

Université de Montréal

**Rôle du réticulum endoplasmique lors de la phagocytose
et l'implication de son recrutement sur les fonctions du
phagosome**

par

Etienne Gagnon

Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal

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, 2006

© Etienne Gagnon, 2006



Direction des bibliothèques

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 :

Rôle du réticulum endoplasmique lors de la phagocytose et l'implication de son recrutement
sur les fonctions du phagosome

Présentée par :
Etienne Gagnon

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Roger Lippé, président-rapporteur
Dr Michel Desjardins, directeur de recherche
Dr Luc Desgroseillers, membre du jury
Dr Albert Descôteaux, examinateur externe
Dr Marcelo Gottschalk, représentant du doyen de la FES

Résumé

La phagocytose est un processus permettant aux cellules du système immunitaire d'internaliser des particules de grosses tailles comme des microorganismes envahissant afin de les détruire. Les propriétés microbicides propres aux phagosomes sont acquises lors d'un processus de maturation impliquant des interactions transitoires avec les organelles de la voie endocytaire. Ceci permet l'acquisition de protéines reliées à l'acidification de la vacuole ainsi que plusieurs hydrolases responsables de l'activité lytique du phagosome. La phagocytose représente la première ligne de défense contre les infections et joue un rôle central dans la réponse immunitaire en permettant de relier l'immunité innée et adaptative tant sur le plan cellulaire qu'humoral. Elle accomplit ceci par l'apprêtement de peptides microbiens issus du processus de dégradation et le chargement de ces antigènes sur les CMH de classe II. Ces molécules présentatrices permettent l'activation de populations de lymphocytes T CD4⁺ qui, à leur tour, déclencheront le processus de production d'anticorps chez les lymphocytes B.

Malgré que le phagosome soit une organelle complexe démontrant un grand dynamisme lors de sa maturation, la majorité des études entreprises à son égard n'ont fait usage que d'une quantité très limitée de marqueurs protéiques. Afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble sur les machineries moléculaires présentes dans ce type d'organelle, une étude protéomique a été entreprise sur le phagosome. Cette étude a permis l'identification de plus de 150 protéines, dont la majorité avait été prédites comme étant associées à ce type d'organelle de dégradation. Cependant, plusieurs protéines n'avaient jamais été identifiées comme ayant un rôle à jouer lors de la phagocytose. Ceci est le cas pour plusieurs protéines du réticulum endoplasmique (RE), une organelle associée à la synthèse de protéines luminales, secrétées ou transmembranaires. Des résultats préliminaires publiés dans *The Journal of Cell Biology* ont démontré que ces protéines ne semblaient pas venir d'une contamination des échantillons de phagosomes analysés, suggérant ainsi un rôle potentiel au RE lors de la phagocytose (Garin et al., 2001).

Les objectifs du travail décrit ici étaient de faire le point sur la provenance des marqueurs du RE associés au phagosome et de démontrer qu'ils faisaient partie intégrante de cette organelle. Ceci a permis d'élaborer un nouveau modèle sur la phagocytose impliquant le RE lors de la formation du phagosome. Ce nouveau modèle, illustrant l'utilisation de diverses sources d'endomembranes lors de la phagocytose, permet aussi d'émettre des explications sur certains phénomènes jusque-là peu compris. Il a d'ailleurs servi à démontrer que la machinerie moléculaire fournie par le recrutement du RE permettait au phagosome d'acquérir une autonomie quant à l'apprêtement et le chargement de peptides exogènes sur les CMH de classe I, mode de présentation antigénique normalement associé au RE. Il permet aussi de fournir des explications sur les mécanismes régulant l'érythrophagocytose, phénomène relié à l'élimination de globules rouges sénescents qui implique le contrôle de la toxicité de l'hème et le métabolisme du fer par les macrophages. Enfin, il permet de mieux comprendre les mécanismes de survie employés par certains pathogènes intracellulaires qui réussissent à court-circuiter le processus normal de maturation du phagosome afin d'établir leur niche de réplication.

Mots-clés : phagocytose, réticulum endoplasmique, ciblage d'ARN messagers, traduction, présentation antigénique croisée.

Abstract

Phagocytosis is a process that allows certain cells of the immune system to internalize large particulate matter like invading microorganisms in order to kill and degrade them. The microbicidal properties associated to phagosomes are acquired through a maturation process requiring sequential fusion events with organelles from the endocytic pathway. This allows the acquisition of proteins needed for organelle acidification and many hydrolases responsible for the phagosome's lytic activity. Phagocytosis represents the first line of defense against infection and plays a crucial role in linking innate and adaptive immunity in both cellular and humoral responses. It accomplishes this task by generating peptides from the degradation of internalized microbial proteins and the loading these antigens onto MHC class II molecules in the phagosomes. These presenting molecules are used to activate populations of T CD4⁺ lymphocytes who in turn initiate the process of antibody production and secretion by B lymphocytes.

Although the phagosome is a very complex organelle displaying dynamic changes throughout its maturation process, most studies performed on this organelle have used a relatively low number of protein markers. In order to gain a more global view of the molecular machineries associated with this organelle, proteomics analyses of highly enriched preparations of phagosomes were initiated. These analyses have led to the identification of over 150 proteins associated with the phagosome, many of which were expected to be found in such degradative organelles. Nevertheless, a significant number proteins identified had never been shown to play a significant role in phagocytosis. This was the case for several proteins from the endoplasmic reticulum (ER), an organelle normally linked with protein synthesis of luminal and transmembrane nature. Preliminary results published in *The Journal of Cell Biology* seemed to show that the presence of these ER markers was not due to contamination, suggesting a possible role for the ER in phagocytosis (Garin et al., 2001).

The objectives described in this work were to elaborate on the nature of the presence of such ER markers in phagosomes and to show that these constituents were *bona fide* components of this organelle. These observations constituted the building blocks to develop a new model of phagocytosis implicating the ER during phagosome formation. This new model emphasizes the use of a diversity of endomembranes during phagocytosis and provides an explanation for several misunderstood phenomena. Indeed, ER-mediated phagocytosis allows for the acquisition of molecular machineries from the ER enabling the phagosome to become a self-sufficient organelle for cross-presentation. It also provides potential explanations for several mechanisms involved in erythrophagocytosis, heme toxicity control and iron metabolism in macrophages. Finally, it gives a more comprehensive picture on the survival strategies used by intracellular pathogens which are able to subvert normal phagosome maturation in order to establish their replication niche.

Keywords: Phagocytosis, endoplasmic reticulum, mRNA targeting, translation, antigen cross-presentation.

