Cytoskeletal proteins.	Protein disulfide isomerase (PDI)	P09103	Rearrangement of both intrachain and interchain disulfide bonds in proteins to form the native structures.
Actin-like protein 3	P32391	Part of a complex implicated in the control of actin polymerization in cells	Protein disulfide isomerase A3 (Disulfide isomerase ER-60)	P27773	Rearrangement of both intrachain and interchain disulfide bonds in proteins to form the native structures.
Coronin-like protein p57	P31146	May play a role in the signal transduction pathways of chemotaxis. Bind actin.	Protein disulfide isomerase A6 precursor (calcium-binding protein 1, CABP1)	Q63081	Rearrangement of both intrachain and interchain disulfide bonds in proteins to form the native structures.
F-actin capping protein beta subunit (CAPZ beta)	P47757	Bind in a Ca(2+)-independant manner to the fast growing ends of actin filaments thereby blocking the exchange of subunits at these ends. Do not sever actin filaments.	Reticulocalbin 1	O70341	May regulate calcium-dependant activities in the endoplasmic reticulum lumen or post-ER compartment.
Macrophage capping protein	P24452	Calcium-sensitive protein which reversibly blocks the barbed ends of actin filaments but does not sever preformed actin filaments. May play a role in regulating cytoplasmic structures through potential interactions with actin. Belongs to the villin/gelsolin family	T-complex protein 1, alpha subunit B (TCP-1-alpha)	P11983	Molecular chaperone assisting the folding of proteins upon ATP hydrolysis. Known to play a role, in vitro, in the folding of actin and tubulin.
Myosin regulatory light chain 2, brain RAP-2B	S45709	Plays an important role in regulation of both smooth muscle and nonmuscle cell contractile activity.	T-complex protein 1, beta subunit (TCP-1-beta)	P80314	Molecular chaperone assisting the folding of proteins upon ATP hydrolysis. Known to play a role, in vitro, in the folding of actin and tubulin.
Tropomyosin 5	P21107	Function not clear.	T-complex protein 1, epsilon subunit (TCP-1-epsilon)	P80316	Molecular chaperone assisting the folding of proteins upon ATP hydrolysis. Known to play a role, in vitro, in the folding of actin and tubulin.
Tubulin, alpha-6 chain	P05216	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a nonexchangeable site on the alpha chain.	Proteases		
Tubulin, beta-5 chain	P05218	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a nonexchangeable site on the alpha chain.	Cathepsin A (lysosomal protective protein)	P16675	Appears to be essential for both activity of beta-galactosidase and neuraminidase. Associates with these enzymes and exerts a protective function necessary for their stability and activity. Belong to the peptidase family S10, serine carboxypeptidase family.
Vimentin	P20152	Class III intermediate filaments found in various nonepithelial cells. Belongs to the intermediate filament family.	Cathepsin B	P10605	Lysosomal protease which is believed to participate in intracellular degradation and turnover of proteins. Belongs to peptidase family C, papain family of thiol protease.
Chaperones			Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I)	P53634	Lysosomal thiol protease. Has dipeptidylpeptidase activity. Can degrade glucagon. Belongs to peptidase family C, papain family of thiol protease.
BIP (glucose-related protein, GRP 78)	P20029	Probably plays a role in facilitating the assembly of multimerc protein complexes inside the ER. Belongs to the heat shock protein 70 family	Cathepsin D	P18242	Lysosomal acid protease active in intracellular protein breakdown. Belong to peptidase family A1, aspartyl proteases family.
Calnexin	P35564	Retains incorrectly folded glycoproteins in the ER.	Cathepsin L	P06797	Important for the overall degradation of proteins in lysosomes. Belongs to peptidase family C1, papain family of thiol proteases.
Calreticulin	P14211	ER chaperone. Also found in T cell lytic granules.	Cathepsin S	O70370	Lysosomal protease. Belongs to peptidase family C1, papain family of thiol proteases.
Cyclophilin A (peptidylprolyl isomerase A, PPIase)	P17742	Accelerates the folding of protein by a cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides. Binds cyclosporin A which mediates some of its effects by an inhibitory action on PPIase. Belongs to the cyclophilin-type PPIase family.	Cathepsin Z	Q9WU07	Lysosomal protease. Belongs to peptidase family C1, papain family of thiol proteases.
dnaK-type molecular chaperone hsc70	A45935	Cytoplasmic chaperone.	Gamma-interferon lysosomal thiol reductase	P13284	Cleaves disulfide bonds in proteins by reduction. May facilitate the complete unfolding of proteins destined for lysosomal degradation. May be involved in MHC class II-restricted antigen processing.
Endoplasmic	P08113	Molecular chaperone that functions in the processing and transport of secreted proteins. Belongs to the HSP 90 family	Legumain	O89017	Hydrolysis of proteins and small-molecule substrates at -Asn-1-Xaa-bonds. Belongs to peptidase family C13, hemoglobinase family.
ERP29	P52555	Endoplasmic reticulum protein playing an important role in the processing of secretory proteins within the ER.	Serine carboxypeptidase e I	P07519	May be involved in the degradation of small peptides (2-5 residues) or in the degradation of storage protein in the embryo. Belongs to peptidase family S10, serine carboxypeptidase family.
Heat shock cognate protein, 71 kDa	P08109	Belongs to the heat shock protein 70 family.	Lipases		
Heat shock protein beta, 90 kDa (HSP 90-beta)	P11499	Molecular chaperone. Has ATPase activity. Belongs to the heat shock protein 90 family.	Lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase (LAL)	P38571	Lysosomal protein crucial for the intracellular hydrolysis of cholesteryl esters and triglycerides that have been internalized via endocytosis of lipoprotein particules.
Heat shock protein, 10 kDa (HSP10)	Q64433	Eukaryotic CPN10 homolog which is essential for mitochondrial protein biogenesis, together with CPN60. Belongs to the groes chaperonin family	Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	O88531	Removes thioester-linked fatty acyl groups such as palmitate from modified cysteine residues in proteins or peptides during lysosomal degradation.
Heat shock protein, 60 kDa (HSP-60)	P19226	Implicated in mitochondrial protein import and macromolecular assembly. May facilitate the correct folding of imported proteins. May also prevent misfolding and promote refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions in the mitochondrial matrix. It interacts with p21RAS. Belongs to the chaperonin (HSP60) family			

Lipid binding			Ubiquitin	P02248	Involved in the ATP-dependant selective degradation of cellular proteins, the maintenance of chromatin structure, the regulation of gene expression, the stress response, and ribosome biogenesis.
Fatty acid-binding protein, epidermal (E-FABP)	Q05816	High specificity for fatty acids. Highest affinity for C18 chain length.	Ubiquitin-conjugated enzyme E2-17 kDa	Q16781	Catalyses the covalent attachment of ubiquitin to other proteins.
Glycosyl hydrolases			Ubiquitin-conjugating enzyme E2, 25 kDa (ubiquitin-protein ligase, huntingin interacting protein 2, HIP-2)	P27924	Catalyses the covalent attachment of ubiquitin to other proteins. Mediates the selective degradation of short-lived and abnormal proteins. Ubiquitinates huntingin.
Beta hexosaminidase, alpha chain	P29416	Responsible for the degradation of GM2 gangliosides, and a variety of other molecules containing terminal N-acetyl hexoamines, in the brain and other tissues. Belongs to family 20 of glycosyl hydrolases.	Acidification		
Beta hexosaminidase, beta chain	P20060	Responsible for the degradation of GM2 gangliosides, and a variety of other molecules containing terminal N-acetyl hexoamines, in the brain and other tissues. Belongs to family 20 of glycosyl hydrolases.	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (V-ATPase A subunit 1)	P50516	Catalytic subunit of the peripheral V1 complex of vacuolar ATPase. V-ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells. Belongs to the ATPase alpha/beta chains family.
Beta-galactosidase	Q59750	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-galactose residues in beta-D-galactosides.	Vacuolar ATP synthase subunit B (V-ATPase B subunit 2)	P50517	Noncatalytic subunit of the peripheral V1 complex of vacuolar ATPase. V-ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells. Belongs to the ATPase alpha/beta chains family.
Beta-glucuronidase	P12265	Lysosomal protein playing an important role in the degradation of dermatan and keratan sulfates. Belongs to family 2 of glycosyl hydrolases.	Vacuolar ATP synthase subunit D (V-ATPase D subunit)	P51863	Subunit of the integral membrane V0 complex of vacuolar ATPase. V-ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells. Belongs to the V-ATPase V0D/AC39 subunit family.
Enolase alpha	P17182	Glycolysis of 2-phospho-D-glycerate in phosphoenolpyruvate.	Vacuolar ATP synthase subunit E (V-ATPase E subunit)	P50518	Subunit of the peripheral V1 complex of vacuolar ATPase essential for assembly or catalytic function. V-ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells. Belongs to the V-ATPase E subunit family.
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P16858	First step in the second phase of glycolysis.	Vacuolar ATP synthase subunit F (V-ATPase F subunit)	P50408	Subunit of the peripheral V1 complex of vacuolar ATPase essential for assembly or catalytic function. V-ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells. Belongs to the V-ATPase F subunit family.
Lysosomal alpha mannosidase	7305299	Necessary for the catabolism of N-linked carbohydrates released during glycoprotein turnover.	Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subunit A isoform 3 (V-ATPase 116-kDa isoform A3)	Q13488	Part of the proton channel of V-ATPases. Seems to be directly involved in T cell activation. Belongs to the V-ATPase 116 kDa subunit family.
Sulfatases			Energy metabolism		
Arylsulfatase B (N-acetylgalactosamine-4-sulfatase)	P50429	Hydrolysis of the 4-sulfate groups of the N-acetyl-D-galactosamine 4-sulfate units of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. Belongs to the sulfatase family.	ATP synthase beta chain (F-type ATPase)	P10719	Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane. Catalytic subunit.
Phosphoglycerate mutases			ATP synthase delta chain (F-type ATPase)	P35434	Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane.
Phosphoglycerate mutase, brain form (PGAM-B)	P25113	Interconversion of 3- and 2-phosphoglycerate with 2,3-bisphosphoglycerate as the primer of the reaction. Can also catalyse the reaction of EC 5.4.2.4 (synthase) and EC 3.1.3.13 (phosphatase), but with a reduced activity. Belongs to the phosphoglycerate mutase family.	Cytochrome B5	P56395	Membrane bound hemoprotein which functions as an electron carrier for several membrane bound oxygenases. Involved in several steps of the sterol biosynthesis pathway.
Iron binding			Cytochrome P450	Q06766	Heme-thiolate monooxygenases. Involved in a NADPH-dependant electron transport pathway. Oxidize compounds.
Ferritin heavy chain	P09528	Stores iron in a soluble, non toxic, readily available form.	Nucleoside diphosphate kinase A (NDK-A)	P15532	Major role in the synthesis of nucleoside triphosphates other than ATP.
Ferritin light chain 1	P29391	Stores iron in a soluble, non toxic, readily available form.	Nucleoside diphosphate kinase B (NDK-B)	Q01768	Major role in the synthesis of nucleoside triphosphates other than ATP.
Ferritin light chain 2	P49945	Stores iron in a soluble, nontoxic, readily available form.	Redoxproteins		
Transferrin	P02787	Iron binding transport proteins which can bind two atoms of ferric iron in association with the binding of an anion, usually bicarbonate. It is responsible for the transport of iron from sites of absorption and heme degradation to those of storage and utilization. Serum transferrin may also have a further role in stimulating cell proliferation.	Aldose reductase (AR)	P45376	Catalyses the NADPH-dependant reduction of a wide variety of carbonyl-containing compounds to their corresponding alcohols.
Proteasome			Peroxioredoxin 1 (thioredoxin peroxidase 2)	P35700	Reduces peroxides with reducing equivalents provided through the thioredoxin system. May play an important role in eliminating peroxides generated during metabolism. Might participate in the signaling cascades of growth factors and TNF-alpha by regulating the intracellular concentration of H(2)O(2). Belongs to the AHPC/TSA family.
Polyubiquitin (fragment)	Q28169	Involved in the ATP-dependant selective degradation of cellular proteins, the maintenance of chromatin structure, the regulation of gene expression, the stress response, and ribosome biogenesis.			
Proteasome subunit alpha type 6	Q9QUM9	Part of a multicatalytic proteinase complex. Involved in an ATP/ubiquitin-dependant non-lysosomal proteolytic pathway.			
Proteasome subunit beta type 3	NP_036101	Part of a multicatalytic proteinase complex. Involved in an ATP/ubiquitin-dependant non-lysosomal proteolytic pathway.			

Peroxiredoxin 2 (thioredoxin peroxidase 1)	Q61171	Reduces peroxides with reducing equivalents provided through the thioredoxin system. May play an important role in eliminating peroxides generated during metabolism. Might participate in the signaling cascades of growth factors and TNF- α by regulating the intracellular concentration of H ₂ O ₂ . Belongs to the AHPC/TSA family.	Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	CAB42866	Secreted glycoprotein that inhibit cell growth and/or promote differentiation.
Peroxiredoxin 3 (thioredoxin-dependant peroxide reductase)	P20108	Protects radical-sensitive enzymes from oxidative damage by a radical-generating system. Belongs to the AHPC/TSA family.	Cyclophilin C-associated protein (CyCAP)	A48231	A normal secreted glycoprotein that down-modulates endotoxin and proinflammatory responses in vivo. Member of the scavenger-receptor cystein-rich domain superfamily, 69% identical to the human Mac-2 binding superfamily.
Peroxiredoxin 4 (thioredoxin peroxidase A0372)	O08807	Regulates the activation of NF-KAPPA-B in the cytosol by a modulation of I-KAPPA-B-ALPHA phosphorylation. Belongs to the AHPC/TSA family	G18.2 protein	NP_071390	Interacts and contributes to the functional activity of G(I) alpha proteins.
Superoxide dismutase (Cu-Zn)	P08228	Destroys radicals which are normally produced within the cells and are toxic to biological systems.	Galectin-1	P16045	Binds beta-galactoside. May act as an autocrine negative growth factor that regulates cell proliferation
Lipid rafts			Galectin-3	P16110	MAC-2, laminin-binding protein. Galactose-specific lectin which binds IgE. Highest levels in activated macrophages. Involved in apoptosis
Annexin 2	P07356	Calcium-regulated membrane-binding protein whose affinity for calcium is greatly enhanced by anionic phospholipids	GRB2-related adaptor protein 2 (GADS protein)	Q63059	Interacts with SLP-76 to regulate NF-AT activation. Binds to tyrosine-phosphorylated SHC.
Calcium binding protein A6 (calyculin)	NP_035443	Seems to interact with annexin II and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a calcium-dependant manner.	Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)	P29354	Associates with tyrosine-phosphorylated proteins. Also interacts with Ras in the signaling pathway leading to DNA synthesis.
Flotillin	O08917	May act as a scaffolding protein within caveolar membranes, functionally participating in formation of caveolae or caveolae-like vesicles.	Guanine nucleotide-binding protein G(I), alpha-2 subunit	P04897	Involved as modulators or transducers in various transmembrane signaling systems
Vesicular transport			Guanine nucleotide-binding protein G(I)G(S)G(T), beta subunit 1	P04901	G proteins are involved as modulators or transducers in various transmembrane signaling systems. The beta and gamma chains are required for the GTPase activity, for replacement of GDP by GTP, and for G protein-effector interaction.
ABC transporter	O70595	ATP-binding cassette transporters are cellular transmembrane transport proteins. Involved in cellular lipid trafficking.	Guanine nucleotide-binding protein G(I)G(S)G(T), beta subunit 2	P54312	G proteins are involved as modulators or transducers in various transmembrane signaling systems. The beta and gamma chains are required for the GTPase activity, for replacement of GDP by GTP, and for G protein-effector interaction.
RAB-1 A	P05711	Probably required for transit of protein from the ER through Golgi compartment.	Lymphocyte antigen 86 (MD-1)	NP_034875	Associate physically with RP105 and promote its expression. Could play a role in growth promoting signal.
RAB-1 B	P10536	Probably required for transit of protein from the ER through Golgi compartment.	Mitogen activated protein I, binding protein (MEK binding partner 1)	NP_064304	Enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade.
RAB-15	P35289	May act in concert with RAB3A in regulating aspects of synaptic vesicle membrane flow within the nerve terminal.	Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) (RKIP)	P30086	Binds phosphatidylethanolamine. Has lower affinity for phosphatidylinositol and phosphatidylcholine. Interacts with Raf-1 and seems to inhibit it. Belongs to the phosphatidylethanolamine-binding protein family.
RAB-7	P51150	Regulates late endocytic/phagocytic trafficking.	RHO GDP-dissociation inhibitor 1 (RHO GDI 1)	P19803	Regulates the GDP/GTP exchange reaction of the RHO proteins by inhibiting the dissociation of GDP from them, and the subsequent binding of GTP to them.
Soluble NSF attachment protein alpha (SNAP-alpha)	P54921	Required to prepare intracellular membranes for fusion.	Stathmin	P54227	Involved in the regulation of the microtubules filament system by destabilizing microtubules. It prevents assembly and promotes disassembly of microtubules. Binds to two alpha/beta-tubulin heterodimers. Is phosphorylated by MAPK in response to NGF.
Soluble NSF attachment protein gamma (SNAP-gamma)	Q99747	Required to prepare intracellular membranes for fusion.	Stromal cell derived factor receptor 2	NP_033172	Chemoreceptor for stromal cell factor which promotes growth.
Syntenin (scaffold protein PBP 1)	NP_058087	Localized in early endocytic compartments	Sulfated glycoprotein 1 precursor (SGP-1, prosaposin)	Q61207	Extracellular sphingolipid activator protein.
Vesicular-fusion protein NSF	P46460	Required for vesicles-mediated transport. Catalyses the fusion of transport vesicles within the golgi cisternae. Is also required for transport from the ER to the golgi stack. Seem to function as a fusion protein required for the delivery of cargo proteins to all compartments of the golgi stack independant of vesicle origin. Belongs to the AAA family of ATPases.	Apoptosis		
Voltage-dependant anion-selective channel protein 1 (VDAC-1)	Q60932	Forms a channel through the mitochondrial outer membrane and also the plasma membrane. The channel allows diffusion of small hydrophilic molecules; it adopts an open conformation at low or zero membrane potential and a closed conformation at potentials above 30-40 mV. The open state has a weak anion selectivity whereas the closed state is cation-selective. Belongs to the eukaryotic mitochondrial porin family.	14-3-3	P35215	Involved in exocytosis through actin interaction.
Signal transduction			Alix	O88695	Programmed cell death 6-interacting protein. Implicated in apoptosis, with ALG-2.
Adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	P08030	Catalyses a salvage reaction resulting in the formation of AMP.	Annexin 5	P48036	Amount bound to phagosomes stays approximately the same as the phagosome matures.
Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1)	P40124	May have a regulatory bifunctional role. Belongs to the CAP family.	TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)	P50592	Induces apoptosis. Type II membrane protein.
Beta-interferon-induced protein	JC1241	Induction by beta-interferon, potentially an integral membrane protein.	Putative		
			EST 1538929	W89611	Unknown protein.