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XV
CHAPITRE I : INTRODUCTION ET REVUE LITTÉRAIRE	1
1 La réponse immunitaire.....	1
1.1 Immunité : Contexte évolutif	2
1.2 Immunologie : Contexte historique.....	3
1.3 Les cellules du système immunitaire	5
1.3.1 La lignée myéloïde	7
1.3.1.1 Macrophages	7
1.3.1.2 Cellules Dendritiques	9
1.3.1.3 Polymorphonucléaires.....	11
1.3.1.3.1. Mastocytes	11
1.3.1.3.2 Eosinophiles	12
1.3.1.3.3 Neutrophiles	12

1.3.2 Lignée lymphoïde.....	13
1.3.2.1 Lymphocytes T.....	13
1.3.2.1.1 Lymphocytes T CD4 ⁺	14
1.3.2.1.2 Lymphocytes T CD8 ⁺	15
1.3.2.2 Lymphocytes B	16
1.3.2.3 Cellules NK.....	17
2 La Phagocytose	19
2.1 Introduction.....	19
2.1.1 Découverte de la phagocytose.....	19
2.1.2 Évolution de la phagocytose	20
2.2 Récepteurs impliqués dans la phagocytose	22
2.2.1 Reconnaissance innée.....	22
2.2.1.1 Récepteurs saprophages (Scavenger receptors)	23
2.2.1.1.1 Classe A	23
2.2.1.1.2 Classe B.....	24
2.2.1.2 Récepteurs au β -glucan	24
2.2.1.3 Récepteurs aux mannoses	25
2.2.1.4 Les récepteurs circulants : les collectines	26
2.2.1.2.1 Lectine liant le mannose (MBL)	27
2.2.1.2.2 Protéines de surfactant A et D (SP-A, SP-D).....	28
2.2.2 Reconnaissance acquise	28
2.2.2.1 Les récepteurs aux composantes du complément (CR)	28
2.2.2.1.1 Le récepteur à la composante C3 du complément (CR3)	29
2.2.2.1.2 Le récepteur à la composante C4 du complément (CR4)	30
2.2.2.1.3 Le récepteurs à la composante C1q du complément (CR1q).....	30
2.2.2.2 Les récepteurs Fc (FcR)	31
2.2.2.2.1 Récepteur Fc γ (Fc γ R).....	31

2.2.2.2.2 Les récepteurs Fc α et Fc ϵ (Fc α R, Fc ϵ R)	32
2.4 Biogenèse du phagosome et maturation phagolysosomale	33
2.4.1 Rôles du cytosquelette d'actine	33
2.4.2 Recrutement de membranes lors de l'internalisation	35
2.4.3 Rôles des Rabs	37
2.4.3.1 Rab5	37
2.4.4 Acquisition et rôle de molécules microbicides	41
2.4.4.1 Pompes à protons	41
2.4.4.2 Hydrolases et lipases	42
2.4.5 Origines et rôles des radeaux lipidiques	42
2.4.5.1 Radeaux lipidiques phagosomaux	43
2.5 La modulation du phagosome par les pathogènes	46
2.5.1 Inhibition de maturation	46
2.5.1.1 <i>Salmonella enterica</i>	47
2.5.1.2 <i>Mycobacteria</i>	49
2.5.1.3 <i>Leishmania promastigote</i>	51
2.5.2 Survie dans les phagolysosomes	53
2.5.2.1 <i>Leishmania amastigotes</i>	53
2.5.2.2 <i>Coxiella brunetii</i>	54
2.5.3 Changement d'environnement	55
2.5.3.1 <i>Chlamydia trachomatis</i>	55
2.5.3.2 <i>Legionella pneumophila</i>	56
2.5.3.3 <i>Brucella sp.</i>	58
2.5.4 Échappement vers le cytoplasme	60
2.5.3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	60
3 La présentation antigénique	63
3.1 Mécanisme de présentation des antigènes endogènes par le CMH de classe I	63
3.1.1 Génération des peptides	64

3.1.2 Chargements de peptides et transport vers la surface	68
3.2 Mécanisme de présentation des peptides exogènes par le CMH de classe II	69
3.2.1 Génération des peptides	69
Figure 6. Modèle de présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe II.	71
3.2.2 Chargement de peptides et acheminement vers la surface.....	72
3.3 Présentation croisée des peptides exogènes par le CMH de classe I	74
3.3.1 Présentation croisée selon le modèle de la régurgitation	76
3.3.2 Présentation croisée selon le modèle du transit phagosome-cytosol-RE.....	77
4 Transport d'ARN messagers et contrôle de la traduction locale.....	79
4.1 Introduction.....	79
4.2 Transport et localisation d'ARN messagers.....	80
4.2.1 Éléments de ciblage agissant en <i>Cis et en Trans</i>	81
4.2.1.1 Ciblage de l'ARNm codant pour la β -actine.....	81
4.2.2 Le cytosquelette et les moteurs moléculaires.....	83
4.3 Contrôle local de la traduction	83
4.3.1 Répression traductionnelle lors du transport.....	84
4.3.2 Mécanismes de contrôle traductionnel.....	85
4.3.2.1 Contrôle de la traduction par mTOR.....	86
4.3.2.2 Contrôle de la traduction par CPE	86
4.3.2.3 Contrôle de la traduction FMRP	87
5. Objectifs de travail	89
La protéomique révèle la présence du réticulum endoplasmique : contaminant ou composante du phagosome?.....	89
CHAPITRE II : RÉSULTATS ARTICLE 1	91
Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages.....	92

CHAPITRE II : RÉSULTATS ARTICLE 2	139
Contribution of a sub-region of the endoplasmic reticulum in ER-mediated phagocytosis	140
CHAPITRE II : RÉSULTATS ARTICLE 3	151
Specific mRNA targeting to the phagosome allows for temporal and spatial translation.	152
CHAPITRE III : DISCUSSION	193
La protéomique des organelles : une boule de cristal à petite échelle.	193
De l'identification par protéomique de composantes du RE à la démonstration d'un nouveau concept pour la phagocytose.....	196
Le RE : une composante intégrale du phagosome.	196
Le recrutement du RE dans la phagocytose : un mécanisme régulé et spécifique.....	199
Le recrutement du RE lors de la formation du phagosome : un phénomène répandu.	202
Le RE dans la phagocytose : la clé passe-partout?	206
Le macrophage, un gros appétit avec un estomac limité.	207
L'Erythrophagocytose : contrôle de la toxicité de l'hème.	208
La présentation croisée d'antigènes exogènes.	209
La phagocytose médiée par le RE : mythe ou réalité?	214
Le rôle et l'implication du ciblage d'ARN messagers aux phagosomes.	219
CONCLUSION	224
BIBLIOGRAPHIE	I