EST 2720177	AA710259	Unknown protein.	Epididymal secretory protein	Q9Z0J0	Unknown function.
Hypothetical 20.7 KDA protein	Q9Y3L5	Belongs to the small GTPase superfamily, Ras family by similarity.	GAG protein	387153	N.A.
KIAA0175 gene product	NP_055606	Unknown protein kinase. Likely ortholog of maternal embryonic leucine zipper kinase.	Histone H2b	148401	Part of the nucleosome.
Putative 12832533	BAB22149	Related sequence to NADH-ubiquinone dehydrogenase chain C1.	Lamin B1	P14733	Component of the nuclear lamina.
Putative 12833245	BAB22451	Related sequence to pyrroline-5-carboxylate reductase.	Modified LacZ	208984	N.A.
Putative 12834709	BAB23012	Related sequence to cytochrome B5.	MPS1	I52603	Macrophage-specific protein. Upregulated during monocyte to macrophage differentiation.
Putative 12836245	BAB23570	Unknown protein (ERP29?)	Ribosomal protein P2	P42899	Plays an important role in the elongation step of protein synthesis.
Putative 12841285	BAB25145	Related Sequence to RIKEN cDNA 2010012O05 gene			
Putative 12844045	BAB26214	Unknown protein			
Putative 12852682	BAB29501	Related sequence to serine carboxypeptidase 1 precursor protein.			
Putative 12854958	BAB30178	Unknown protein			
Putative 559059	AAA51041	Related sequence to Gag.			
Riken cDNA 1500031N16 gene	AAH05712	Related sequence to mitochondrial 60S ribosomal protein L7/L12 precursor			
Blood related					
Albumin	P02769	Interact selectively with lipids			
Alpha-1-antitrypsin	P34955	Stop, prevent or reduce serine endopeptidase activity			
Alpha-1-inhibitor III	112893	N.A.			
Alpha-2-antiplasmin	P08697	Stop, prevent or reduce serine endopeptidase activity			
Alpha-2-macroglobulin	Q61838	Is able to inhibit all four classes of proteinases by a unique trapping mechanism.			
Alpha-antichymotrypsin	P01011	Plasma protein inhibiting cathepsin G and mast cell chymase.			
Alpha-globin	CAA23748	N.A.			
Antitrypsin	P34955	Serum proteins adsorbed on latex beads during internalization. Highly enriched in our preparations. Endocytic cargo.			
Apolipoprotein A-I	P15497	Involved in the movement of lipids			
C4BP alpha chain	S53711	Implicated in the activation of complement			
Hemoglobin alpha chain	P01966	Allow oxygen movement			
Kininogen, HMW I	KGHUH1	Involved in the modulation of blood pressure			
Kininogen, LMW I	KGHUL1	Involved in the modulation of blood pressure			
Transthyretin	P02766	Interact with lipids, especially steroids.			
Others					
Complement component 9		N.A.			
Elongation factor 1-alpha 1	P10126	Promotes the GTP-dependant binding of aminoacyl-TRNA to the A-site of ribosomes during protein biosynthesis.			

Table 3. Positive modulation of phagosomal proteins by interferon- γ

ID	Protein	Fold Stimulation
2500	Calreticulin	2
2503	Cyclophilin C-associated protein	2
2504	Cyclophilin C-associated protein	2
2505	Cyclophilin C-associated protein	2
2506	Cyclophilin C-associated protein	2
2508	Reticulocalbin 2 precursor	2
3101	Cathepsin D	2
3107	Putative 12844045 / Cytochrome B5	3
3201	Cyclophilin C-associated protein	2
3210	Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I)	2
3211	Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I)	2
3213	Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I)	2
3220	Cathepsin S / Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	2
3314	Cathepsin B	4
3315	Cathepsin B	4
3403	Cathepsin Z	2
3507	Heat shock protein, 60 kDa (HSP-60)	3
3508	Heat shock protein, 60 kDa (HSP-60)	3
3511	Protein disulfide isomerase A6 precursor (calcium-binding protein 1, CABP1)	2
3512	ATP synthase beta chain (F-type ATPase)	3
3514	PDI (ER-59)	3
3600	Endoplasmic	2
3601	BIP (glucose-related protein; GRP 78)	2
4201	Ferritin light chain 1 / Epididymal secretory protein	3
4202	Ferritin heavy chain	3
4203	Adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	2
4205	Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	2
4304	Peroxiredoxin 4 (thioredoxin peroxidase A0372)	3
4307	Putative 12836245 / TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) / ERP29	2
4308	Cathepsin D	2
4311	Cathepsin D	2
4320	Coronin-like protein p57 / GRB2-related adaptor protein 2 (GADS protein)	2
4413	Cathepsin D	2
4507	Beta-glucuronidase	2
4510	Protein disulfide isomerase A3 (Disulfide isomerase ER-60)	2
4511	T-complex protein 1, epsilon subunit (TCP-1-epsilon)	2
4512	T-complex protein 1, beta subunit (TCP-1-beta)	2
4514	T-complex protein 1, alpha subunit B (TCP-1-alpha)	2
4517	Beta hexosaminidase, beta chain	3
4521	Vacuolar ATP synthase subunit B (V-ATPase B subunit 2)	2
5100	Mitogen activated protein 1, binding protein (MEK binding partner 1)	2
5200	Cathepsin A (lysosomal protective protein)	2
5301	Phosphoglycerate mutase, brain form (PGAM-B)	2
5402	palmitoyl-protein thioesterase precursor (PPT) / Annexin II	3
6100	Nucleoside diphosphate kinase B (NDK-B)	2
7300	Vacuolar ATP synthase subunit E (V-ATPase E subunit)	4

Table 4. Functions of proteins positively modulated by interferon- γ

ID	Protein	Fold Stimulation
Proteases		
5200	Cathepsin A (lysosomal protective protein)	2
3314, 3315	Cathepsin B	4
3210, 3211, 3213	Cathepsin C (dipeptidyl peptidase I; DPP-I)	2
3101, 4308, 4311, 4413	Cathepsin D	2
3220	Cathepsin S / Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	2
3403	Cathepsin Z	2
Glycosyl hydrolases		
4517	Beta hexosaminidase, beta chain	3
4507	Beta-glucuronidase	2
Lipases		
5402	palmitoyl-protein thioesterase precursor (PPT) / Annexin II	3
Phosphoglycerate mutases		
5301	Phosphoglycerate mutase, brain form (PGAM-B)	2
Acidification		
4521	Vacuolar ATP synthase subunit B (V-ATPase B subunit 2)	2
7300	Vacuolar ATP synthase subunit E (V-ATPase E subunit)	4
Chaperones		
3601	BIP (glucose-related protein; GRP 78)	2
2500	Calreticulin	2
3600	Endoplasmic	2
3507, 3508	Heat shock protein, 60 kDa (HSP-60)	3
3514	PDI (ER-59)	3
4510	Protein disulfide isomerase A3 (Disulfide isomerase ER-60)	2
3511	Protein disulfide isomerase A6 precursor (calcium-binding protein 1, CABP1)	2
2508	Reticulocalbin 2 precursor	2
4514	T-complex protein 1, alpha subunit B (TCP-1-alpha)	2
4512	T-complex protein 1, beta subunit (TCP-1-beta)	2
4511	T-complex protein 1, epsilon subunit (TCP-1-epsilon)	2
Iron binding		
4202	Ferritin heavy chain	3
4201	Ferritin light chain 1 / Epididymal secretory protein	3
Signal transduction		
4203	Adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	2
4205	Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	2
2503, 2504, 2505, 2506, 3201	Cyclophilin C-associated protein	2
5100	Mitogen activated protein 1, binding protein (MEK binding partner 1)	2

Cytoskeleton

4320 Coronin-like protein p57 / GRB2-related adaptor protein 2 (GADS protein) 2

Energy metabolism

3512 ATP synthase beta chain (F-type ATPase) 3

6100 Nucleoside diphosphate kinase B (NDK-B) 2

Redox proteins

4304 Peroxiredoxin 4 (thioredoxin peroxidase A0372) 3

Putative

4307 Putative 12836245 / TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) / ERP29 2

3107 Putative 12844045 / Cytochrome B5 3

Chapitre III: Discussion

La phagocytose est le mécanisme par lequel les cellules internalisent d'autres cellules tels des cellules apoptotiques et des pathogènes cellulaires afin de les dégrader dans le phagolysosome, un organelle jouant un rôle clé dans l'immunité. La destruction de microorganismes dans les phagolysosomes constitue un lien direct avec l'immunité innée, mais de nouveaux éléments, montrés au chapitre II et discutés ici, révèlent pour les phagocytes professionnels la capacité de jouer un rôle clé dans l'interaction entre les mécanismes de l'immunité innée et ceux de la réponse immunitaire adaptée.

La phagocytose est un processus clé de l'immunité innée

Chez les mammifères, au cours d'une infection par divers pathogènes, les cellules du système immunitaire tels les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques sont rapidement recrutées au site d'infection afin d'éliminer les microorganismes envahisseurs. Ces trois types de cellules font partie de la famille des phagocytes professionnels à cause de leur capacité à effectuer la phagocytose, un mécanisme clé dans l'immunité innée. La phagocytose mène à l'engouffrement des pathogènes dans des organelles appelés phagosomes. Ce processus d'internalisation assure l'élimination rapide des pathogènes du site d'infection et leur ségrégation dans des organelles membranaires séparés du cytoplasme. La phagocytose est un processus modulé par divers récepteurs à la surface des phagocytes qui reconnaissent des ligands à la surface des cellules destinées à être internalisées. Suite à la liaison de ces ligands avec les récepteurs, il s'ensuit une cascade de signalisation complexe au niveau de la membrane plasmique du phagocyte caractérisée morphologiquement par la réorganisation de l'actine corticale et l'élongation de pseudopodes qui origineraient de la membrane plasmique (Aderem et Underhill, 1999). Après avoir encerclé le microorganisme, la membrane se referme, scellant le pathogène dans un organelle nouvellement formé, le phagosome.

Les phagosomes nouvellement formés ne possèdent pas la capacité de tuer et dégrader les microorganismes. Ces propriétés sont plutôt acquises au cours d'un mécanisme complexe de maturation incluant des interactions coordonnées entre les phagosomes et divers organelles des voies endocytaires et biosynthétiques. La fusion initiale des phagosomes avec les endosomes précoces, suivie de fusions avec les endosomes tardifs et les lysosomes (Desjardins *et al.*, 1997) résulte en l'acquisition séquentielle d'hydrolases (Garin *et al.*, 2001) et l'élaboration d'un environnement hostile qui sera responsable au niveau des phagosomes de la mort et la dégradation du microorganisme internalisé. Toutes ces cascades d'événements, de l'internalisation à la maturation finale, font en sorte que la phagocytose représente un processus clé de l'immunité innée.

La phagocytose est un processus avantageux d'un point de vue évolutif

L'utilisation de la phagocytose comme première ligne de défense contre une variété de pathogènes, incluant des bactéries et parasites, a évolué à partir d'un processus initialement utilisé par des organismes unicellulaires pour la nutrition. En effet, les protozoaires tel *Amoeba* utilisent la phagocytose comme un mécanisme d'entrée des nutriments. Les bactéries internalisées par *Amoeba* se retrouvent chacune dans un phagosome comportant une machinerie protéique capable de les dégrader et de recycler les différentes composantes afin de fournir les constituants essentiels pour l'activité et la division cellulaire de cet organisme unicellulaire. Il est intéressant de noter que malgré qu'il soit difficile de parler de la phagocytose comme d'un processus immunitaire chez *Amoeba*, le fait demeure que l'internalisation de bactéries pour des besoins nutritionnels par un processus causant éventuellement la mort de ces bactéries constitue un élément important dans l'évolution d'un futur système immunitaire efficace. Donc, il n'est pas surprenant de constater que la phagocytose est un processus cellulaire qui fut gardé pendant l'évolution et utilisé par tous les organismes, de *Dictyostelium* à l'être humain.

La phagocytose permet d'effectuer un lien entre l'immunité innée et la réponse immunitaire adaptée

La phagocytose joue un rôle clé dans l'immunité innée. La mort des pathogènes dans les phagolysosomes et leur dégradation originalement prévue pour la réutilisation de leurs acides aminés, a produit un système idéal pour le traitement des antigènes exogènes et la génération de peptides pour la présentation sur les molécules du CMH. Les phagosomes sont des organelles efficaces pour le traitement et le chargement des peptides exogènes sur les molécules du CMH de classe II (Ramachandra *et al.*, 1999). La présentation des complexes peptide:CMH de classe II à la surface des phagocytes professionnels stimule la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et leur différenciation en CD4⁺ T_H1 ou T_H2, ce qui permet la sécrétion de différentes cytokines qui activeront ou inhiberont le développement des autres cellules du système immunitaire. Par exemple, des lymphocytes T_H1 sécrètent de l'interféron- γ qui active le potentiel cytotoxique des macrophages ainsi que des anticorps opsonisants ciblés contre des antigènes spécifiques de la surface des pathogènes circulants (Janeway *et al.*, 2001). On voit donc ici que la phagocytose permet à la fois d'augmenter l'immunité innée générale par la stimulation des macrophages via la stimulation des lymphocytes T CD4⁺ et de déclencher une réponse immunitaire adaptée spécifique par la sécrétion d'anticorps opsonisants.

Les résultats présentés dans l'article 1 du chapitre II permettent également de démontrer que la phagocytose possède la capacité d'activer la réponse immunitaire adaptée via la stimulation de lymphocytes T CD8⁺, les CD8⁺, également spécifiques aux antigènes portés par les pathogènes phagocytés. Ce nouveau concept démontré par les résultats de l'article 1 du chapitre II et discuté ici origine en grande partie d'une étude protéomique du phagosome effectuée dans le laboratoire et publiée en 2001 (Garin *et al.*, 2001). L'analyse

de phagosomes purifiés par une approche protéomique a révélé une complexité inattendue et indiqué que cet organelle est composé de plusieurs centaines de protéines (Garin *et al.*, 2001 ; Brunet *et al.*, 2003). Puisque la majorité des études publiées jusqu'à maintenant sur la phagocytose utilisaient 4 ou 5 marqueurs phagocytaires pour décrire la biogenèse des phagolysosomes et leur inhibition par divers pathogènes, l'identification de plus de 650 protéines par la protéomique allait probablement donner un nouvel aperçu sur les propriétés fonctionnelles de cet organelle. Malgré que la plupart des 150 premières protéines identifiées sur le phagosome, telles les hydrolases, les sous-unités de la pompe à proton vacuolaire (v-ATPase qui est responsable de l'acidification du phagosome) ou des protéines impliquées dans la fusion membranaire, étaient susceptibles d'être retrouvées dans un compartiment où les pathogènes sont tués et dégradés, plusieurs protéines inattendues furent également identifiées, incluant des protéines du RE (Garin *et al.*, 2001). La présence de protéines du RE alimente la possibilité que la présence de ce compartiment dans les préparations de phagosomes purifiés soit le résultat d'une contamination pendant les étapes de purification, ce qui avait déjà été proposé par le passé (Desjardins *et al.*, 1994a). Cependant, une analyse en profondeur en utilisant des techniques allant de l'immunobuvardage à l'immunofluorescence et la microscopie électronique a confirmé que le RE était un composant véritable de la membrane des phagosomes (Gagnon *et al.*, 2002). Des analyses subséquentes ont révélé de façon surprenante que le RE est recruté à la surface cellulaire pendant la phagocytose aux sites d'internalisation, où il fusionne directement avec la membrane plasmique, ce qui amène une source additionnelle de membranes pour la formation des phagosomes (Desjardins, 2003). Ce processus, appelé phagocytose médiée par le RE ("ER-mediated phagocytosis") est impliqué dans l'internalisation de billes de latex, via plusieurs types de récepteurs, ainsi que pour l'internalisation d'érythrocytes et de pathogènes incluant *Leishmania*, un parasite flagellé, et *Salmonella*, une bactérie.