Liste des tableaux

CHAPITRE II : RÉSULTATS ARTICLE 1	91
Table 1. ER-mediated phagocytosis is a widely used mechanism of entry in macrophages.....	137
CHAPITRE II : RÉSULTATS ARTICLE 3	151
Table I. Newly synthesized proteins identified using SILAC.	182

Liste des figures

CHAPITRE I : INTRODUCTION ET REVUE LITTÉRAIRE	1
Figure 1 : Cellules du système immunitaire.....	6
Figure 2 : Schéma de la maturation phagosomale.	39
Figure 3 : Voie de signalisation menant au réarrangement du cytosquelette d'actine....	40
Figure 4 . Modèle établi des mécanismes de subversion de la maturation du phagosome	48
Figure 5 . Modèle de présentation d'antigènes endogènes par le CMH de classe I.....	67
Figure 6 . Modèle de présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe II.	71
Figure 7 . Modèles de présentation croisée des peptides exogènes par le CMH de classe I	75
 CHAPITRE II : RÉSULTATS ARTICLE 1	91
Figure 1 . ER proteins are enriched in phagosomes.....	124
Figure 2 . Calnexin is degraded during phagolysosome biogenesis	125
Figure 3 . ER-mediated phagocytosis involves PI3K	126
Figure 4 . ER-phagosome interaction is regulated in part by the vacuolar proton pump ATPase.	127
Figure 5 . ER elements are present in pseudopodia during phagocytosis	128
Figure 6 . ER-mediated phagocytosis in a general mode of entry into macrophages. ...	129
Figure 7 . ER-mediated phagocytosis is not used for the internalisation of latex beads and <i>Leishmania</i> parasites in neutrophils.	130
Figure supplémentaire . Substrates of calnexin are present in phagosomes.	131
 CHAPITRE II : RÉSULTATS ARTICLE 2	139
Figure 1 . Calnexin luminal domain antibody and KDEL-GFP are inappropriate tools for the study of ER mediated phagosomal biogenesis.	148

CHAPITRE II : RÉSULTATS ARTICLE 3	151
Figure 1. Newly synthesized proteins are rapidly recruited to the phagosome.....	181
Figure 2. SILAC analysis reveals the identity of nascent proteins recruited to phagosomes	182
Figure 3. Recruitment of nascent proteins to phagosomes is an ER/Golgi independent mechanism.....	183
Figure 4. Exclusive targeting of newly-synthesized proteins to phagosomes is modulated during phagolysosome biogenesis.....	184
Figure 5. Active mRNA translation machinery is found on the phagosome.	185
Figure 6. Specific mRNAs are targeted to newly formed phagosomes.	186
Supplemental Figure 1. Experimental design.....	187
 CHAPITRE III : DISCUSSION	 193
Figure 8. Nouveau modèle des mécanismes de subversion de la maturation du phagosome impliquant le RE.	212
Figure 9. Modèle des voies de présentation d'antigènes exogènes par le phagosome..	213

Liste des abréviations

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ARF	Facteur de rybosylation ADP
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCR	Récepteur des lymphocytes B
BCV	Vacuole contenant <i>Brucella</i>
BFA	Brefeldin A
BSA	Albumine sérique de bœuf
CLIP	Class II-associated Ii peptide
CL-L1	Collectin-like protein L1
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMH-I	CMH de classe I
CMH-II	CMH de classe II
CMV	Cytomégalovirus
CR	Récepteur au complément
CRD	Carbohydrate recognition domain
CRP	Protéine C-réactive
CTL	Cellule T CD8 cytolytique
CTLA	Cytotoxic T lymphocyte activation antigen
DC	Cellule dendritique
dot	defect in organelle trafficking
EDEM	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like

EEA1	Early endosome antigen 1
EF-2	Elongation factor 2
eIF-4A	Initiation Factor 4A
ERAD	Dégradation associée au RE
FcR	Récepteur à la portion Fc de Ig
G-6-Pase	Glucose-6-phosphatase
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
	Gamma-Interferon-inducible Lysosomal Thiol
GILT	Reductase
GIPL	Glycosylinositolphospholipides
GMCSF	Granulocyte and macrophage stimulating factor
GPI	Glycophosphoinositol
GR	Globule rouge
GTP	Guanosine triphosphate
GTPases	Hydrolases de GTP
HO	Hème-oxygénase
hsp	Heat shock protein
icm	intracellular multiplication
Ig	Immunoglobuline
Ii	Chaîne invariante
IL	Interleukine
INF- γ	Interféron gamma
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JNK	kinase c-Jun N-terminal
LAMP	Lysosome-associated membrane protein 1

ICV	large cell variant
LIMK	LIM kinase
LL-O	Listeriolysine-O
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipophosphosaccharide
LRV	Vacuole répliquative de <i>Legionella</i>
ManLAM	Mannose-capped lipoarabinomannan
MAPKs	Protéines kinases activatrices-mitogènes
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
MASP	MBL associated serine protease
MBL	Mannose binding lectin
MCP	Phagosome contenant <i>Mycobacterium</i>
MR	Récepteur au mannose
NK	Natural killer
NO	Oxyde nitrique
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor
Omp	Outer membrane protein
PDI	Protein disulfide isomerase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PI-PLC	lipase phosphatidylinositol-spécifique C
PKC	Protéine kinase C
PLA2R	Récepteur à la phospholipase A2
PMN	Polymorphonucléaire
PRR	Récepteur de reconnaissance de patron
RAG	Recombination activation gene

RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
SAP	Protéine du sérum amyloïde P
SCV	Vacuole contenant <i>Salmonella</i>
sCV	Small cell variant
Sifs	Salmonella induced filaments
SNAREs	Soluble NSF attachment protein receptors
SP	Surfactant protein
SPI	Îlot de pathogénicité de <i>Salmonella</i>
SR	Scavenger receptor
SRCR	Scavenger receptor cystein rich domain
SRPR β	Signal recognition particle receptor beta
TACO	tryptophane aspartate-containing coat protein
TAP	Transporter associated to antigen presentation
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGF- β	Tumor growth factor beta
Th	Lymphocyte T helper
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor
Ub	Ubiquitine
VAMP	Vesicle-associated membrane protein
V-ATPase	Vacuolar proton pump ATPase
VCP	Valsolin containing protein
VIMP	VCP associated integral membrane protein
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
ZBP	Zipcode binding protein