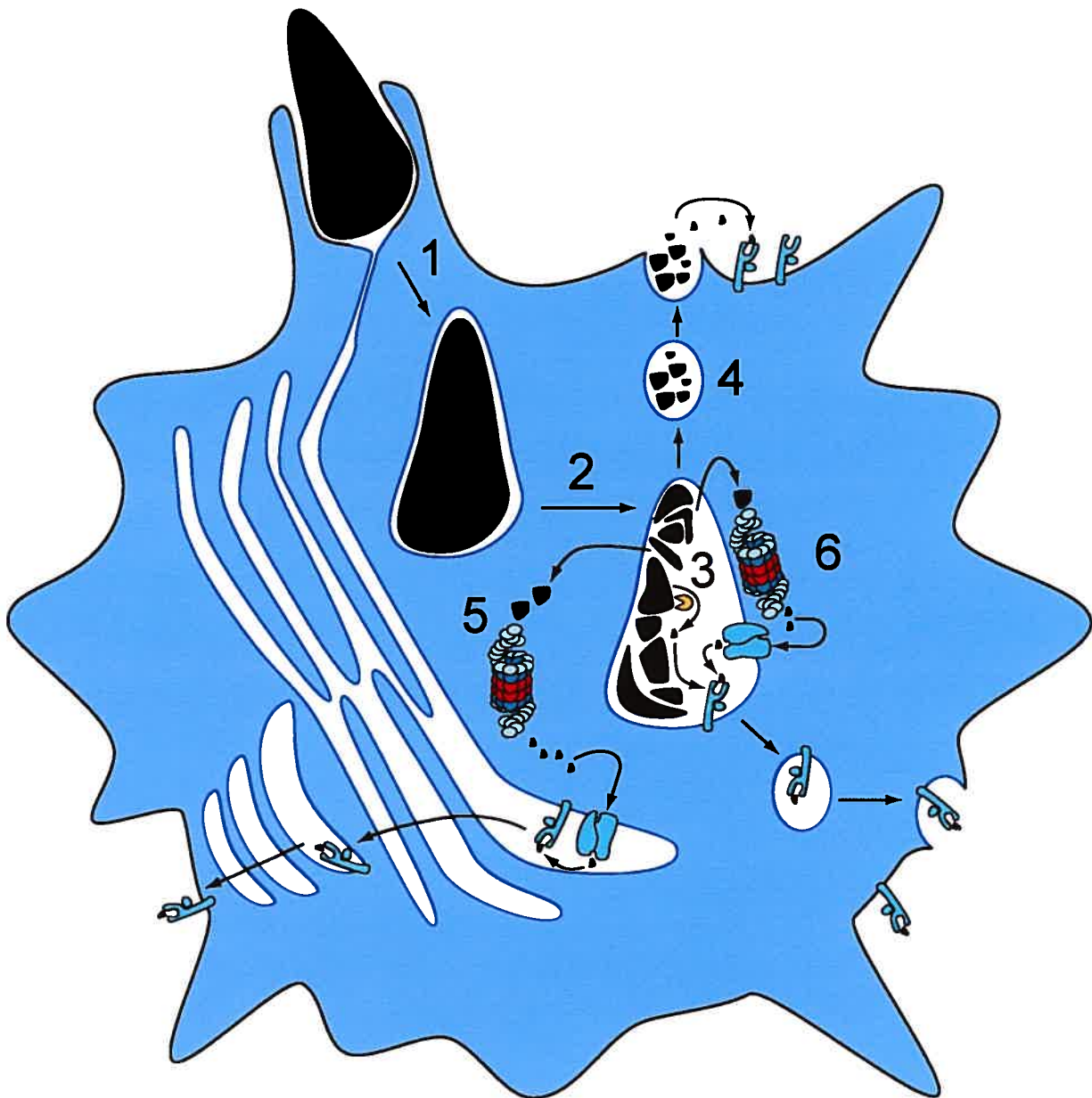


Figure 11. Modèles actuels de présentation croisée d'antigènes exogènes

1, Phagocytose d'un pathogène. **2**, Maturation des phagosomes. **3**, Dégradation du pathogène en protéines, fragment de protéines et peptides exogènes. **4**, Premier modèle de présentation croisée : la régurgitation de peptides et liaison au CMH de classe I de surface. **5**, Deuxième modèle de présentation croisée : la voie « phagosome-au-cytosol » où les protéines exogènes sont transloquées dans le cytoplasme et dégradées par les protéasomes. Les peptides générés sont transloqués dans le RE par le transporteur TAP et chargés sur le CMH de classe I, puis acheminés à la surface par la voie de sécrétion. **6**, Nouveau modèle de présentation croisée : auto-suffisance du phagosome pour toutes les étapes de la présentation croisée. Les protéines exogènes rétrotransloquées dans le cytoplasme sont dégradées par les protéasomes recrutés au phagosome, puis les peptides générés sont retransloqués à l'intérieur du phagosome pour être chargés sur le CMH de classe I. Le complexe est ensuite recyclé à la surface par une voie indépendante du Golgi.

La contribution inattendue du RE à la formation des phagosomes permet d'émettre la possibilité que ces organelles pourraient posséder la machinerie requise pour le traitement et le chargement de peptides exogènes sur les molécules du CMH de classe I (Desjardins, 2003), un processus appelé présentation croisée. Ce nouveau mécanisme décrit pour les phagosomes dans l'article 1 du chapitre II permet donc d'élaborer un nouveau modèle dans lequel la phagocytose permet non seulement de stimuler la réponse immunitaire adaptée via les lymphocytes T CD4⁺, mais également via les CD8⁺ (Figure 11). L'immunité innée et la réponse immunitaire adaptée sont donc intimement reliées avec la phagocytose comme pivot central de la liaison entre ces deux types de défense contre les pathogènes.

Un nouveau modèle de présentation croisée des antigènes exogènes au niveau du phagosome

La présentation croisée est un concept qui a été étudié intensivement au cours des dernières années. Depuis les premières observations sur la production de CD8⁺ spécifiques lors d'une infection par *Mycobacterium leprae* (Chiplunkar *et al.*, 1986) jusqu'à l'élaboration du modèle de la régurgitation des peptides exogènes (Harding *et al.*, 1994 ; Song *et al.*, 1996), suivi un peu plus tard du modèle de la voie "phagosome-au-cytosol" (Kovacs-Bankowski *et al.*, 1995), la présentation croisée est cependant demeurée un sujet controversé (Figure 11). La principale cause de la controverse réside dans le fait que les deux voies de présentation d'antigènes ont été décrites comme étant ségréguées dans des compartiments cellulaires différents, le RE/cytosol pour les antigènes endogènes et les endosomes/phagosomes pour la voie des antigènes exogènes. Pour le modèle de la régurgitation, il était difficile de concevoir que les hydrolases du phagosome pouvaient générer aussi efficacement que les protéasomes cytosoliques des peptides avec une séquence d'acides aminés de la bonne taille et de la bonne spécificité pour le CMH de

classe I. Il était également difficile de comprendre comment les peptides exogènes générés pouvaient atteindre un compartiment contenant le CMH de classe I, dans ce cas-ci la membrane plasmique. Malgré que le modèle de la voie “phagosome-au-cytosol” ait permis de démontrer que les antigènes exogènes pouvaient accéder au cytosol et être dégradés par les protéasomes en peptides spécifiques pour le CMH de classe I, et que ces peptides pouvaient ensuite accéder au compartiment où le chargement a lieu sur le CMH de classe I, soit le RE, il était difficile de concevoir comment les peptides exogènes pouvaient traverser une mer de cytosol pour atteindre le transporteur TAP tout en évitant la dégradation par les aminopeptidases cytosoliques et compétitionner ensuite avec les peptides endogènes beaucoup plus nombreux pour le transport par TAP et le chargement sur le CMH de classe I.

Dans les résultats présentés dans l'article 1 du chapitre II de cette thèse, une étude protéomique du phagosome révèle que tous les constituants requis pour la présentation croisée d'antigènes exogènes sont présents sur les phagosomes (Houde *et al.*, 2003). Le modèle de l'auto-suffisance des phagosomes pour la présentation croisée proposé ici répond à beaucoup de questions non résolues des deux modèles décrits précédemment. Dans le modèle que nous proposons, les événements moléculaires de la présentation croisée sont divisés en cinq étapes (Figure 12): (1) la rétrotranslocation des antigènes exogènes de la lumière des phagosomes au cytosol, (2) l'ubiquitination des antigènes exogènes dans le cytosol, (3) la dégradation par les protéasomes des antigènes exogènes dans le cytosol, (4) la retranslocation à l'intérieur des phagosomes des peptides exogènes générés et (5) le chargement à l'intérieur des phagosomes des peptides exogènes sur le CMH de classe I, puis le transport du complexe peptide:CMH de classe I à la surface. Des études parallèles à la nôtre au niveau de la translocation via TAP et du chargement des peptides sur le CMH de classe I ont également été réalisées par les groupes d'Amigorena (Guermonprez *et al.*, 2003) et de Cresswell (Ackerman *et al.*, 2003), et seront discutées ici avec nos résultats.

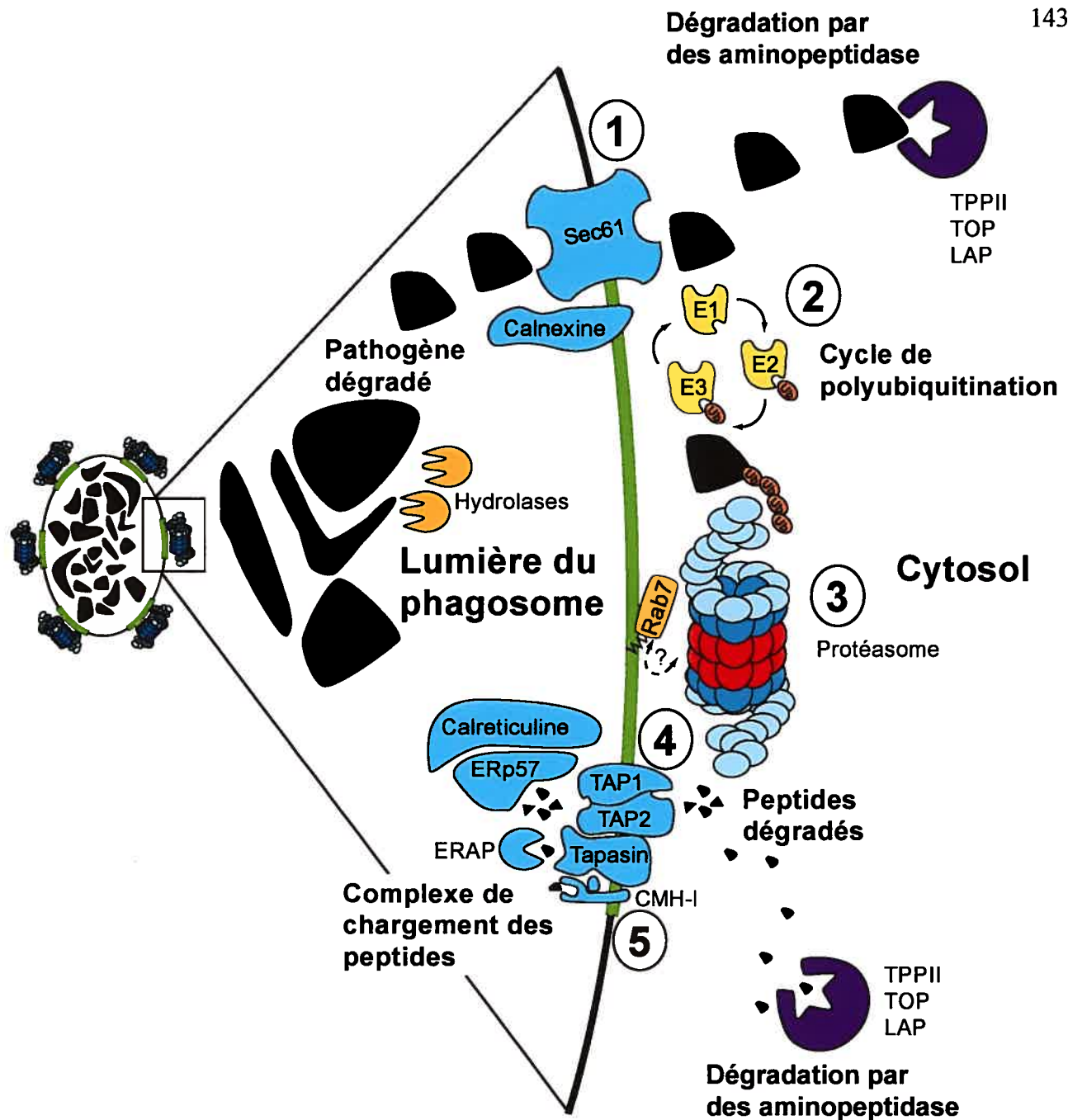


Figure 12. Modèle de l'auto-suffisance des phagosomes pour la présentation croisée d'antigènes exogènes

À gauche : Le phagosome recrute les protéasomes en des points focaux sur la membrane. À droite : Les hydrolases dégradent le pathogène en protéines ou fragments de protéine. 1, Certaines protéines sont rétrotransloquées par Sec61 au cytosol. 2, Les protéines sont polyubiquitinées. Les protéines s'éloignant de la membrane du phagosome sont dégradées par les aminopeptidases cytosoliques. 3, Le protéasome dégrade les protéines polyubiquitinées en peptides. Rab7 pourrait potentiellement interagir avec une sous-unité du protéasome. 4, Les peptides générés compétents pour la présentation sont reconnus par TAP phagosomiale et transloqués à l'intérieur du phagosome. Les peptides diffusant dans le cytosol sont dégradés par les aminopeptidases. 5, Les peptides sont pris en charge par le complexe de chargement des peptides du phagosome. L'aminopeptidase ERAP raccourcit les peptides présentant une extension N-terminale. Le complexe peptide:CMH de classe I est ensuite transporté à la surface.

La rétrotranslocation des antigènes exogènes

Malgré que la présentation croisée soit étudiée de façon intensive depuis quelques années, aucune protéine responsable du transport des protéines exogènes de la lumière du phagosome au cytosol n'a été identifiée. Le translocon Sec61 est suggéré ici comme un transporteur potentiel. Il a été bien établi que Sec61 joue un rôle important au niveau du RE dans la rétrotranslocation des protéines mal repliées de la lumière du RE au cytosol, ce qui permet l'ubiquitination de ces protéines et leur dégradation par le protéasome (Wiertz *et al.*, 1996 ; Tsai *et al.*, 2002). Ce mécanisme au niveau du RE est appelé ERAD ("Endoplasmic reticulum associated protein degradation") et joue un rôle essentiel dans le contrôle de qualité lors de la synthèse de protéines. Récemment, il a été démontré que le dépliement des protéines n'est pas un pré-requis pour la rétrotranslocation par Sec61 dans le RE (Tirosh *et al.*, 2003). Malgré que nous ne fournissions pas de preuves directes de la fonction de Sec61 sur le phagosome, nous y confirmons sa présence. Par ailleurs, des études ont montré que la toxine cholérique était exportée des microsomes par Sec61 (Hazes *et al.*, 1997 ; Schmitz *et al.*, 2000). Nos résultats démontrant que la phagocytose de billes de latex opsonisées avec la sous-unité A fluorescente de la toxine cholérique est suivie du transport de cette molécule de la lumière du phagosome au cytosol et indiquent que Sec61 semble être opérationnel pour la rétrotranslocation sur le phagosome.

L'ubiquitination des antigènes exogènes et le recrutement de protéasomes aux phagosomes

Les résultats présentés dans l'article 1 du chapitre II de cette thèse démontrent que des protéines ubiquitinées sont présentes à des points focaux sur la membrane des phagosomes purifiés. À titre d'exemple, un marquage de la protéine LAMP1, enrichie sur

le phagosome, révèle une localisation continue autour de la membrane, alors que pour les protéines ubiquitinées, ce marquage est ponctuel. Il est intéressant de constater que le recrutement de protéasomes aux phagosomes est observé, ainsi que la colocalisation de ces protéasomes recrutés avec les protéines ubiquitinées. Des études antérieures ont également démontré que les protéasomes pouvaient potentiellement interagir avec des membranes du RE (Brooks *et al.*, 2000). La formation de points focaux contenant des protéines ubiquitinées et des protéasomes sur les phagosomes est intéressante puisque cela pourrait signifier qu'aussitôt que les protéines exogènes sont rétrotransloquées, elles sont prises en charge par la machinerie d'ubiquitination et puis dégradées par les protéasomes (Figure 12). Ainsi, au lieu de se disperser dans une vaste mer de cytosol, les protéines exogènes et les peptides pourraient potentiellement être concentrés dans les mêmes régions ponctuelles sur le côté cytoplasmique des phagosomes, ce qui permettrait d'augmenter la concentration de protéines exogènes en comparaison avec les protéines endogènes. Une purification par affinité des protéines ubiquitinées provenant de phagosomes formés par des billes de latex couplées à l'OVA, suivi d'une analyse protéomique, montre la présence de peptides d'OVA dans la soupe de protéines ubiquitinées, ce qui signifie que l'OVA rétrotransloquée est bien ubiquitinée. Puisque les protéines ubiquitinées et les protéasomes associés aux phagosomes sont clairement du côté cytoplasmique de cet organelle, il sera intéressant dans le futur d'investiguer la nature de ces points focaux composés de protéines ubiquitinées et de protéasomes. Une purification des radeaux lipidiques ("lipid rafts"), connus pour donner un patron ponctuel en immunofluorescence, ne permet pas de détecter de protéasomes dans la fraction correspondant à ces radeaux lipidiques. Cela n'est pas surprenant puisqu'il a été démontré que le protéasome pouvait se dissocier lorsqu'on utilise certains détergents tels que ceux utilisés pour isoler les radeaux lipidiques (Cascio *et al.*, 2002). Il n'est pas exclu que les protéasomes puissent s'associer d'une façon quelconque à certains éléments des radeaux lipidiques, comme il n'est pas exclus que le patron ponctuel observé sur la membrane des phagosomes soit causé par autre chose que des radeaux lipidiques. En effet, il a été rapporté récemment que la sous-unité α XAPC7 du protéasome interagit

spécifiquement avec Rab7 sur les endosomes tardifs (Dong *et al.*, 2004). Puisque la cinétique de recrutement des protéasomes semble correspondre à celle de Rab7 lors de la maturation des phagosomes (Houde *et al.*, 2003 ; Desjardins *et al.*, 1997), et que Rab7 est détectée lors d'une électrophorèse non dénaturante du type "blue native" à un haut poids moléculaire se rapprochant de la localisation de sous-unités du protéasome sur le même type de gel (résultats non publiés ; Houde *et al.*, 2003), il se pourrait que Rab7 et le protéasome interagissent ensemble d'une quelconque façon. Il est également intéressant de noter que Rab7 n'est pas présente dans les radeaux lipidiques (Goyette *et al.*, résultats non publiés), ce qui irait dans la logique que le protéasome n'est pas détecté dans les radeaux lipidiques.

Une étude intéressante réalisée par le groupe de Neefjes (Reits *et al.*, 2003) sur la diffusion des peptides, leur protection et leur dégradation dans le cytoplasme et le noyau avant la présentation d'antigènes par le CMH de classe I a montré que les peptides bougent rapidement dans le cytosol et ont un temps limité pour trouver TAP. Cela signifie que la plupart des peptides sont perdus à cause de la dégradation par les aminopeptidases avant d'avoir la chance de trouver TAP. Cependant, l'étude montre que sous certaines conditions dans la cellule, comme pendant la mitose, les peptides peuvent être protégés de la dégradation en liant la chromatine. Il est possible que l'assemblage de la machinerie d'ubiquitination et le recrutement des protéasomes en des points focaux sur le côté cytoplasmique des phagosomes jouent un rôle similaire à la chromatine dans la protection contre les aminopeptidases cytosoliques et ainsi préviennent une trop forte compétition de la part des protéines endogènes pour la dégradation par les protéasomes.

Le lien manquant?

Malgré que les protéasomes n'aient pas été démontrés comme interagissant directement avec TAP ou Sec61 dans les cellules de mammifères, ils interagissent dans la levure avec l'ATPase AAA Cdc48 qui est, elle, liée à Sec61. Des homologues de Cdc48 existent dans les cellules de mammifères telle p97 et nous avons observé la présence de cette protéine sur le phagosome par protéomique (Houde et Desjardins, résultat non publié). Il n'a pas été rapporté jusqu'à maintenant que les protéasomes interagissaient directement avec p97, mais ils pourraient bien interagir avec un homologue non identifié qui favoriserait leur recrutement aux phagosomes en des points focaux, tout comme ils pourraient interagir avec Rab7 comme expliqué précédemment. Très récemment, une protéine nouvellement découverte, Derlin-1, a été démontrée comme aidant la protéine virale US11 du cytomégalovirus humain à disloquer le CMH de classe I de la membrane du RE (Lilley *et al.*, 2004). Derlin-1 étant l'homologue humain de la protéine Der1p de la levure, qui joue un rôle essentiel dans la dégradation de protéines mal repliées du RE, il se pourrait qu'elle joue un rôle dans la liaison entre la rétrotranslocation et la dégradation protéasomale puisqu'elle a été démontrée comme interagissant directement avec p97 pour la rétrotranslocation de protéines mal repliées. Il sera intéressant dans le futur de voir si Derlin-1 joue un rôle dans la présentation croisée.

La translocation par TAP des peptides exogènes et le complexe de chargement des peptides sur le CMH de classe I dans les phagosomes

Comme les phagosomes recrutent les protéasomes, qui ont été démontrés comme étant une machinerie enzymatique cruciale pour la génération de peptides compétents pour la présentation via le CMH de classe I (Goldberg *et al.*, 2002 ; Cascio *et al.*, 2001), un

complexe fonctionnel de chargement des peptides sur le CMH de classe I demeure également important si les phagosomes doivent être auto-suffisants pour la présentation croisée. Les phagosomes formés de membranes du RE contiennent une population restreinte de protéines du RE, incluant TAP, la tapasine, la calnexine, la calreticuline, le CMH de classe I, la β_2 microglobuline, ERp57 ainsi que ERAP (Garin *et al.*, 2001 ; Gagnon *et al.*, 2002 ; Houde *et al.*, 2003 ; Guermonprez *et al.*, 2003 ; Ackerman *et al.*, 2003). Un traitement avec l'EndoH montre qu'une partie du CMH de classe I du phagosome est sensible, ce qui indique qu'il n'a pas été modifié par les enzymes du Golgi médial (Ackerman *et al.*, 2003). Ackerman et ses collaborateurs ont également démontré que la tapasine et ERp57 forment un conjugué disulfide dans les phagosomes, ce qui correspond à ce qui a été observé dans le RE, et que ce complexe est associé avec TAP, démontrant ainsi que le complexe de chargement des peptides se forme correctement au niveau des phagosomes (Ackerman *et al.*, 2003). Comme il a été rapporté pour les macrophages (Houde *et al.*, 2003 et résultats non publiés ; Gagnon *et al.*, 2002), les protéines du RE des cellules dendritiques localisées sur les phagosomes disparaissent graduellement à mesure que les phagosomes mûrissent en phagolysosomes à l'exception de la calreticuline, Sec61 et la chaîne lourde du CMH de classe I qui demeurent stables (Guermonprez *et al.*, 2003 ; Ackerman *et al.*, 2003). Cela démontre que pendant les premières heures suivant l'internalisation et la formation des phagosomes, ces organelles recrutent la machinerie de translocation des peptides compétents pour le CMH de classe I. Cette fenêtre de temps correspond avec la rétrotranslocation de l'OVA au cytosol et la stimulation des CD8⁺ par le peptide SIINFEKL chargé sur le CMH de classe I (Houde *et al.*, 2003 ; Guermonprez *et al.*, 2003).

L'absence de TAP dans les macrophages ou les cellules dendritiques purifiées à partir de souris TAP^{-/-} abolit la stimulation des cellules T. Un essai fonctionnel (Ackerman *et al.*, 2003) démontre aussi que TAP phagosomal peut transporter des peptides du cytosol à la lumière, transport pouvant être bloqué par un peptide dérivé de la protéine ICP47 du

virus HSV connu pour posséder la propriété d'inhiber le transport par TAP (Galocha *et al.*, 1997 ; Neumann *et al.*, 1997). Ackerman et ses collègues ont également démontré que des antigènes exogènes internalisés par macropinocytose accèdent à un compartiment similaire contenant tous les éléments requis pour aussi être auto-suffisant dans la présentation croisée. En utilisant la portion soluble tronquée de la protéine US6 du cytomegalovirus, connue pour bloquer le transport par TAP, ils ont démontré que l'entrée de cette protéine par macropinocytose avec des antigènes exogènes bloque la présentation croisée. En utilisant également un polypeptide marqué, nef7X contenant l'épitope nef7B liant HLA-A3, ils ont démontré que l'inhibition du protéasome et de TAP bloque la présentation croisée du polypeptide nef7X, ce qui indique qu'un processus cytosolique est essentiel pour générer l'épitope provenant de ce polypeptide.

Il semble donc que le modèle de présentation croisée passant par une voie cytosolique que nous avançons ici soit appuyé par les résultats parallèles obtenus par les groupes de Cresswell et d'Amigorena.

Les phagosomes sont des organelles autonomes pour la formation de complexes peptide:CMH de classe I

Afin de démontrer que les phagosomes sont des organelles auto-suffisants dans la présentation croisée, il était essentiel de montrer la présence d'un complexe formé d'un peptide exogène chargé sur un CMH de classe I. En utilisant un anticorps spécifique au complexe SIINFEKL:CMH de classe I (Porgador *et al.*, 1997), nous avons ainsi pu attester la présence de ce complexe au niveau des phagosomes. Il est intéressant de noter que l'observation de ce complexe par immunofluorescence se fait dans une fenêtre de temps correspondant à la détection de l'OVA rétrotransloquée et à la stimulation des cellules T. Le groupe d'Amigorena a également obtenu des résultats appuyant l'autonomie des

phagosomes pour la présentation croisée (Guermontprez *et al.*, 2003). En effet, des membranes isolées de phagosomes induisent la sécrétion d'interféron- γ par les CD8⁺ lorsque mises en contact direct, ce qui appuie encore plus le fait que des complexes peptide:CMH de classe I se forment dans les phagosomes. Il est également intéressant de noter que lorsque des cellules dendritiques internalisent un mélange de billes de latex opsonisées avec l'OVA ou la BSA, seuls les phagosomes contenant les billes de latex-OVA présentent le complexe SIINFEKL:CMH de classe I (Guermontprez *et al.*, 2003), ce qui tend à démontrer qu'effectivement les phagosomes sont des organelles auto-suffisants dans la présentation croisée. Les peptides SIINFEKL ou leurs formes allongées en N-terminal, générés lors de la dégradation de l'OVA par les protéasomes, qui auraient diffusé trop loin des phagosomes dans le cytosol pourraient être rapidement dégradés par des protéases cytosoliques (Reits *et al.*, 2003), ce qui les empêcherait d'atteindre des phagosomes ne contenant pas d'OVA. Cela renforce également le modèle proposé ici voulant que les protéasomes recrutés aux phagosomes en des domaines cytoplasmiques focaux dégradent l'OVA rétrotransloquée.

Il est possible de spéculer que les protéases lysosomiales seraient responsables de ce phénomène en clivant l'OVA pour obtenir SIINFEKL dans le phagosome latex-OVA, suivi d'un chargement sur le CMH de classe I. Cependant, la démonstration qu'une inhibition du protéasome et du transport par TAP diminue la stimulation des CD8⁺, en plus d'un essai fonctionnel montrant que TAP phagosomal transloque les substrats peptidiques de TAP tendent à prouver l'existence d'un traitement de l'OVA au niveau du cytosol. Cependant, la possibilité d'une voie de traitement vacuolaire de l'OVA parallèle à celle du cytosol ne doit pas être totalement écartée. En effet, tout récemment, il a été rapporté que la cathepsine S jouait un rôle dans la présentation croisée observée en des conditions où TAP est absent (Shen *et al.*, 2004). Il semblerait cependant que la présentation croisée vacuolaire ait lieu le plus souvent dans des conditions où l'antigène exogène est présent en immense quantité

dans les phagosomes, ce qui théoriquement favoriserait les chances d'obtenir un clivage produisant un peptide spécifique au CMH de classe I.

Le transport du complexe peptide:CMH de classe I à la surface cellulaire

Les résultats que nous avons obtenus semblent démontrer que le transport du complexe SIINFEKL:CMH de classe I se fait de façon BFA-indépendante, ce qui pourrait être expliqué par la présence de protéines telle Rab11 sur le phagosome (Garin *et al.*, 2001), connue pour son rôle dans le recyclage de vésicules vers la membrane plasmique (Cox *et al.*, 2000). Le recyclage du CMH de classe I à la surface cellulaire pourrait également être gouverné par un résidu tyrosine conservé dans la queue cytoplasmique de cette molécule, qui fut démontré comme étant essentiel pour la présentation croisée d'antigènes exogènes au niveau des endosomes (Lizee *et al.*, 2003). Une mutation de ce domaine tyrosine conservé sur le CMH de classe I a été démontrée comme inhibant la présentation croisée dans les cellules dendritiques mais ne prévient pas le transport du CMH de classe I du RE à la surface cellulaire via la voie de sécrétion. Cette situation favoriserait le modèle d'un phagosome autonome pour la présentation croisée puisque les peptides exogènes entrant dans le RE pour le chargement et voyageant à travers la voie de sécrétion ne seraient pas affectés par une mutation de la queue cytoplasmique du CMH de classe I. Il serait pertinent de vérifier dans le futur la contribution de ce domaine cytoplasmique du CMH de classe I dans la présentation croisée d'antigènes entrant par phagocytose. De façon intéressante, une fraction du CMH de classe I de surface est sensible à l'EndoH, ce qui signifie qu'une voie indépendante du Golgi pourrait exister pour le transport du CMH de classe I à la surface (Ackerman *et al.*, 2003).

Les phagosomes versus les endosomes dans la présentation croisée d'antigènes exogènes

Dans le modèle proposé ici (Figure 12), le fait intéressant est qu'en concentrant toute la machinerie responsable pour la présentation croisée en des points focaux sur les phagosomes, suivant la rétrotranslocation, il pourrait y avoir un bon pourcentage de protéines exogènes qui "n'accèdent" pas vraiment au cytosol, mais seraient plutôt immédiatement traitées par la machinerie d'ubiquitination et les protéasomes recrutés à la membrane des phagosomes, avec les peptides résultants retransloqués à l'intérieur de la lumière du phagosome par TAP et chargés sur le CMH de classe I. Les endosomes contenant des protéines exogènes ont également été rapportés comme ayant la capacité de transporter ces protéines au cytosol dans les cellules dendritiques (Rodriguez *et al.*, 1999). Il est intéressant de constater que d'autres études ont démontré que la présentation croisée de la protéine exogène OVA aux CD8⁺ est 10³⁻⁴ fois plus efficace lorsque l'OVA est internalisée par phagocytose au lieu de l'endocytose (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1993 ; Harding *et al.*, 1994 ; Reis e Sousa *et al.*, 1995). La plus grande efficacité de la phagocytose dans ce phénomène pourrait être expliquée par la capacité des phagosomes de créer des points focaux de protéines ubiquitinées et de protéasomes recrutés. Il reste à vérifier si les endosomes possèdent également cette propriété, ce qui est douteux considérant le fait que le RE n'a pas été démontré comme jouant un rôle important dans la biogenèse des endosomes.

La protéomique est un outil primordial pour l'étude des propriétés fonctionnelles du phagosome modulé par l'interféron- γ

L'élucidation des mécanismes moléculaires de la présentation croisée d'antigènes exogènes dans le phagosome n'aurait pu se faire sans l'avancement technologique des dernières années qu'a procuré la protéomique. En effet, c'est l'identification à grande échelle par spectrométrie de masse des protéines constituant le phagosome (Garin *et al.*, 2001) qui a permis de jeter les bases sur de nouveaux concepts de biologie cellulaire pour cet organelle. Parmi ces nouveaux concepts, on retrouve la présence de microdomaines lipidiques sur la membrane du phagosome impliqués dans sa maturation (Dermine *et al.*, 2001 ; Dermine *et al.*, en préparation), l'implication du RE dans la formation des phagosomes (Gagnon *et al.*, 2002) et l'auto-suffisance du phagosome pour la présentation croisée d'antigènes exogènes (Houde *et al.*, 2003) (Figure 13).