*Je dédie ce travail à mon père et à ma mère
qui m'ont toujours dit que je pouvais
accomplir tout ce dont je désirais pourvu que
j'y travaille. Je le dédie aussi à Angélique
qui m'a permis de me donner à fond dans
mes recherches et qui a toujours été à mes
côtés.*

Remerciements

J'aimerais remercier les membres de ma famille ainsi que mes amis qui m'ont toujours supporté dans mes efforts en tant que futur chercheur. J'aimerais remercier particulièrement Angélique, ma douce, qui a traversé avec moi toute la gamme d'émotions qu'une maîtrise et un doctorat ont à offrir et qui s'est toujours trouvée à mes côtés, m'épaulant dans mes entreprises de chercheur. J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire qui ont fait preuve de beaucoup de patience envers moi à certains moments et qui ont rendu mes six années de recherche inoubliables. Je tiens à remercier Michel Desjardins, mon directeur de recherche, qui m'a permis de m'épanouir à ma plénitude en me donnant sa confiance très rapidement et me laissant présenter mes résultats lors de congrès internationaux. Finalement, je tiens à remercier tous les collaborateurs qui ont rendu possible les recherches présentées dans cette thèse.

Merci!

Chapitre I : Introduction et revue littéraire

1 La réponse immunitaire

La réponse immunitaire est un mécanisme de défense remarquable. Elle permet à l'organisme de contrer de manière rapide et spécifique les infections causées par une myriade de microorganismes potentiellement pathogènes (Medzhitov, 2003). Plusieurs exemples sont cités dans la littérature où le contexte d'une immunodéficiência sévère, dont les causes varient de la génétique à l'immunodéficiência acquise, engendre une incapacité de l'organisme à se défendre contre les infections (Medzhitov, 2003). Le rôle central de défense que possède le système immunitaire n'est pas unique. Il est aussi impliqué dans ce qui a trait aux rejets de tumeurs, de greffes allogéniques et potentiellement d'autres fonctions régulatrices corporelles. Chez les mammifères, la réponse immunitaire peut être séparée en deux mécanismes complémentaires : la réponse innée et la réponse adaptative (Paul, 2003).

La réponse immunitaire innée fait appel à la discrimination entre le soi et le non-soi par l'entremise de récepteurs permettant la reconnaissance de patrons saccharidiques ou lipidiques spécifiques normalement absents chez l'organisme hôte. Elle mène à la destruction du microorganisme envahisseur grâce à l'emploi de mécanismes moléculaires toxiques extracellulaires, comme la sécrétion de molécules lytiques, ou intracellulaires, comprenant l'internalisation du pathogène et sa dégradation par l'activité hydrolytique de protéines luminales. Ce type de réponse constitue donc la première ligne de défense afin de contrer l'établissement d'une infection par des microorganismes pathogènes (Medzhitov, 2003).

L'immunité adaptative se caractérise par le développement d'une réponse sur deux fronts, l'une est humorale et l'autre est cellulaire. La réponse humorale se caractérise par la production de protéines opsonisantes, appelées anticorps, produites de manière à reconnaître des épitopes spécifiques présents à la surface des pathogènes. Ceci a pour effet de neutraliser l'envahisseur et d'enclencher la réponse cellulaire (Paul, 2003). Comme il le

sera décrit plus tard, des phagocytes professionnels, munis de récepteurs capables de lier les molécules effectrices produites lors de la réponse humorale, ont la capacité de reconnaître les pathogènes recouverts de ces molécules et de les détruire à l'aide de plusieurs mécanismes.

De plus, la réponse immunitaire adaptative fait appel à la génération de populations de cellules mémoires qui se seront développées à partir d'une première infection. Un remaniement génétique de récepteurs ainsi qu'une survie prolongée de populations précises de lymphocytes B et T sont à la base du développement de la mémoire immunitaire (Paul, 2003). Les cellules mémoires permettront à l'organisme de se défendre de manière plus rapide et efficace lors d'infections subséquentes causées par les mêmes pathogènes ou par des pathogènes immunologiquement similaires. La capacité du système immunitaire de maintenir une population de cellules-réserves spécifiques permet aux organismes complexes de se défendre plus efficacement contre une infection récurrente et de s'adapter à de nouvelles infections leur assurant ainsi une meilleure chance de survie même dans un environnement où les pathogènes changent constamment.

1.1 Immunité : Contexte évolutif

Avec la complexification et la pluricellularisation des organismes vivants, la capacité de se défendre contre des parasites est vite devenue une pression de sélection additionnelle. L'aptitude d'un organisme à se défendre contre les agents infectieux s'est résumée pendant des millions d'années à l'utilisation de molécules opsonisantes ayant un effet neutralisant sur les envahisseurs par la coagulation des microorganismes opsonisés. L'augmentation de l'expression génique est apparue aussi très tôt comme moyen de défense contre les infections. Puis sont venues les molécules chimiotactiques et les molécules à cascades hydrolytiques de la famille du complément (Martin et al., 2003). La phagocytose, dont les bases moléculaires prennent racines chez l'amibe, a aussi fait son entrée comme

moyen de défense innée et regroupe plusieurs facettes de la réponse immunitaire rudimentaire déjà existante.

La réponse immunitaire adaptative est apparue chez les vertébrés à mâchoires il y a plusieurs millions d'années. La naissance de ce type de réponse est directement liée à l'appariation d'éléments de transposition contenant les gènes RAG1 et RAG2 dans la région variable (V) des gènes de la superfamille des immunoglobulines (Igsf) (Diaz et al., 1998; Flajnik et Du Pasquier., 2004). Cet événement innovateur a permis l'élaboration de groupes de récepteurs énormément diversifiés. Les analyses phylogéniques permettent de supposer que les ancêtres du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) seraient les premiers récepteurs apparus dans le contexte immunologique. Par contre, les ancêtres des CMH de classe I (CMH-I) seraient apparus avant, mais dans un contexte différent. Cette affirmation est basée sur le fait que les CMH-I sont plus plastiques et plus modelables que les molécules de classe II et que certains membres de cette famille, des paralogues, n'ont aucun rôle connu lors de l'élaboration d'une réponse immunitaire adaptative (Kasahara et al., 1996). Des analyses génétiques de poissons sans mâchoire ainsi que de deutérostomes pourront permettre de valider cette hypothèse ou d'élaborer une nouvelle hypothèse plus définie.