Dans la seconde partie des résultats présentés dans le chapitre II de cette thèse, nous utilisons la puissance de l'approche protéomique afin d'étudier comment l'interféron- γ module les propriétés fonctionnelles du phagosome. L'interféron- γ est une cytokine ayant des effets complexes et variés sur les cellules du système immunitaire. Ces effets vont de l'augmentation des propriétés microbicides des macrophages à l'amélioration de la présentation d'antigènes et la modification de la croissance, la maturation, la différenciation et l'apoptose des cellules ciblées par cette cytokine (Boehm *et al.*, 1997 ; Schroder *et al.*, 2004). L'utilisation de techniques permettant d'étudier seulement une à la fois les protéines impliquées dans les voies métaboliques stimulées par l'interféron- γ peuvent donner des réponses précises à des questions spécifiques, mais ne permettent pas d'avoir une vision globale des effets de cette cytokine sur une cellule ou un organelle entier. Pour ce qui est des effets globaux de l'interféron- γ sur la cellule, l'utilisation de micropuces d'oligonucléotides a permis de déterminer les gènes modulés au niveau du macrophage

(Der *et al.*, 1998). Cependant, ces résultats ne permettent pas de connaître précisément l'état protéique d'un organelle comme le phagosome dans une cellule stimulée par l'interféron- γ .

Afin d'avoir une vision globale du phagosome provenant d'un macrophage stimulé par l'interféron- γ , nous avons utilisé l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) dans le but de générer une carte 2D des protéines constituant le phagosome. Une carte 2D similaire avait déjà été générée par notre laboratoire dans le passé (Garin *et al.*, 2001). La différence présentée dans l'étude au chapitre II se situe au niveau de la quantité de points correspondants à des protéines identifiées et à la méthodologie employée. Ainsi, chaque point sur le gel correspondant à une protéine fut numéroté afin de générer une liste de référence. Un des avantages de l'utilisation des gels 2D est de permettre la séparation des protéines de même poids moléculaire selon leur point isoélectrique. Les protéines telles les cathepsines présentes sous différentes formes glycosylées peuvent également être bien séparées. La carte 2D de référence du protéome du phagosome a ensuite pu être utilisée afin d'identifier les protéines modulées de façon positive par l'interféron- γ . Cette identification s'est faite par comparaison de patrons de points entre la carte 2D de référence et les gels 2D de phagosomes provenant de macrophages stimulés ou non par l'interféron- γ . Suivant cette étape, nous avons effectué la validation de ces données par une approche plus traditionnelle en utilisant différentes techniques de biologie cellulaire afin de confirmer les modulations positives obtenues pour certaines protéines et afin de démontrer des corrélations entre l'état du protéome du phagosome et certaines propriétés fonctionnelles de cet organelle telle la microbicidité, la dégradation protéique et l'acidification.

La modification du protéome du phagosome suivant une stimulation des macrophages par l'interféron- γ corrèle avec une augmentation de la microbicité et des interactions entre le phagosome et les organelles de la voie endocytaire.

L'analyse protéomique du phagosome de macrophages stimulés par l'interféron- γ nous a fourni une vision globale des effets de cette cytokine sur la réorganisation du protéome de cet organelle. Nous avons ainsi constaté que différentes catégories de protéines impliquées dans la microbicité étaient modulées de façon positive. En effet, les protéases cathepsine A, B, C, D, S et Z sont toutes modulées par l'interféron- γ . Cependant, comme nous le démontrons pour la cathepsine B, la modulation de ces protéases ne passe pas nécessairement par une augmentation des niveaux de ces protéases dans le phagosome, mais peut se traduire par une modification de leurs formes glycosylées. L'utilisation de gels 2D a avantageusement ici permis de constater ce fait. Tout comme il a été rapporté par le passé que l'interféron- γ augmente l'activité des cathepsines B (Lah *et al.*, 1995), D (Rossman *et al.*, 1990) et S (Beers *et al.*, 2003), nous démontrons ici que la modulation de ces protéases au niveau du phagosome corrèle avec une augmentation de la dégradation de parasites phagocytés. Il est intéressant de constater que les protéases modulées par l'interféron- γ appartiennent à différentes familles, soit les thiol ou cystéine protéases pour les cathepsines B, C, S et Z, les aspartyl protéases pour la cathepsine D et les sérine carboxypeptidases pour la cathepsine A. On peut assumer que cette diversité fonctionnelle au niveau des protéases présentes dans le phagosome permet de favoriser une meilleure dégradation des parasites ingérés. Pour ce qui est de la cathepsine A, elle est également appelée "protéine protectrice lysosomiale" ("lysosomal protective protein") puisqu'elle forme un complexe de haut poids moléculaire avec trois glycosidases acides, la β -galactosidase, l' α -neuraminidase et la N-acetylaminogalacto-6-sulfate sulfatase (Morreau

et al., 1992 ; Rudenko *et al.*, 1995 ; Bonten et d'Azzo, 2000 ; Ostrowska *et al.*, 2003). La cathepsine A est le constituant majeur de ce complexe et protège les glycosidases d'une dégradation rapide par les autres protéases. D'ailleurs, une déficience en cathepsine A chez l'être humain provoque une déficience dans les autres enzymes qu'elle protège, ce qui cause la galactosialidose (Hoogeveen *et al.*, 1983 ; Verheijen *et al.*, 1985). Une augmentation de la cathepsine A au niveau du phagosome pourrait donc favoriser les activités de ces glycosidases, un effet impossible à constater si on étudie simplement l'expression de gènes stimulés par l'interféron- γ .

Suivant leur formation, les phagosomes très précoces semblent majoritairement constitués d'éléments provenant du RE, de la membrane plasmique et du milieu extracellulaire, ce qui les rendent peu dangereux vis-à-vis les pathogènes. Graduellement, les phagosomes vont acquérir divers éléments provenant des endosomes précoces, tardifs et des lysosomes qui vont leur conférer des propriétés cytotoxiques leur permettant de tuer et dégrader les pathogènes (Garin *et al.*, 2001). Les petites GTPases Rab5a et Rab7 sont des éléments clés permettant aux phagosomes de fusionner avec les organelles de la voie endocytaire. En effet, des mutants déficients de Rab5a et Rab7 inhibent respectivement la fusion avec les endosomes précoces et tardifs (Desjardins *et al.*, 1994b ; Via *et al.*, 1997), alors qu'un mutant constitutivement actif de Rab5a affecte les interactions transitoires du type « kiss and run » avec les endosomes précoces formant ainsi des phagosomes géants (Desjardins *et al.*, 1995 ; Duclos *et al.*, 2000). Il est donc très intéressant de constater qu'un phagosome provenant de macrophages stimulés par l'interféron- γ possède des niveaux plus élevés de ces deux GTPases. Cette effet de l'interféron- γ pourrait se traduire par une augmentation des interactions entre le phagosome et les endosomes et une acquisition plus rapide de certaines propriétés fonctionnelles tel un environnement acide. En effet, on peut constater un augmentation drastique de l'acidité dans les phagosomes précoces de macrophages traités à l'interféron- γ . Cette augmentation corrèle avec l'accroissement des niveaux de v-ATPase dans le phagosome, dont la fonction est de pomper les protons à

l'intérieur de cet organelle afin d'en acidifier le contenu. Puisque l'activité enzymatique de plusieurs protéases dépend d'un pH acide, les protéases pourront exercer leurs effets plus tôt.

Conclusion

Le phagosome est un organelle complexe jouant un rôle primordial dans le système immunitaire, que ce soit via la dégradation de pathogènes phagocytés dans l'immunité innée ou via la génération de peptides compétents pour la présentation d'antigènes et la stimulation de la réponse immunitaire adaptée. Naturellement, l'importance du phagosome dans l'immunité corrèle avec un protéome complexe où les protéines interagissent entre elles afin de créer un environnement efficace pour l'accomplissement de ses fonctions diverses. L'avènement de la protéomique nous a donné les outils nécessaires pour l'étude des fonctions connues du phagosome et l'élaboration de nouveaux modèles. Les travaux présentés dans cette thèse démontrent un nouveau modèle pour la présentation croisée d'antigènes exogènes dans le phagosome. Le phagosome possède tous les éléments requis pour être auto-suffisant dans la dégradation d'antigènes exogènes et permettre la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques. Cette découverte pourrait être particulièrement importante dans l'élaboration de traitements contre les pathogènes qui échappent normalement au système immunitaire. L'utilisation du phagosome comme outil de stimulation des lymphocytes T cytotoxiques pourrait permettre de court-circuiter les mécanismes échappatoires des pathogènes et ainsi favoriser leur élimination. Les travaux présentés dans cette thèse démontrent également comment l'interféron- γ module les propriétés fonctionnelles du phagosome et modifie la composition protéique de cet organelle afin de le rendre plus agressif vis-à-vis les pathogènes. Pour conclure, l'étude des grands ensembles de protéines composants les cellules et les organelles par la protéomique permettra au cours des prochaines années de créer de nouveaux modèles qui donneront une nouvelle dimension à la recherche fondamentale sur le système immunitaire et à l'élaboration de nouvelles thérapies contre les pathogènes anciens et émergents.

Bibliographie

- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R., Cresswell, P. (2003) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 12889-12894.
- Adams, D. O. (1989) Molecular interactions in macrophage activation *Immunol. Today* 10, 33-35.
- Aderem, A. and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623.
- Aderem, A., Ulevitch, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response *Nature* 406, 782-787.
- Adib-Conquy, M., Cavaillon, J. M. (2002) Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression *J. Biol. Chem.* 277, 27927-27934.
- Ahmed, R., Gray, D. (1996) Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54.
- Akira, S. (2000) The role of IL-18 in innate immunity *Curr. Opin. Immunol.* 12, 59-63.
- Akira, S. (2000) Toll-like receptors: lessons from knockout mice *Biochem. Soc. Trans.* 28, 551-556.
- Albert, M. L., Darnell, J. C., Bender, A., Francisco, L.M., Bhardwaj, N., Darnell, R.B. (1998) Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat. Med.* 4, 1321-1324.
- Albert, M.L., Jegathesan, M., Darnell, R.B. (2001) Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 2, 1010-1017.
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., Bhardwaj, N. (1998) Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha_vbeta₅ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1359-1368.
- Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N. (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.

Alvarez-Dominguez, C., Stahl, P.D (1999) Increased expression of Rab5a correlates directly with accelerated maturation of *Listeria monocytogenes* phagosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 11459-11462.

Alvarez-Dominguez, C., Stahl, P.D. (1998) Interferon-gamma selectively induces Rab5a synthesis and processing in mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 273, 33901-33904.

Anderson, S.L., Shen, T., Lou, J., Xing, L., Blachere, N.E., Srivastava, P.K., Rubin, B.Y. (1994) The endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is transcriptionally upregulated in interferon-treated cells. *J. Exp. Med.* 180, 1565-1569.

Attaya, M., Jameson, S., Martinex, C. K., Hermel, E., Aldrich, C., Forman, J., Lindahl, K. F., Bevan, M. J., Monaco, J. J. (1992) Ham-2 corrects the class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature* 355, 647-649.

Bach, E. A., Aguet, M., Schreiber, R. D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563-591.

Bach, E. A., Tanner, J. W., Marsters, S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Shaw, A. S., Schreiber, R. D. (1996) Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells *Mol. Cell. Biol.* 16, 3214-3221.

Bachmann, M.F., Oxenius, A., Pircher, H., Hengartner, H., Ashton-Richardt, P.A., Tonegawa, S., Zinkernagel, R.M. (1995) TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins. *Eur. J. Immunol.* 25, 1739-1743.

Baek, K. J., Thiel, B. A., Lucas, S., Stuehr, D. J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme *J. Biol. Chem.* 268, 21120-21129.

Barrett, A. J. (1977) Cathepsin D and other carboxyl proteinases. Barrett, A. J. eds. *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, 209-248 Elsevier North-Holland Biomedical Press New York.

Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M. (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130, 1910-1917.

Belich, M. P., Glynn, R. J., Senger, G., Sheer, D., Trowsdale, J. (1994) Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins *Curr. Biol.* 4, 769-776.

- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M.C., Sacks, D. (2002) CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 168, 3992-4000.
- Beretta, L., Gabbay, M., Berger, R., Hanash, S. M., Sonenberg, N. (1996) Expression of the protein kinase PKR is modulated by IRF-1 and is reduced in 5q-associated leukemias *Oncogene* 12, 1593-1596.
- Bernabei, P., Allione, A., Rigamonti, L., Bosticardo, M., Losana, G., Borghi, I., Forni, G., Novelli, F. (2001) Regulation of interferon-gamma receptor (INF-gammaR) chains: a peculiar way to rule the life and death of human lymphocytes *Eur. Cytokine Netw.* 12, 6-14.
- Bernabei, P., Coccia, E. M., Rigamonti, L., Bosticardo, M., Forni, G., Pestka, S., Krause, C. D., Battistini, A., Novelli, F. (2001) Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death *J. Leukoc. Biol.* 70, 950-960.
- Bickham, K., Goodman, K., Paludan, C., Nikiforow, S., Tsang, M. L., Steinman, R. M., Munz, C. (2003). Dendritic cells initiate immune control of epstein-barr virus transformation of B lymphocytes in vitro. *J. Exp. Med.* 198, 1653-1663.
- Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., Carton, H. (1988) Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma *J. Immunol.* 140, 1506-1510.
- Bliss, S. K., Marshall, A. J., Zhang, Y., Denkers, E. Y. (1999) Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens *J. Immunol.* 162, 7369-7375.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749-795.
- Bonilla, F.A., Fujita, R.M., Pivniouk, V.I., Chan A.C., Geha R.S. (2000) Adaptor proteins SLP-76 and BLNK both are expressed by murine macrophages and are linked to signaling via Fc receptors I and II/III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1725-1730.
- Bonten, E.J., d'Azzo, A. (2000) Lysosomal neuraminidase. Catalytic activation in insect cells is controlled by the protective protein/cathepsin A. *J. Biol. Chem.* 275, 37657-37663.

- Booth, J.W., Kim, M.K., Jankowski, A., Schreiber, A.D., Grinstein, S. (2002) Contrasting requirements for ubiquitylation during Fc receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *EMBO J.* 21, 251-258.
- Bosisio, D., Polentarutti, N., Sironi, M., Bernasconi, S., Miyake, K., Webb, G. R., Martin, M. U., Mantovani, A., Muzio, M. (2002) Stimulation of Toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide *Blood* 99, 3427-3431.
- Boss, J. M. (1997) Regulation of transcription of MHC class II genes *Curr. Opin. Immunol.* 9, 107-113.
- Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T., Grinstein, S. (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J. Cell. Biol.* 151, 1353-1368.
- Boyle, J. S., Koniaras, C., Lew, A. M. (1997). Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int. Immunol.* 9, 1897-1906.
- Brachet, V., Raposo, G., Amigorena, S., Mellman, I. (1997) Ii controls the transport of major histocompatibility class II molecules to and from lysosomes. *J. Cell Biol.* 137, 51-55.
- Brandt, R., Keston, A.S. (1965) Synthesis of diacetyldichlorofluorescein : a stable reagent for fluorometric analysis. *Anal. Biochem.* 11, 6-9.
- Briscoe, J., Rogers, N. C., Witthuhn, B. A., Watling, D., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Stark, G. R., Ihle, J. N., Kerr, I. M. (1996) Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state *EMBO J.* 15, 799-809.
- Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B., Rivett, A.J. (2000) Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 352, Pt 3: 611-615.
- Brossart, P., Bevan, M.J. (1997) Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90, 1594-1599.
- Buchmeier, N. A., Schreiber, R. D. (1985) Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7404-7408.

Burke, F., Knowles, R. G., East, N., Balkwill, F. R. (1995) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gamma in vivo *Int. J. Cancer* 60, 115-122.

Canaday, D.H., Ziebold, C., Noss, E.H., Chervenak, K.A., Harding, C.V., Boom, W.H. (1999) Activation of human CD8⁺ alpha beta TCR⁺ cells by Mycobacterium tuberculosis via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J. Immunol.* 162, 372-379.

Cannon, G.J., Swanson, J.A. (1992) The macrophage capacity for phagocytosis. *J. Cell Sci.* 101, 907-913.

Cantin, E., Tanamachi, B., Openshaw, H. (1999) Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type 1 reactivation *J. Virol.* 73, 3418-3423.

Carlin, J. M., Borden, E. C., Sondel, P. M., Byrne, G. I. (1987) Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures *J. Immunol.* 139, 2414-2418.

Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A. (1999) Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells *J. Immunol.* 163, 4647-4650.

Caron, E., Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.

Cascio P., Call, M., Petre, B.M., Walz, T., Goldberg, A.L. (2002) Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J.* 21, 2636-2645.

Cascio P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L., Goldberg, A.L. (2001) 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20, 2357-2366.

Cassatella, M. A., Bazzoni, F., Flynn, R. M., Dusi, S., Trinchieri, G., Rossi, F. (1990) Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components *J. Biol. Chem.* 265, 20241-20246.