1.2 Immunologie : Contexte historique

Les premières évidences de la mise en pratique de techniques utilisant la réponse immunitaire comme moyen de traitement ou de prévention de maladies infectieuses apparaissent dans les annales de la 'Royal Society' d'après les descriptions données par un marchand anglais, John Lister, sur des rituels de vaccination observés en Chine en 1700. Ces rituels chinois d'inoculation auraient des racines remontant jusqu'au 5^e siècle ap. JC. Cette méthode, décrite plus tard par des prêtres Jésuites, consistait à réduire en poudre les galles pustulantes des malades atteints de la variole et de la faire aspirer par de jeunes

enfants. Plusieurs autres peuples ont mis en pratique ces formes primitives de vaccination qui ont été décrites dans de nombreux ouvrages britanniques (Paul, 2003).

C'est en 1798 qu'Edward Jenner tente de combattre la variole par la vaccination d'une forme atténuée du virus, la varicelle, retrouvée chez la vache. C'est d'ailleurs à partir du nom du virus de la vaccine, *Vaccinia*, que nous vient la terminologie vaccination. De plus, à ses débuts, l'emploi du terme vaccination était réservé au traitement de la variole. C'est avec la venue de Louis Pasteur, décrivant Jenner comme son prédécesseur, que le terme vaccin a été employé pour décrire l'inoculation prophylactique de virus atténués. Ces types de virus étaient obtenus par inoculation passagère dans d'autres espèces ou par traitements chimiques. Louis Pasteur, considéré comme le père de la vaccination, a permis l'élaboration de vaccins visant à traiter l'anthrax (1881), une maladie omniprésente à cette époque où l'agriculture était un métier répandu et source de cette maladie, ainsi que la rage (1885). Toutefois, les résultats engendrés par ces méthodes primitives de vaccination avaient souvent des effets secondaires très prononcés, voire mortels dans certains cas (Paul, 2003).

Quelques années plus tard (1888-1894), les travaux effectués par Von Behring et Kitasato démontrent que les propriétés antitoxiques de la vaccination peuvent être rendues possibles par le transfert de sérum d'un individu à un autre. L'ère de la sérologie était arrivée. Les premières descriptions de substances appelées anticorps ont fait leurs apparitions dans le vocabulaire des scientifiques de l'époque. La production de vaccins a alors connu un essor industriel. Plusieurs pays ont mis sur pied des centres de production visant à commercialiser ces sérums maintenant produits chez le cheval, permettant ainsi une plus grande production.

Enfin, c'est à cette même époque que Koch établit les bases de la microbiologie moderne avec l'élaboration de l'hypothèse que les maladies infectieuses étaient causées par

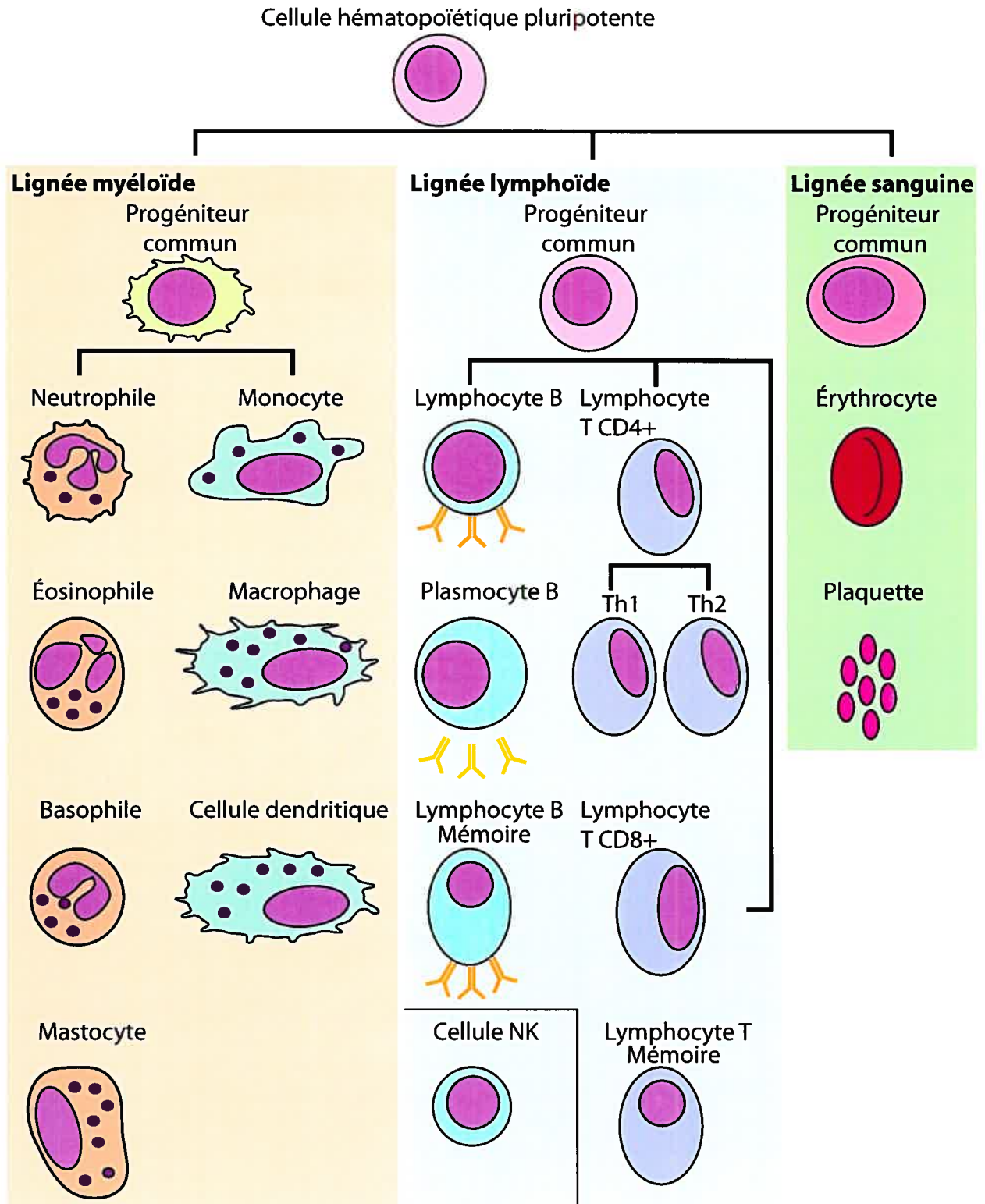
la présence de microorganismes pathogènes. Il démontra aussi que ces pathogènes engendraient chacun une pathologie particulière. Les microorganismes sont alors répertoriés selon quatre catégories : (1) les bactéries, (2) les virus, (3) les champignons et (4) les parasites eucaryotiques complexes. Cette représentation des microorganismes est toujours utilisée de nos jours (Paul, 2003).