Cassatella, M. A., Hartman, L., Perussia, B., Trinchieri, G. (1989) Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene

expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells *J. Clin. Invest.* 83, 1570-1579.

Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., D'Andrea, A., Ma, X., Trinchieri, G. (1995) Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes *Eur. J. Immunol.* 25, 1-5.

Castellano, F., Montcourrier, P., Chavrier, P. (2000) Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis. *J. Cell Sci.* 113, 2955-2961.

Chang, C. H., Flavell, R. A. (1995) Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation *J. Exp. Med.* 181, 765-767.

Chang, C. H., Guerder, S., Hong, S. C., van Ewijk, W., Flavell, R. A. (1996) Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression *Immunity* 4, 167-178.

Chefalo, P.J., Grandea, A. G., Van Kaer, L., Harding, C. V. (2003) Tapasin^{-/-} and TAP1^{-/-} macrophages are deficient in vacuolar alternate class I MHC (MHC-I) processing due to decreased MHC-I stability at phagolysosomal pH. *J. Immunol.* 170, 5825-5833.

Chen, L., Jondal, M. (2004) Alternative processing for MHC class I presentation by immature and CpG-activated dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 952-960.

Chen, W., Masterman, K.A., Basta, S., Haeryfar, S.M., Dimopoulos, N., Knowles, B., Bennink, J.R., Yewdell, J.W. (2004) Cross-priming of CD8⁺ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon. *Eur. J. Immunol.* 34, 194-199.

Cheshire, J. L., Baldwin, A. S., Jr (1997) Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaB beta degradation *Mol. Cell. Biol.* 17, 6746-6754.

Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z. H., Iwamoto, Y., Fu, X. Y. (1996) Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1 *Science* 272, 719-722.

Chiplunkar, S., De Libero, G., Kaufmann, S.H. (1986) Mycobacterium leprae-specific Lyt-2⁺ T lymphocytes with cytolytic activity. *Infect. Immun.* 54, 793-797.

Ciechanover, A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79,13-21.

- Collins, J. T., Dunnick, W. A. (1993) Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma *Int. Immunol.* 5, 885-891.
- Costelloe, E. A. (1997) The regulation and function of murine PAI-2 *Centre for Molecular and Cellular Biology*, 158 Biochemistry Department, University of Queensland Brisbane, Australia.
- Coutelier, J. P., Van Broeck, J., Wolf, S. F. (1995) Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse *J. Virol.* 69, 1955-1958.
- Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P.G., Bokoch, G.M., Greenberg, S. (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J. Exp. Med.* 186, 1487-1494.
- Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J., Greenberg, S. (2000) A Rab11-containing Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 680-685.
- Cresswell, P. (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
- Cresswell, P. (2003) "The biochemistry and cell biology of antigen processing, 613-629" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L.J., DeFranco, A.L. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* 186, 1027-1039.
- Darmani, H., Parton, J., Harwood, J. L., Jackson, S. K. (1994) Interferon-gamma and polyunsaturated fatty acids increase the binding of lipopolysaccharide to macrophages *Int. J. Exp. Pathol.* 75, 363-368.
- Darnell, J. E., Jr, Kerr, I. M., Stark, G. R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins *Science* 264, 1415-1421.
- Day, P.M., Yewdell, J. W., Porgador, A., Germain, R. N., Bennink, J. R (1997) Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 8064-8069.
- Decker, T., Kovarik, P., Meinke, A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 121-134.

- Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M., Kovarik, P. (2002) IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms *J. Clin. Invest.* 109, 1271-1277.
- den Haan, J.M., Lehar, S. M., Bevan, M. J (2000) CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685-1696.
- Denis, M. (1991) Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates *J. Leukoc. Biol.* 49, 380-387.
- Denzin L.K., Sant'Angelo, D.B., Hammond, C., Surman, M.J., Cresswell, P. (1997) Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* 278, 106-109.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 15623-8.
- Dermine, J.F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G., and Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 18507-18512.
- Dermine, J.F., Goyette, G., Letarte, S., Houde, M., Turco, S.J., Desjardins, M. (2004) *Leishmania* survival strategy in macrophages relies on the disruption of phagosome microdomains by its lipophosphoglycan. *In preparation*.
- Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol.* 5, 183-186.
- Desjardins, M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 280-291.
- Desjardins, M., Celis, J.E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., Huber, L.A (1994a). Molecular characterization of phagosomes. *J. Biol. Chem.* 269, 32194-32200.
- Desjardins, M., Griffiths, G. (2003) Phagocytosis: latex leads the way. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 498-503.

- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., Griffiths, G. (1994b) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* 124, 677-688.
- Desjardins, M., Nzala, N.N., Corsini, R., 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.
- Di Silvio, M., Geller, D. A., Gross, S. S., Nussler, A., Freeswick, P., Simmons, R. L., Billiar, T. R. (1993) Inducible nitric oxide synthase activity in hepatocytes is dependent on the coinduction of tetrahydrobiopterin synthesis *Adv. Exp. Med. Biol.* 338, 305-308.
- Dick, T. P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P. M., Kuehn, L., Koszinowski, U. H., Stevanovic, S., Schild, H., Rammensee, H. G. (1996) Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands *Cell* 86, 253-262.
- Dinareello, C. A. (1999) IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 11-24.
- Dobrovolskaia, M. A., Vogel, S. N. (2002) Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS *Microbes Infect.* 4, 903-914.
- Dong, J., Chen, W., Welford, A., Wandinger-Ness, A. (2004) The proteasome alpha-subunit XAPC7 interacts specifically with Rab7 and late endosomes. *J. Biol. Chem.* 279, 21334-21342.
- Drapier, J. C., Wietzerbin, J., Hibbs, J. B., Jr (1988) Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages *Eur. J. Immunol.* 18, 1587-1592.
- Duclos, S., Corsini, S., Desjardins, M. (2003) Remodeling of endosomes during lysosomes biogenesis involves 'kiss and run' fusion events regulated by rab5. *J. Cell Sci.* 116(Pt5), 907-918.
- Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H., and Desjardins, M. (2000) Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell Sci.* 113, 3531-3541.
- Farrar, M. A., Campbell, J. D., Schreiber, R. D. (1992) Identification of a functionally important sequence in the C terminus of the interferon-gamma receptor *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11706-11710.

Farrar, M. A., Fernandez-Luna, J., Schreiber, R. D. (1991) Identification of two regions within the cytoplasmic domain of the human interferon-gamma receptor required for function *J. Biol. Chem.* 266, 19626-19635.

Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A. (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol.* 131, 1435-52.

Figueiredo, F., Koerner, T. J., Adams, D. O. (1989) Molecular mechanisms regulating the expression of class II histocompatibility molecules on macrophages. Effects of inductive and suppressive signals on gene transcription *J. Immunol.* 143, 3781-3786.

Finkelman, F. D., Katona, I. M., Mosmann, T. R., Coffman, R. L. (1988) IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses *J. Immunol.* 140, 1022-1027.

Fitzer-Attas, C.J., Lowry, M., Crowley, M.T., Finn, A.J., Meng, F., DeFranco, A.L., Lowell, C.A. (2000) Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinase Hck, Fgr and Lyn. *J. Exp. Med.* 191, 669-682.

Flaishon, L., Hershkoviz, R., Lantner, F., Lider, O., Alon, R., Levo, Y., Flavell, R. A., Shachar, I. (2000) Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells *J. Exp. Med.* 192, 1381-1388.

Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J. J., Koyasu, S. (2001) IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge *Trends Immunol.* 22, 556-560.

Fukao, T., Frucht, D. M., Yap, G., Gadina, M., O'Shea, J. J., Koyasu, S. (2001) Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses *J. Immunol.* 166, 4446-4455.

Fukao, T., Matsuda, S., Koyasu, S. (2000) Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells *J. Immunol.* 164, 64-71.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J.M., Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131.

Galocha, B., Hill, A., Barnett, B.C., Dolan, A., Raimondi, A., Cook, R.F., Brunner, J., McGeoch, D.J., Ploegh, H.L. (1997) The active site of ICP47, a herpes simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC)-encoded peptide

transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH₂-terminal 35 residues. *J. Exp. Med.* 185, 1565-1572.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., Desjardins, M. (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* 152, 165–180.

Gessani, S., Belardelli, F. (1998) IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 117-123.

Golab, J., Zagodzón Stokłosal, T., Kaminski, R., Kozar, K., Jakobisiak, M. (2000) Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18—a bridge too far? *Immunol. Lett.* 72, 153-157.

Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T., Rock, K.L. (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* 39, 147-164.

Gordon, S. (2003) “Macrophages and the immune response, 481-495” in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Gotthardt, D., Warnatz, H.J., Henschel, O., Bruckert, F., Schleicher, M., Soldati, T. (2002) High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. 13, 3508-3520.

Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S., Nacy, C. A. (1990) Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha *J. Immunol.* 145, 4290-4297.

Green, S. J., Nacy, C. A., Meltzer, M. S. (1991) Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens *J. Leukoc. Biol.* 50, 93-103.

Greenberg, S., Grinstein, S. (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 136–145.

Greenlund, A. C., Farrar, M. A., Viviano, B. L., Schreiber, R. D. (1994) Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91) *EMBO J.* 13, 1591-1600.

Greenlund, A. C., Morales, M. O., Viviano, B. L., Yan, H., Krolewski, J., Schreiber, R. D. (1995) Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process *Immunity* 2, 677-687.

Gresham, H.D., Dale, B.M., Potter, J.W., Chang, P.W., Vines, C.M., Lowell, C.A., Lagenaur, C.F., Willman, C.L. (2000) Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr. *J. Exp. Med.* 191, 515-528.

Groettrup, M., Khan, S., Schwarz, K., Schmidtke, G. (2001) Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* 83, 367-372.

Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., Kloetzel, P. M. (1996) A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome *Eur. J. Immunol.* 26, 863-869.

Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Koszinowski, U. H., Kloetzel, P. M. (1996) A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation *Nature* 381, 166-168.

Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D. (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1062-1067.

Gromme, M., Uytdehaag, F. G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R. S., Kenter, M. J., Tulp, A., Verwoerd, D., Neeffjes, J. (1999) Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 10326-10331.

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

Guidotti, L. G., McClary, H., Loudis, J. M., Chisari, F. V. (2000) Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice *J. Exp. Med.* 191, 1247-1252.

Gupta, J. W., Kubin, M., Hartman, L., Cassatella, M., Trinchieri, G. (1992) Induction of expression of genes encoding components of the respiratory burst oxidase during differentiation of human myeloid cell lines induced by tumor necrosis factor and gamma-interferon *Cancer Res.* 52, 2530-2537.

Harding, C.V., Song, R. (1994) Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* 153, 4925-4933.

- Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L., Lund, F. E. (2000) Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells *Nat. Immunol.* 1, 475-482.
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., Gordon, C. (2002) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem. Sci.* 28, 26-31.
- Harvat, B. L., Seth, P., Jetten, A. M. (1997) The role of p27Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells *Oncogene* 14, 2111-2122.
- Hasnain, S., Hiramata, T., Tam, A., Mort, J.S. (1992) Characterization of recombinant rat cathepsin B and nonglycosylated mutants expressed in yeast. New insights into the pH dependence of cathepsin B-catalyzed hydrolyses. *J. Biol. Chem.* 267, 4713-4721.
- Hassanain, H. H., Chon, S. Y., Gupta, S. L. (1993) Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor *J. Biol. Chem.* 268, 5077-5084.
- Hazes, B.R., Read, R.J. (1997) Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* 36, 11051-11054.
- Heim, M. H., Kerr, I. M., Stark, G. R., Darnell, J. E., Jr (1995) Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway *Science* 267, 1347-1349.
- Henkart, P.A., Sitkovsky, M.V. (2003) "Cytotoxic T-lymphocytes, 1127-1150" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761-807.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., Schuler, G. (1996) Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells *Eur. J. Immunol.* 26, 659-668.

- Hisamatsu, H., Shimbara, N., Saito, Y., Kristensen, P., Hendil, K. B., Fujiwara, T., Takahashi, E., Tanahashi, N., Tamura, T., Ichihara, A., Tanaka, K. (1996) Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma *J. Exp. Med.* 183, 1807-1816.
- Hissong, B. D., Carlin, J. M. (1997) Potentiation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA in human mononuclear phagocytes by lipopolysaccharide and interleukin-1 *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 387-393.
- Hobeika, A. C., Subramaniam, P. S., Johnson, H. M. (1997) IFNalpha induces the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human prostate cancer cells *Oncogene* 14,1165-1170.
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., O'Keeffe, M. (2001) Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets *J. Immunol.* 166, 5448-5455.
- Hoffmann, T.K., Meidenbauer, N., Dworacki, G., Kanaya, H., Whiteside, T.L. (2000) Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res.* 60, 3542-3549.
- Hoffmann, T.K., Meidenbauer, N., Muller-Berghaus, J., Storkus, W. J., Whiteside, T. L. (2001) Proinflammatory cytokines and CD40 ligand enhance cross-presentation and cross-priming capability of human dendritic cells internalizing apoptotic cancer cells. *J. Immunother.* 24, 162-171.
- Holevinsky, K.O., Nelson, D.J. (1998) Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophys. J.* 75, 2577-2586.
- Hoogeveen, A.T., Verheijen, F.W., Galjaard, H. (1983) The relation between human lysosomal beta-galactosidase and its protective protein. *J. Biol. Chem.* 258, 12143-12146.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- Hovanessian, A. G., Galabru, J. (1987) The double-stranded RNA-dependent protein kinase is also activated by heparin *Eur. J. Biochem.* 167, 467-473.
- Huang, A.Y., Bruce, A. T., Pardoll, D. M., Levitsky, H. I (1996) In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 4, 349-355.

Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M., Aguet, M. (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor *Science* 259, 1742-1745.

Huang, Y., Krein, P. M., Muruve, D. A., Winston, B. W. (2002) Complement factor B gene regulation: synergistic effects of TNF-alpha and IFN-gamma in macrophages *J. Immunol.* 169, 2627-2635.

Iacobuzio-Donahue, C.A., Shuja, S., Cai, J., Peng, P., Murnane, M.J. (1997) Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression. *J. Biol. Chem.* 272, 29190-29199.

Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A. F., Harpur, A. G., Larner, A. C., Finbloom, D. S. (1994) Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor *J. Biol. Chem.* 269, 14333-14336.

Izadi, K.D., Erdreich-Epstein, A. Liu, Y.B., Durden, D.L. (1998) Characterization of Cbl-Nck and Nck-Pak1 interactions in myeloid Fc RII signaling. *Exp Cell Res* 245, 330-342.

Jahnke, A., Johnson, J. P. (1994) Synergistic activation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by TNF-alpha and IFN-gamma is mediated by p65/p50 and p65/c-Rel and interferon-responsive factor Stat1 alpha (p91) that can be activated by both IFN-gamma and IFN-alpha *FEBS Lett.* 354, 220-226.

Janeway, C.L., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2001) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5e édition. New York, Garland Publishing.

Jasanoff, A., Wagner, G., Wiley, D.C. (1998) Structure of a trimeric domain of the MHC classe II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17, 6812-6818.

Jenkins, M.K. (2003) "Peripheral T-lymphocyte responses and function, 303-319" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Jensen, P.E., Weber, D.A., Thayer, W.P., Chen, X., Dao, C.T. (1999) HLA-DM and the MHC class II antigen presentation pathway. *Immunol. Res.* 20, 195-205.

Jurkovich, G. J., Mileski, W. J., Maier, R. V., Winn, R. K., Rice, C. L. (1991) Interferon gamma increases sensitivity to endotoxin *J. Surg. Res.* 51, 197-203.

- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S. I., Kimura, T., Green, S. J., et al (1994) Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages *Science* 263, 1612-1615.
- Kamijo, R., Le, J., Shapiro, D., Havell, E. A., Huang, S., Aguet, M., Bosland, M., Vilcek, J. (1993) Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guerin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide *J. Exp. Med.* 178, 1435-1440.
- Kamijo, R., Shapiro, D., Le, J., Huang, S., Aguet, M., Vilcek, J. (1993) Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon gamma receptor *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 6626-6630.
- Kaplan, D. H., Greenlund, A. C., Tanner, J. W., Shaw, A. S., Schreiber, R. D. (1996) Identification of an interferon-gamma receptor alpha chain sequence required for JAK-1 binding *J. Biol. Chem.* 271, 9-12.
- Karupiah, G., Chen, J. H., Nathan, C. F., Mahalingam, S., MacMicking, J. D. (1998) Identification of nitric oxide synthase 2 as an innate resistance locus against ectromelia virus infection *J. Virol.* 72, 7703-7706.
- Karupiah, G., Xie, Q. W., Buller, R. M., Nathan, C., Duarte, C., MacMicking, J. D. (1993) Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase *Science* 261, 1445-1448.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin *Immunity* 11, 115-122.
- Kelly, A., Powis, S. H., Glynne, R., Radley, E., Beck, S., Trowsdale, J. (1991) Second proteasome-related gene in the human MHC class II region *Nature* 353, 667-668.
- Kelly, A., Powis, S. J., Derr, L.-A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J., Townsend, A. (1992) Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 355, 641-644 .
- Kern, I., Steimle, V., Siegrist, C. A., Mach, B. (1995) The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes *Int. Immunol.* 7, 1295-1299.