1.3 Les cellules du système immunitaire

Les cellules du système immunitaire sont normalement retrouvées en circulation dans le sang et dans la lymphe ainsi que dans une collection d'organes lymphoïdes dispersés dans presque tous les tissus, sauf le système nerveux central où on ne retrouve pas tous les types de cellules immunitaires (Gendalman et al., 2002; Paul, 2003). Leur organisation anatomique de plus que leur capacité de transiter entre les tissus, le sang et la lymphe sont cruciales quant à la génération d'une réponse immunitaire efficace.

L'origine des cellules du système immunitaire prend racine à partir des cellules hématopoïétiques pluripotentes (Paul, 2003). Celles-ci sont responsables de la génération des érythrocytes (GR), des plaquettes et des progéniteurs de globules blancs (figure 1). On distingue deux grandes lignées de cellules progénitrices de globules blancs caractérisées par leurs lieux de génération et de maturation : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Chacune de ces lignées cellulaires produit de manière exclusive un ensemble de cellules spécifiques.

Figure 1. Les cellules du système immunitaire



1.3.1 La lignée myéloïde

Les cellules issues des progéniteurs communs myéloïdes sont responsables de la production de trois types cellulaires : les érythrocytes, les thrombocytes (plaquettes) ainsi que les leucocytes. Les leucocytes se caractérisent par le fait qu'ils participent principalement à l'élaboration de la réponse immunitaire innée. Ils forment la première ligne de défense contre les envahisseurs. On compte parmi ces cellules les macrophages, les cellules dendritiques et les polymorphonucléaires.

1.3.1.1 Macrophages

Les macrophages jouent le rôle le plus central en ce qui a trait à la réponse immunitaire innée et ont de multiples fonctions lors de la défense contre les infections. Les macrophages, retrouvés dans les tissus périphériques et plusieurs organes, se sont différenciés à partir de monocytes circulants (Bancroft et al., 1994; Paul, 2003). Les sites de résidence des macrophages permettent une rencontre très rapide avec les pathogènes lors de l'infection. Suite à cette rencontre, les macrophages emploient une variété de mécanismes antimicrobiens comme la phagocytose, la production et la sécrétion de substances réactives à base d'oxygène et d'azote ainsi que des peptides microbicides afin d'éliminer ces envahisseurs. De plus, l'interaction entre pathogènes et macrophages induit une pléthore de médiateurs pro-inflammatoires comme $\text{TNF-}\alpha$, et IL-1 (Abel et al., 1992). Lorsque présents à basse concentration, ces derniers induisent une réponse inflammatoire locale tandis qu'à haute concentration, ils induisent une réponse inflammatoire aigüe impliquant l'induction de gènes spécifiques du foie. IL-8, aussi produite suite à l'interaction entre macrophages et pathogènes (Agarmal, 1995), est un puissant facteur chimiotactique spécifique aux neutrophiles permettant leur recrutement au site de lésion.

La sécrétion de ces cytokines est induite suite à l'activation de récepteurs similaires aux Tolls (Toll-like receptors 'TLR') liés aux ligands présents à la surface des pathogènes (Quesniaux, 2004). La phagocytose, quant à elle, est déclenchée par l'activation de d'autres récepteurs de reconnaissance de patron (PRRs) (pour plus de détails, voir plus bas dans la section 2.2 Récepteurs) et engendre une élimination catégorique des microorganismes envahissant l'hôte.

Les fonctions du macrophage comme phagocyte professionnel, aussi diverses et importantes qu'elles soient du point de vue de l'activité antimicrobienne, sont aussi cruciales du point de vue du maintien de l'homéostasie. Un des rôles les plus marquants du macrophage est celui de charognard. Sa capacité de nettoyer l'organisme de cellules mortes ou apoptotiques (Messmer et al., 2000), des lipides oxydés ainsi que d'autres déchets métaboliques issus de la physiologie normale des organismes pluricellulaires, est à la base de ce maintien homéostatique (Allavena, 2004). Contrairement à la phagocytose et à la reconnaissance d'envahisseurs, l'activité de vidangeur des macrophages n'engendrent pas la production d'une réponse inflammatoire. Au contraire, cette réponse immunologique 'silencieuse' induit la production de cytokines anti-inflammatoires, tel TGF- β , permettant à l'organisme de se départir de déchets physiologiques sans déclencher une réponse immunitaire de grande envergure (Henson et al., 2001). Plusieurs récepteurs impliqués dans la discrimination entre le soi et le non-soi sont d'ailleurs retrouvés à la surface des macrophages. Ils sont décrits plus loin dans la section 2.2 Récepteurs.

En plus des fonctions mentionnées plus haut portant sur la discrimination entre le soi et le non-soi ainsi que la phagocytose et la destruction de pathogènes, le macrophage a aussi la caractéristique d'être une cellule présentatrice d'antigènes (CPA). Ces antigènes sont issus de la dégradation de microorganismes phagocytés ou de peptides étrangers présents dans l'environnement endocyté par les CPAs. La présentation d'antigènes aux cellules effectrices, les lymphocytes T CD4⁺, est primordiale et permet de faire le pont entre les réponses immunitaires innée et adaptative. Toutes les fonctions des macrophages

ont de plus la possibilité d'être modulées par des facteurs externes comme l'interféron gamma (INF- γ) afin d'améliorer l'efficacité de ces dernières (Paulnock et al., 2000; Schroder, 2004). Celui-ci aura pour effet d'augmenter les activités antimicrobiennes du macrophage tout en favorisant son efficacité de présentation antigénique (Roche et al., 1990).

1.3.1.2 Cellules Dendritiques

Il a longtemps été cru que le macrophage était la cellule accessoire de première importance pour l'activation de lymphocytes T lors de l'élaboration d'une réponse immunitaire humorale. Toutefois, dès 1973, des résultats démontrent la présence de cellules non-identifiées capables d'induire l'activation de lymphocytes T CD4⁺ de manière plus efficace que les macrophages (Steinman et Cohn, 1973). Ce n'est que 5 ans plus tard que l'identité de ces cellules ainsi que leur rôle dans la réponse immunitaire sont adéquatement décrits (Steinman et Witmer, 1978).