- Kerr, I. M., Stark, G. R. (1991) The control of interferon-inducible gene expression *FEBS Lett.* 285, 194-198.
- Kessler, B., Hong, X., Petrovic, J., Borodovsky, A., Dantuma, N. P., Bogyo, M., Overkleeft, H. S., Ploegh, H., Glas, R. (2003) Pathways accessory to proteasomal proteolysis are less efficient in major histocompatibility complex class I antigen production. *J. Biol. Chem.* 278, 10013-10021.
- Keston, A.S., Brandt, R. (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 11, 1-5.
- Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein S., Pawson, T. (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4209-4220.
- Kloetzel, P.M. (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179-187.
- Kominsky, S., Johnson, H. M., Bryan, G., Tanabe, T., Hobeika, A. C., Subramaniam, P. S., Torres, B. (1998) IFN γ inhibition of cell growth in glioblastomas correlates with increased levels of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 *Oncogene* 17, 2973-2979.
- Kotenko, S. V., Izotova, L. S., Pollack, B. P., Mariano, T. M., Donnelly, R. J., Muthukumar, G., Cook, J. R., Garotta, G., Silvennoinen, O., Ihle, J. N., et al (1995) Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex *J. Biol. Chem.* 270, 20915-20921.
- Kovacsovics-Bankowski, Clark, K., Benacerraf, B., Rock, K.L. (1993) Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90, 4942-4946.
- Kovacsovics-Bankowski, M.R., Rock, K.L. (1995) A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246.
- Kubin, M., Chow, J. M., Trinchieri, G. (1994) Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells *Blood* 83, 1847-1855.
- Kwon, N. S., Nathan, C. F., Stuehr, D. J. (1989) Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages *J. Biol. Chem.* 264, 20496-20501.

Kyono, W.T., de Jong, R., Park, R.K., Liu, Y., Heisterkamp, N., Groffen J., Durden, D.L. (1998) Differential interaction of Crkl with Cbl or C3G, Hef-1, and subunit immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signaling of myeloid high affinity Fc receptor for IgG (FcRI). *J. Immunol.* 161, 5555–5563.

Lafuse, W. P., Brown, D., Castle, L., Zwilling, B. S. (1995) IFN-gamma increases cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages *J. Leukoc. Biol.* 57, 663-669.

Lah, T. T., Hawley, M., Rock, K. L., Goldberg, A. L. (1995) Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages *FEBS Lett.* 363, 85-89.

Larsen, E.C., DiGennaro, J.A., Saito, N., Mehta, S., Loegering, D.J., Mazurkiewicz, J.E., Lennartz, M.R. (2000) Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J. Immunol.* 165, 2809–2817.

Lederer, J. A., Perez, V. L., DesRoches, L., Kim, S. M., Abbas, A. K., Lichtman, A. H. (1996) Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation *J. Exp. Med.* 184, 397-406.

Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Stegerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., Masucci, M.G. (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr Virus nuclear antigen-1. *Nature (London)* 375, 685-688.

Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., Masucci, M.G. (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 12616-12621.

Lilley, B.N., Ploegh, H.L. (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-840.

Liu, Y.J. (2001) Dendritic cells subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106, 259-262.

Lizee, G., Basha, G., Tiong, J., Julien, J. P., Tian, M., Biron, K. E., Jefferies, W. A. (2003) Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* 4, 1065-1073.

Lorsbach, R. B., Murphy, W. J., Lowenstein, C. J., Snyder, S. H., Russell, S. W. (1993) Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell

killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide *J. Biol. Chem.* 268, 1908-1913.

Lu, B., Ebensperger, C., Dembic, Z., Wang, Y., Kvatyuk, M., Lu, T., Coffman, R. L., Pestka, S., Rothman, P. B. (1998) Targeted disruption of the interferon-gamma receptor 2 gene results in severe immune defects in mice *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 8233-8238.

Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells *J. Immunol.* 154, 5071-5079.

Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., Reith, W. (1996) Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease *Annu. Rev. Immunol.* 14, 301-331.

Mach, L., Stuwe, K., Hagen, A., Ballaun, C., Glossl, J. (1992) Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem. J.* 282 (Pt2), 577-582.

MacMicking, J., Xie, Q. W., Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-350.

Mandal, M., Bandyopadhyay, D., Goepfert, T. M., Kumar, R. (1998) Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK) *Oncogene* 16, 217-225.

Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., Akashi, K. (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333-3341.

Margulies, D.H., McCluskey, J. (2003) "The major histocompatibility complex and its encoded proteins, 571-612" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Massol, P., Montcourier, P., Guillemot, J.C., Chavrier, P. (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J* 17, 6219-6229.

Matsuoka, M., Nishimoto, I., Asano, S. (1999) Interferon-gamma impairs physiologic downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip1, during G1 phase progression in macrophages *Exp. Hematol.* 27, 203-209.

- Max, E.E. (2003) "Immunoglobulins: molecular genetics, 107-158" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Mazumdar, P.M.H. (2003) "History of Immunology, 23-46" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- McHeyzer-Williams, M. (2003) "B-Cell signaling mechanisms and activation 195-225" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Sollner, T.H., Rothman, J.E. (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407, 153-159.
- Melendez, A.J., Harnett, M.M., Allen, J.M. (1999) FcRI activation of phospholipase C1 and protein kinase C in dibutyl cAMP-differentiated U937 cells is dependent solely on the tyrosine-kinase activated form of phosphatidylinositol-3-kinase. *Immunology* 98, 1-8.
- Metchnikov, E. (1891) Phagocytosis and immunity. London: British Medical Association.
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N. S., Kerr, I. M., Williams, B. R., Hovanessian, A. G. (1990) Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon *Cell* 62, 379-390.
- Mita, Y., Dobashi, K., Shimizu, Y., Nakazawa, T., Mori, M. (2001) Toll-like receptor 2 and 4 surface expressions on human monocytes are modulated by interferon-gamma and macrophage colony-stimulating factor *Immunol. Lett.* 78, 97-101.
- Morinobu, A., Kumagai, S. (1998) Cytokine measurement at a single-cell level to analyze human Th1 and Th2 cells *Rinsho Byori* 46, 908-914.
- Morreau, H., Galjart, N.J., Willemsen, R., Gillemans, N., Zhou, X.Y., d'Azzo, A. (1992) Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267, 17949-17956.
- Morris, S. M., Jr, Billiar, T. R. (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis *Am. J. Physiol.* 266, E829-E839.
- Moser, M. (2003) "Dendritic cells, 455-480" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.

- Mueller-Taubenberger, A., Lupas, A.N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E., Gerisch, G. (2001) Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* 20, 6772–6782.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., Aguet, M. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense *Science* 264, 1918-1921.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., Modolell, M. (1998) Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation *J. Exp. Med.* 187, 2103-2108.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., Modolell, M. (2001) Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18—a bridge built on solid ground *Immunol. Lett.* 75, 159-160.
- Nandi, D., Jiang, H., Monaco, J. J. (1996) Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit *J. Immunol.* 156, 2361-2364.
- Nathan, C. F., Gabay, J. (1992) Antimicrobial mechanisms of macrophages van Furth, R. eds. *Mononuclear Phagocytes: Biology of Monocytes and Macrophages*, 259-267 Kluwer Academic Dordrecht, The Netherlands.
- Neumann, L., Kraas, W., Uebel, S., Jung, G., Tampe, R. (1997) The active domain of the herpes simplex virus protein ICP47: a potent inhibitor of the transporter associated with antigen processing. *J. Mol. Biol.* 272, 484-492.
- Newburger, P. E., Ezekowitz, R. A., Whitney, C., Wright, J., Orkin, S. H. (1988) Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85, 5215-5219.
- Novelli, F., Bernabei, P., Ozmen, L., Rigamonti, L., Allione, A., Pestka, S., Garotta, G., Forni, G. (1996) Switching on of the proliferation or apoptosis of activated human T lymphocytes by IFN-gamma is correlated with the differential expression of the alpha- and beta-chains of its receptor *J. Immunol.* 157, 1935-1943.
- Oliveira, S.C.S., Splitter, G.A. (1995) CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 25, 2551-2557.
- Ostrowska, H., Krukowska, K., Kalinowska, J., Orłowska, M., Lengiewicz, I. (2003) Lysosomal high molecular weight multienzyme complex. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8, 19-24.

- Otani, T., Nakamura, S., Toki, M., Motoda, R., Kurimoto, M., Orita, K. (1999) Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice *Cell. Immunol.* 198, 111-119.
- Ouellette, A.J. (1999) Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. *Am. J. Physiol.* 277, G257-G261.
- Ovaa, H., Kessler, B.M., Rolen, U., Galardy, P.J., Ploegh, H.L., Masucci, M.G. (2004) Activity-based ubiquitin-specific protease (USP) profiling of virus-infected and malignant human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 2253-2258.
- Paludan, S. R. (1998) Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship *Scand. J. Immunol.* 48, 459-468.
- Pastoret, P.P., Brochier, B. (1996) The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiol. Infect.* 116, 235-240.
- Paul, W.E. (2003) "The immune system: an introduction, 1-22" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Pearl, J. E., Saunders, B., Ehlers, S., Orme, I. M., Cooper, A. M. (2001) Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse *Cell. Immunol.* 211, 43-50.
- Perussia, B., Dayton, E. T., Fanning, V., Thiagarajan, P., Hoxie, J., Trinchieri, G. (1983) Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway *J. Exp. Med.* 158, 2058-2080.
- Pfefferkorn, E. R. (1984) Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81, 908-912.
- Pfeifer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Normark, S.J., Harding, C.V. (1993) Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359-362.
- Pien, G. C., Satoskar, A. R., Takeda, K., Akira, S., Biron, C. A. (2000) Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection *J. Immunol.* 165, 4787-4791.

- Pizon, V., Desjardins, M., Bucci, C., Parton, R.G., Zerial, M. (1994) Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J. Cell Sci.* 107, 1661-1670.
- Powis, S. J., Townsend, A. R., Deverson, E. V., Bastin, J., Butcher, G. W., Howard, J. C. (1991) Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* 354, 528-531.
- Propato, A., Cutrona, G., Francavilla, V., Ulivi, M., Schiaffella, E., Landt, O., Dunbar, R., Cerundolo, V., Ferrarini, M., Barnaba, V. (2001) Apoptotic cells overexpress vinculin and induce vinculin-specific cytotoxic T-cell cross-priming. *Nat. Med.* 7, 807-813.
- Rabinovitch, M. (1995) Professional and non-professional phagocytes, an introduction. *Trends Cell Biol.* 5, 85-87.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481-487.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide *J. Biol. Chem.* 266, 4244-4250.
- Ramachandra, L., Song, R., Harding, C.V. (1999) Phagocytic processing of antigens for presentation by class II major histocompatibility complex molecules. *Cell. Microbiol.* 1, 205-214.
- Ramana, C. V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H., Stark, G. R. (2000) Complex roles of Stat1 in regulating gene expression *Oncogene* 19, 2619-2627.
- Raulet, D.H. (2003) "Natural killer cells, 365-391" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Razzell, P. (1980) Edward Jenner's cowpox vaccine: the history of a medical myth. 2nd ed. Sussex: Caliban.
- Reis e Sousa, C., Germain, R.N. (1995) Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp. Med.* 182, 841-851.

- Reits E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J.W., Neefjes J. (2004) A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 20, 495-506.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W., Neefjes, J. (2003) Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18, 97-108.
- Reth, M., Wienands, J. (1997) Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 453-479.
- Ritz, J., Campen, T.J., Schmidt, R.E. (1985) Analysis of T-cell receptor gene rearrangement and expression in human natural killer clones. *Science* 228, 1540-1543.
- Roberts, J., Quastel, J.H. (1963) Particle uptake by polymorphonuclear leukocytes and Ehrlich ascites-carcinoma cells. *Biochem. J.* 89, 150-156.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Rock, K.L., York, I.A., Saric, T., Goldberg, A.L. (2002) Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* 80, 1-70.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Amigorena, S. (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell. Biol.* 1, 362-368.
- Roos, D., Bolscher, B. G. J., de Boer, M. (1992) Generation of reactive oxygen species by phagocytes van Furth, R. eds. *Mononuclear Phagocytes: Biology of Monocytes and Macrophages*, 243-253 Kluwer Academic Dordrecht, The Netherlands.
- Rosenberg, H.F., Gallin, J.I. (2003) "Inflammation, 1151-1169" Paul, W.E. *Fundamental Immunology* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Rossman, M. D., Maida, B. T., Douglas, S. D. (1990) Monocyte-derived macrophage and alveolar macrophage fibronectin production and cathepsin D activity. *Cell. Immunol.* 126, 268-277.

- Rudenko, G., Bonten, E., d'Azzo, A., Hol, W.G. (1995) Three-dimensional structure of the human 'protective protein': structure of the precursor form suggests a complex activation mechanism. *Structure*. 3, 1249-1259.
- Ruedl, C., Storni, T., Lechner, F., Bachi, T., Bachmann, M. F. (2002) Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur. J. Immunol.* 32, 818-825.
- Salazar-Mather, T. P., Hamilton, T. A., Biron, C. A. (2000) A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense *J. Clin. Invest.* 105, 985-993.
- Sangfelt, O., Erickson, S., Einhorn, S., Grander, D. (1997) Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines *Oncogene* 14, 415-423.
- Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M., Goldberg, A. L. (2002) An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3, 1169-1176.
- Schindler, C., Darnell, J. E., Jr (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway *Annu. Rev. Biochem.* 64, 621-651.
- Schindler, H., Lutz, M. B., Rollinghoff, M., Bogdan, C. (2001) The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4 *J. Immunol.* 166, 3075-3082.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A., Herzog, V. (2000) Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell. Biol.* 148, 1203-1212.
- Schoenberger, S.P., van der Voort, E. I., Krietemeijer, G. M., Offringa, R., Melief, C. J., Toes, R. E. (1998) Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells. *J. Immunol.* 161, 3808-3812.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. et Hume, D.A. (2004) Interféron- α : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163-189.
- Schuler, G., Steinman, R.M. (1997) Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J. Exp. Med.* 186, 1183-1187.
- Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.F., Meresse, S., Descoteaux, A., Desjardins, M. (1999) Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell. Microbiol.* 1, 19-32.

- Selenko, N., Maidic, O., Draxier, S., Berer, A., Jager, U., Knapp, W., Stockl, J. (2001) CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8⁺ cytotoxic T cells. *Leukemia*. 15, 1619-1626.
- Sen, G. C. (2001) Viruses and interferons *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 255-281.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N. (2002) ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483.
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., Rock, K.L. (2004) Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation In Vivo. *Immunity* 21, 155-165.
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., Rock, K. L. (1997) Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* 158, 2723-2730.
- Shiloh, M. U., MacMicking, J. D., Nicholson, S., Brause, J. E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., Nathan, C. (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase *Immunity* 10, 29-38.
- Snapper, C. M., Paul, W. E. (1987) Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production *Science* 236, 944-947.
- Song, R., Harding, C.V. (1996) Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J. Immunol.* 156, 4182-4190.
- Song, R., Porgador, A., Harding, C. V. (1999) Peptide-receptive class I major histocompatibility complex molecules on TAP-deficient and wild-type cells and their roles in the processing of exogenous antigens. *Immunology* 97, 316-324.
- St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F., Descoteaux, A. (1999) Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J. Immunol.* 163, 5505-5511.
- Steinhoff, U., Kaufmann, S.H. (1988) Specific lysis by CD8⁺ T cells of Schwann cells expressing Mycobacterium leprae antigens. *Eur. J. Immunol.* 18, 969-972.

Steinhoff, U., Schoel, B., Kaufmann, S.H. (1990) Lysis of interferon-gamma activated Schwann cell by cross-reactive CD8⁺ alpha/beta T cells with specificity for the mycobacterial 65 kd heat shock protein. *Int. Immunol.* 2, 279-284.

Strobl, B., Arulampalam, V., Is'harc, H., Newman, S. J., Schlaak, J. F., Watling, D., Costa-Pereira, A. P., Schaper, F., Behrmann, I., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., Horn, F., Heinrich, P. C., Kerr, I. M. (2001) A completely foreign receptor can mediate an interferon-gamma-like response *EMBO J.* 20, 5431-5442.

Strunk, R. C., Cole, F. S., Perlmutter, D. H., Colten, H. R. (1985) Gamma-interferon increases expression of class III complement genes C2 and factor B in human monocytes and in murine fibroblasts transfected with human C2 and factor B genes *J. Biol. Chem.* 260, 15280-15285.