Les cellules dendritiques (DC) se répartissent sous deux grandes familles selon l'expression de deux marqueurs de surface CD11c et CD14. Les cellules destinées à résider dans l'espace interstitiel expriment les deux marqueurs et on dit qu'elles sont des DC CD11c⁺CD14⁺, tandis que les DC destinées à devenir des cellules de Langherans, retrouvées sous le derme, sont dites CD11c⁺CD14⁻ (Liu, 2001). Contrairement aux macrophages, les DC ne maintiennent pas leur capacité de phagocyter à travers leur processus de maturation (Sallusto et al., 1995). Elles n'ont cette capacité qu'au stade immature. C'est d'ailleurs la rencontre avec un pathogène ou un antigène circulant qui engendre le processus de maturation des DC. Celles-ci quittent le lieu de rencontre et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques ou la rate. L'activation et la maturation des DC engendrent l'augmentation d'expression des

molécules du complexe d'histocompatibilité majeurs (CMH) de type II ainsi que plusieurs molécules costimulatrices, ce qui donne à ces cellules un grand pouvoir activateur de lymphocytes T (Coyle et al., 2001).

Les DC jouent aussi un rôle primordial quant à l'ontogénie des lymphocytes T (Fairchild et Austyn, 1990). Lors du développement de l'organisme, elles agissent comme agents de sélection permettant la survie des lymphocytes T capables de répondre aux exigences de la sélection clonale. Les DC jouent aussi un rôle très important en ce qui a trait à l'immunotolérance tant au niveau de l'auto-immunité que les rejets de greffes (Lu et al., 2002; Thompson et al., 2002; Morel et al., 2003).

Il est intéressant de noter qu'il existe d'autres sources potentielles de DC que l'on retrouve chez certains mammifères ou qu'on peut induire *in vitro*. Chez la souris, il a été démontré que les DC pouvaient aussi provenir de la lignée de progéniteurs lymphoïdes *in vivo*. Ce type de DC exprime aussi à leur surface certains marqueurs de lymphocyte T, comme le CD8 α et résiderait principalement dans la rate. L'origine lymphoïde de DC humaines *in vivo* reste toutefois spéculative (Ardavin et al, 2001). On peut cependant obtenir des DC en culture à partir de monocytes traités avec des facteurs de croissance tels les facteurs de stimulation de colonies de macrophages et granulocytes (GM-CSF) et IL-4 en co-incubation. La migration transendothéliale est aussi utilisée comme agent différenciateur. La maturation des DC, quant à elle, est atteinte à l'aide d'une incubation avec du LPS bactérien (Sallusto et al., 1994; Schreurs et al., 1999). Les origines multiples possibles des DC, en plus de leur grande capacité de présentation antigénique, en font un joueur de première importance quant à l'élaboration d'une réponse immunitaire soutenue.

1.3.1.3 Polymorphonucléaires

Les polymorphonucléaires (PMN), communément appelés granulocytes, englobent plusieurs types cellulaires caractérisés par la présence d'un noyau polylobé et de granules de sécrétion dans le cytoplasme. On compte parmi ces membres : les éosinophiles, les mastocytes et les neutrophiles.

1.3.1.3.1. Mastocytes

Les mastocytes sont bien connus pour leur rôle lors de réactions allergiques, mais ils constituent aussi une part importante dans la réponse immunitaire innée. Ils sont trouvés en grande partie dans les tissus conjonctifs et les muqueuses, où ils rencontrent des microorganismes qu'ils ingèrent par phagocytose (Abraham et al., 1997). Par la suite, ils sécrètent des substances pro-inflammatoires permettant le recrutement d'une myriade de leucocytes aux sites d'infection. Parmi ces substances sécrétées, on retrouve le TNF- α et la leucotriène B4 (Caproni et al., 1999) toutes deux en grande partie déjà synthétisés et accumulés dans les granules de sécrétion. Ces agents chimiotactiques servent principalement au recrutement de neutrophiles et sont relâchés rapidement suite à l'interaction entre le mastocyte et le pathogène. De plus, les mastocytes sécrètent plusieurs cytokines, telles les cytokines de type II, IL-4 et IL-5 (Caproni et al., 1999), ainsi que des médiateurs pro-inflammatoires lipidiques. L'importance des mastocytes comme agents de protection contre l'infection a été démontrée à l'aide de lignées de souris hétérozygotes ayant une mutation au niveau du gène *c-kit*. Les souris Kit^w/Kit^{w-v} , comportant une mutation qui inactive le gène *c-kit*, sont essentiellement dépourvues de mastocytes et développent rapidement une péritonite septique aigue après inoculation de bactéries (Maurer et al., 1998).

1.3.1.3.2 Éosinophiles

Les éosinophiles matures sont normalement retrouvés dans les tissus : principalement dans les poumons, les intestins et les conduits génitaux (Wardlaw, 1995). Similaires aux mastocytes, ils sont riches en granules de sécrétion et produisent une multitude de cytokines et de médiateurs lipidiques. De plus, ils possèdent plusieurs protéines cationiques effectrices ayant des effets très toxiques contre les vers parasites (Root et Cohen, 1981). Contrairement aux macrophages et aux neutrophiles, les éosinophiles sont de pauvres phagocytes et déversent plutôt leur contenu lytique dans le milieu extracellulaire. Le fait que la production de protéines cationiques antiparasites et l'augmentation de l'éosinophilie (augmentation de la population d'éosinophile) sont induites lors d'infections parasites implique directement l'éosinophile comme effecteur principal lors de la défense contre ce type d'infection (Klion et al., 2004).

1.3.1.3.3 Neutrophiles

Les neutrophiles ont une espérance de vie très courte, variant entre 24 et 48 heures, et sont munis de nombreux effecteurs antimicrobiens (Borregaard, 2005; Segal, 2005). Contrairement aux macrophages, aux mastocytes et aux cellules dendritiques, les neutrophiles ne résident pas dans les tissus. Ils sont plutôt recrutés activement à partir de la circulation sanguine aux sites d'infection à l'aide de cytokines et de chémokines produites par les macrophages et les mastocytes résidents ayant fait la rencontre d'un pathogène (Yamashiro et al., 2001; Galligan et al., 2003). Les neutrophiles recrutés s'accumulent aux sites d'infections, phagocytent et tuent les pathogènes à l'aide d'une pléiade de mécanismes antimicrobiens (Segal, 2005). En plus de réactifs puissants à base d'oxygène et d'azote, les neutrophiles possèdent plusieurs protéines antimicrobiennes contenues dans des granules. On retrouve deux types de granules chez les neutrophiles. Les granules primaires, communément appelés granules azurophiles, contiennent des dérivés actifs d'azote sécrétés

dans l'espace extracellulaire (Roos et al., 2003; Lehrer et Ganz., 1990). Les granules secondaires contiennent des protéines antimicrobiennes spécifiques, telles que des hydrolases, et sont larguées dans le phagolysosome (voir plus bas dans la section 2.4 Biogenèse du phagosome et maturation phagolysosomale). Les neutrophiles, comme les macrophages et les cellules dendritiques, ont la capacité de présenter des antigènes aux cellules effectrices du système immunitaire, les lymphocytes T CD4⁺ (voir plus loin dans la section 3 Présentation antigénique), mais l'efficacité de présentation ne rivalise pas avec celle observée chez les autres phagocytes professionnels (Fanger et al., 1997; Radsak et al., 2000).