Subklewe, M., Paludan, C., Tsang, M. L., Mahnke, K., Steinman, R. M., Munz, C. (2001) Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells. *J. Exp. Med.* 193, 405-411.

Subramaniam, P. S., Torres, B. A., Johnson, H. M. (2001) So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors *Cytokine* 15, 175-187.

Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., Remington, J. S. (1988) Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii* *Science* 240, 516-518.

Sweet, M. J., Hume, D. A. (1996) Endotoxin signal transduction in macrophages *J. Leukoc. Biol.* 60, 8-26.

Sweet, M. J., Stacey, K. J., Kakuda, D. K., Markovich, D., Hume, D. A. (1998) IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 263-271.

Takami, K., Takuwa, N., Okazaki, H., Kobayashi, M., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Dohi, M., Yamamoto, K., Nakamura, T., Tanaka, M., Nakahara, K., Takuwa, Y., Takizawa, H. (2002) Interferon-gamma inhibits hepatocyte growth factor-stimulated cell proliferation of human bronchial epithelial cells: upregulation of p27(kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 231-238.

Takasugi, M., Mickey, M.R., Terasaki, P.I. (1973) Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res.* 33, 2898-2902.

- Taniguchi, T., Takaoka, A. (2002) The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors *Curr. Opin. Immunol.* 14, 111-116.
- Tirosh, B., Furman, M.H., Tortorella, D., Ploegh, H.L. (2003) Protein unfolding is not a prerequisite for ER-to-cytosol dislocation. *J. Biol. Chem.* 278, 6664-6672.
- Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H.G., Foster, L., Karre K. (1989) Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340, 443-448.
- Tridandapani, S., Lyden, T.W., Smith, J.L., Carter, J.E., Coggeshall, K.M., Anderson, C.L. (2000) The adapter protein LAT enhances Fc gamma receptor-mediated signal transduction in myeloid cells. *J Biol Chem* 275, 20480-20487.
- Tsai, B., Ye, Y., Rapoport, T.A. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 246-255.
- Turner, J.D., Dockrell, H.M. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. *Immunology* 87, 339-342.
- van den Broek, M. F., Muller, U., Huang, S., Zinkernagel, R. M., Aguet, M. (1995) Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors *Immunol. Rev.* 148, 5-18.
- van Ham, S.M., Tjin, E.P., Lillemeier, B.F., Gruneberg, U., van Meijgaarden, K.E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T.H., Pappin, D.J., Trowsdale, J., Neefjes, J. (1997) HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr. Biol.* 7, 950-957.
- Van Kaer, L., Aston-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L., Tonegawa, S. (1992) TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules and CD4-8+ T cells. *Cell* 71, 1205-1214.
- Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D.W., Lucia, S.M., Dinauer, M.C., Mastroeni, P., Fang, F.C. (2000) Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 287, 1655-8.
- Verheijen, F.W., Palmeri, S., Hoogeveen, A.T., Galjaard, H. (1985) Human placental neuraminidase. Activation, stabilization and association with beta-galactosidase and its protective protein. *Eur. J. Biochem.* 149, 315-21.

- Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A., Deretic, V. (1997) Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. Biol. Chem.* 272, 13326-13331.
- Vicker, M.G. (1977) On the origin of the phagocytic membrane. *Exp. Cell Res.* 109, 127-138.
- Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C.B., Bucci, C. (1997) Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 4391-4397.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015-1068.
- Von Behring, E., Kitasato, S. (1890) Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Thieren. *Deutsche medizinische Wochenschrift.* 16, 1113.
- Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S., Liew, F. Y. (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase *Nature* 375, 408-411.
- Weisman, R.A., Korn, E.D. (1967) Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. I. Biochemical properties. *Biochemistry* 6, 485-497.
- Weiss, A., Samelson, L.E. (2003) "T-lymphocyte activation, 321-363" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., Ploegh, H.L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, 432-438.
- Wills-Karp, M., Khurana Hershey, G.K. (2003) "Immunological mechanisms of allergic disorders 1439-1479" in Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Wolf, P. R., Ploegh, H. L. (1995) How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 267-306.

- Xaus, J., Cardo, M., Valledor, A. F., Soler, C., Lloberas, J., Celada, A. (1999) Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis *Immunity* 11, 103-113.
- Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A. F., Cardo, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J., Celada, A. (2001) Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis *Immunobiology* 204, 543-550.
- York, I.A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., Rock, K. L. (2002) The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* 3, 1177-1184.
- Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M., Yoshida, T. O. (1994) IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 857-861.
- Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., Nakanishi, K. (1998) IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production *J. Immunol.* 161, 3400-3407.
- Young, H. A. (1996) Regulation of interferon-gamma gene expression *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 563-568.
- Young, H. A., Hardy, K. J. (1995) Role of interferon-gamma in immune cell regulation *J. Leukoc. Biol.* 58, 373-381.
- Zinkernagel, R.M. (2002) On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur. J. Immunol.* 32, 2385-2392.

Annexe 1 : reprints d'articles

International weekly journal of science

nature

www.nature.com

Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation

**Mathieu Houde, Sylvie Bertholet, Etienne Gagnon, Sylvain Brunet,
Guillaume Goyette, Annie Laplante, Michael F. Princiotta, Pierre Thibault,
David Sacks & Michel Desjardins**

Reprinted from Nature, Volume 425, September 25, 2003.

**Annexe 2. Curriculum vitae et liste des publications au cours
du doctorat et de la maîtrise**

Mathieu Houde, M.Sc., Étudiant au Ph.D.

CITOYENNETÉ: Canadienne
DATE DE NAISSANCE: 4 juillet, 1976, Sherbrooke, Québec, Canada
LANGUES: Français et Anglais

ADRESSE ACADÉMIQUE:

Université de Montréal
Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
2900 Edouard-Montpetit
Montreal (QC), Canada, H3T 1J4
Tél: 1-(514)-343-6111 ext.3113
Fax: 1-(514)-343-2459

EDUCATION:

- Sept. 2000-présent Doctorat en Pathologie et Biologie Cellulaire
Université de Montréal, Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Directeur de recherche: Michel Desjardins, Ph.D.
Thèse: Étude protéomique et fonctionnelle des mécanismes de présentation croisée des antigènes exogènes dans les macrophages
- Sept. 1998-Août. 2000 Maîtrise en Anatomie et Biologie Cellulaire
Université de Sherbrooke, Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire
Directrice de recherche: Nathalie Rivard, Ph.D.
Mémoire: Rôle de la MAP kinase p38 dans la prolifération et la différenciation des cellules intestinales humaines
- Sept. 1995-Avril 1998 Baccalauréat en Biologie avec spécialisation en Biotechnologie
Université de Sherbrooke

ENSEIGNEMENT ET EXPÉRIENCE DE TRAVAIL EN SCIENCE:

- 2000-présent Auxiliaire d'enseignement
Université de Montréal, Faculté de Médecine
Fonctions: supervision d'étudiants pré-gradués dans des examens et des révisions
- 2003 Conférencier invité "Maladies Parasitaires"
Collège Brébeuf de Montréal
Fonctions: conférence à un groupe de 75 étudiants en science
<http://www.brebeuf.qc.ca/cgi-bin/index.cgi?page=c2>

- 2001 Supervision d'un projet d'Expo-Science
Université de Montréal, Faculté de Médecine
Fonctions: supervision d'une étudiante du secondaire pour son projet scientifique pour la compétition d'Expo-Science québécoise; l'étudiant a reçu un prix consistant en un stage d'été à l'Université de Sherbrooke
- 2001 Conférencier pour le projet SEUR (Sensibilisation aux Études Universitaires et à la Recherche)
Université de Montréal, Faculté de Médecine
Fonctions: Accroître l'intérêt d'étudiants du secondaire pour les sciences
<http://www.seur.qc.ca>
- 2000-2001 Représentant des étudiants de doctorat du département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Université de Montréal
Fonctions: représenter les étudiants de doctorat du département au Comité des Études Supérieures, l'association étudiante AEGSFM et organiser des activités
- 1997 Étudiant d'été
Université de Sherbrooke, Service d'Endocrinologie
Fonctions: Étude des effets de l'hormone thyroïdienne sur les microtubules du cerveau foétal

BOURSES ET RÉCOMPENSES:

- 2004 Bourse de recherche pour études post-doctorales
Décernée par l'IRSC/CIHR, 45 000\$ par année
- 2004 Bourse de la fondation J.A. de Sève pour le doctorat
Décernée par l'Université de Montréal, 5000\$
- 2004 Sélectionné par le magazine MacLean's pour le numéro "the Best and the Brightest"
Choisi avec 24 autres jeunes canadiens parmi 400 candidats d'universités canadiennes.
<http://www.macleans.ca/webspecials/index.jsp;jsessionid=PPLJEAGEMHBB>
- 2004 Prix pour une présentation par affiche lors de la journée scientifique du département
Décernée par le département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, 100\$
- 2001-2003 Bourse Facultaire
Décernée par l'Université de Montréal pour le Doctorat, 9000\$ par année
- 2003 Travel Award pour la 43rd annual meeting of the American Society for Cell Biology
Décernée l'ASCB, 400\$ US
- 2003 Prix pour une présentation orale lors de la journée scientifique du département
Décernée par le département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université of Montréal, 200\$
- 2002 Prix pour une présentation orale lors de la journée scientifique du département
Décernée par le département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université of Montréal, 150\$
- 1999-2000 Bourse Facultaire
Décernée par l'Université de Sherbrooke pour la Maîtrise, 3000\$

- 1999 Prix Hans Selye, représentant de l'Université de Sherbrooke
3^e position, Décernée par le Club de Recherche Clinique du Québec.
- 1997 Bourse Facultaire
Décernée par l'Université de Sherbrooke pour un stage d'été en laboratoire, 2000\$

INTÉRÊTS DE RECHERCHE:

- Protéomique
- Interactions Hôte-pathogène
- Phagocytose
- "Cross-presentation" d'antigènes et stimulation du système immunitaire
- Machinerie ubiquitin/proteasome
- Évasion et persistance virale
- Signalisation cellulaire

TECHNIQUES DE LABORATOIRE:

- Analyses protéomique: Électrophorese 2D et analyses avec logiciels informatique (PDQuest, Image Master, DeCyder), manipulation de gels pour la spectrométrie de masse, Bioinformatique
- Électrophorèse "Blue Native": séparation de complexes protéiques de haut poids moléculaires
- Purification d'organelles
- Immunofluorescence microscopie confocale
- Microscopie électronique
- Culture cellulaire et transfections
- Techniques de biologie cellulaire standards: Westerns, IPs, etc.
- Techniques de biologie moléculaire standards: PCR, enzymes de restriction, band shift, etc.

PUBLICATIONS:

Houde, M., Dermine, J.-F., Thibault, P., Desjardins, M. (2004) Modulation of phagosome functional properties by interferon-gamma. *Article in preparation*

Dermine, J.-F., Goyette, G., **Houde, M.**, Turco, S., Desjardins, M. (2004) The survival of *Leishmania* in macrophages relies on the disruption of phagosome lipid microdomains by its lipophosphoglycan. *Article in preparation*

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, 425 : 402-406.*

*comments in *Nature*, 425 : 351-352, and *Nat Immunol*, 4 : 941-943.

*This article has been evaluated by the *Faculty of 1000* (www.facultyof1000.com) and has been given a factor of 11,4 "Exceptional". At the moment, this article is ranked 4th in the all-time ranking of the *Faculty of 1000*.

Laprise, P., Chailier, P., **Houde, M.**, Beaulieu, J.F., Boucher, M.J., Rivard, N. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem.* 277 : 8226-34.

Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C., Rivard, N. (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 MAP Kinase which regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem.* 276 : 21885-21894.

Charland, S., Boucher, M-J., **Houde, M.,** Rivard, N. (2001) Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *Endocrinology*, 142 : 212-128.

Yu, S-Y., Boudreau, F., Désilets, A., **Houde, M.,** Rivard, N., Asselin, C. (1999) Attenuation of haptoglobin gene expression by TGF β requires the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 259: 544-549.

PRÉSENTATIONS:

Présentations orales

Houde, M. ER-mediated phagocytosis: linking innate with adaptive immunity.

Endroit: Microbiology and Tumor Biology Center, Karolinska Institute, 23 janvier, 2004, Stockholm, Suède

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation.

Endroit: HUPO 2nd annual & IUBMB XIX joint world congress, 8-11 octobre, 2003, Montréal, Canada

Houde, M., Gagnon, E., Laplante, A., Brunet, S., Desjardins, M. Les phagosomes sont des organelles auto-suffisants pour la présentation d'antigènes croisées.

**Prix pour présentation orale, 2^e position

Endroit: 20^e journée scientifique du département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, 3 septembre, 2003, Montréal, Canada

Houde, M. Bertholet, S., Gagnon, E., Goyette, G., Laplante, A., Brunet, S., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. The phagosome is a self-sufficient organelle for antigen cross-presentation.

Endroit: 2003 Montreal Proteomics Network scientific advisory board meeting, 4-5 june, 2003, Montréal, Canada

Houde, M. Maladies Parasitaires et Protéomique. (Conférence à un groupe de 75 étudiants en science)

Endroit: Collège Jean-de-Brebeuf, 13 February, 2003, Montréal, Canada.

Houde, M. Laplante, A., Desjardins, M. Études des machineries protéiques du phagosome.

**Prix pour présentation orale, 3^e position

Endroit: 19^e journée scientifique du département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, 29 mai, 2002, Montréal, Canada

Houde, M. Le génome et le clonage.

Endroit: Forum International Science & Société, Collège Limoilou, 2-4 Novembre, 2001, Québec, Canada.

Houde, M. Diez, R., Thibodeau, J., Desjardins, M. Modulation du protéome du phagosome par IFN-g.

Endroit: 18^e journée scientifique du département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, 30 mai, 2001, Montréal, Canada

Houde, M. La protéomique. (conférence à 8 groupes d'étudiants du secondaire pour le projet SEUR)

Endroit: Polyvalente Louis-Riel, 20-22 février, 2001, Montréal, Canada

Houde, M., Desjardins, M. Rôle des phagosomes dans l'apoptose.

Endroit: Congrès scientifique de l'Association des Étudiants Gradués de la Faculté de Médecine (AEGSFM), Université de Montréal, 5 décembre, 2000, Montréal, Canada.

Affiches

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. **Award for poster presentation, 2nd position

Endroit: 21^e journée scientifique du département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, 20 mai, 2004, Montréal, Canada

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation.

Endroit: The 4th International Conference of the Canadian Proteomics Initiative, May 14-16, 2004, Montréal, Canada

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation.

Endroit: 2004 Montreal Proteomics Network scientific advisory board meeting, May 10-11, 2004, Montréal, Canada

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Mol Biol Cell.* 2003; 14 (suppl).

Endroit: 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, 13-17 décembre, 2003, San Francisco, CA, USA

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Laplante, A., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. Proteasome associates with phagosomes and regulates ubiquitinated phagosomal proteins.

Endroit: Keystone Symposia on macrophages and innate immunity, 1-4 février, 2003. Taos, NM, USA

Laprise, P., **Houde, M., Asselin, C., Beaulieu, J.-F., Rivard, N.** Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependant activation of the p38 MAP Kinase is involved in the regulation of intestinal cell differentiation by the homeobox gene Cdx2. *Mol Biol Cell.* 2000; 11 (suppl.): 60a.

Endroit: 40th American Society for Cell Biology Annual Meeting. 9-13 décembre, 2000. San Francisco, CA, USA

Houde, M., Asselin, C., Beaulieu, J.-F., Rivard, N. Involvement of p38 MAPK kinase in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology.* 2000; 118 (suppl. 2): 2903.

Endroit: Digestive disease week, 101th annual meeting of the American Gastroenterological Association. 21-24 mai, 2000. San Diego, CA, USA

Houde, M., Asselin, C., Rivard, N. Involvement of p38 MAP kinase in human intestinal cell differentiation. *Can J Gastroenterol.* 2000; 14(Suppl. A): 71A-72A.

Endroit: Canadian digestive diseases week, 39th annual meeting of the Canadian Association of Gastroenterology. 5-12 mars, 2000. Québec, Canada

Charland, S., **Houde, M., Rivard, N.** Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype SST2 in pancreatic cancer cells. *Can J Gastroenterol.* 2000; 14(Suppl. A): 71A-72A.

Endroit: Canadian digestive diseases week, 39th annual meeting of the Canadian Association of Gastroenterology. 5-12 mars, 2000. Québec, Canada

Houde, M. et Rivard, N. Rôle de la MAP kinase p38 dans la différenciation des cellules intestinales humaines. *Médecine Sciences*. 1999; 15(suppl. 2): 22.

Endroit: Club de Recherche Clinique du Québec, 41^e réunion annuelle. 14-16 octobre, 1999. Montebello, Québec, Canada

Houde, M. Rôle de la MAP kinase p38 dans la différenciation des cellules intestinales humaines.

Endroit: 28^e journée scientifique de la faculté de médecine, Université de Sherbrooke, 26 mai, 1999, Sherbrooke, Canada