1.3.2 Lignée lymphoïde

Les cellules issues des progéniteurs communs lymphoïdes ont les caractéristiques de résider et subir leur activation au niveau d'organes lymphoïdes secondaires, comme la rate et les ganglions lymphatiques. Elles sont non-adhérentes et caractérisées par une petite forme ronde ayant un cytoplasme réduit. On retrouve parmi ce type de cellules les lymphocytes T, B et les cellules NK. Ce sont ces cellules qui médient la réponse immunitaire adaptative, tant au niveau humoral que cellulaire.

1.3.2.1 *Lymphocytes T*

Le développement de la majorité des lymphocytes T circulants se fait au niveau du thymus où ils connaissent une première étape de maturation et de prolifération (Silverstein, 1995). Lors de ces étapes, les loci codant pour les récepteurs T (TCRs) connaissent des réarrangements génétiques dans les domaines VDJ, ce qui entraîne le développement de populations très diversifiées de TCRs (Lin et Desiderio, 1995). Toutefois, l'organisme a mis en place des mécanismes de sélection permettant l'élimination de cellules comportant des TCR auto-immuns ou silencieux (Owen et al., 1990). La sélection des lymphocytes T

se fait en deux étapes : la sélection positive et la sélection négative. La sélection positive se fait au niveau cortical du thymus et assure la survie aux lymphocytes ayant des TCRs réarrangés pouvant interagir avec les CMH des cellules épithéliales du cortex thymique (Werlen et al., 2003). Les cellules ayant des TCR ne pouvant pas reconnaître les CMH à cette étape sont éliminées par manque de signaux de survie. Celles qui survivent ont donc la possibilité de réagir avec des immunogènes du soi et du non-soi étant donné leur capacité d'interagir adéquatement avec les CMH. Cependant, les cellules réagissant trop fortement avec les peptides du soi seraient maléfiques pour l'organisme entraînant ainsi le développement d'une réponse auto-immune. La sélection négative permet donc d'éliminer ces cellules hyper-réactives par la présentation de peptides du soi (Nossal et al., 1994). La sélection négative se fait au niveau du transit entre la région cortical et la médulla du thymus à l'aide de DC interdigitantes (Fairchild et Austyn, 1990). Les lymphocytes T qui survivent à cette deuxième étape de sélection quittent le thymus afin de résider dans les organes lymphoïdes secondaires où ils performent leur tâche d'immunovigilance. À ce stade, les cellules sont déjà présentes sous forme simple-positives (ISP), soit $CD4^+$ ou $CD8^+$ et sont restreintes à un certain type de présentation antigénique. Afin d'avoir une activation spécifique et complète des lymphocytes T, leur TCR doit non seulement être couplé aux molécules de restriction au CMH les CD4 et CD8, mais aussi à plusieurs autres récepteurs costimulateurs tels les membres de la famille CD3, le CD28 et le CTLA-4 pour en nommer quelques uns (Defresne et al., 1992).

1.3.2.1.1 Lymphocytes T $CD4^+$

En principe, les cellules T $CD4^+$ sont les médiateurs de la réponse immunitaire adaptative et régulent les facettes humorales et cellulaires. Elles se divisent sous deux classes, les 'T helper 1' (Th1) et 'T helper 2' (Th2) (Annacker et al., 2001). L'activation de ces lymphocytes T se fait suite à l'interaction soutenue du complexe TCR-CD4-récepteurs costimulateurs et d'un peptide immunogène chargé sur une molécule de CMH de classe II présent à la surface de cellules présentatrices d'antigènes (Konig et al., 2002; Wang 2002).

Les cellules activées sécrètent des molécules qui stimuleront les fonctions de phagocytes des macrophages (Th1) et/ou activeront directement les lymphocytes B à produire et sécréter des anticorps (Th2). Les lymphocytes Th1 régulent donc la facette cellulaire, tandis que les lymphocytes Th2 médient la facette humorale de l'immunité adaptative (Romagnani et al., 1999). Une fraction des lymphocytes T activés lors de la réponse immunitaire survit et se différencie en cellule mémoire, permettant à l'organisme de se défendre plus efficacement lors d'infections subséquentes (Sprent et al., 2002; Crotty et al., 2004).

1.3.2.1.2 Lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺, aussi connus sous le nom de cellules T cytotoxiques (CTL), sont responsables d'une partie de la réponse immunitaire adaptative cellulaire. Elles sont activées par l'interaction soutenue de leur complexe TCR-CD8-récepteurs costimulateurs et d'un peptide immunogène chargé sur un CMH de classe I présent sur toutes les cellules nucléées (Vallejo et al., 2004; Masopust et al., 2004). Cette activation mène à la sécrétion d'une variété de molécules toxiques dans le milieu proximal, comme les perforines, afin de détruire la cellule présentant l'épitope immunogénique. Étant donné cette restriction au CMH de classe I, le rôle des lymphocytes T CD8⁺ a longtemps été considéré limité à un mécanisme de défense associé aux cellules infectées par des virus ou aux cellules cancéreuses vu la nature endogène de l'immunogène (voir section 3.1 Présentation d'antigènes endogènes par le CMH de classe I) (Kagi et al., 1996; Wong et al., 2003). Toutefois, il a été démontré que la présentation de peptides exogènes sur des CMH de classe I par des cellules présentatrices d'antigènes permettait une activation différentielle des cellules T CD8⁺ (voir la section 3.3 Présentation croisée d'antigènes exogènes par le CMH de classe I) (Belz et al., 2002).

1.3.2.2 Lymphocytes B

Si les lymphocytes T sont décrits comme étant les médiateurs de la réponse immunitaire adaptative, les lymphocytes B, quant à eux, en sont les cellules effectrices (Paul, 2003). Leur développement à partir de cellules hématopoïétiques pluripotentes a été largement étudié à l'aide de multiples lignées transgéniques. Ces observations ont permis d'élaborer la théorie de la sélection clonale, premièrement associée à la production d'anticorps, mais qui sera aussi utilisée afin d'expliquer la sélection clonale des lymphocytes T (Paul, 2003). La complexité du développement des cellules B ainsi que la présence d'une grande diversité de sous-classes, comportant chacune des différences fonctionnelles, sont remarquables. Ce développement débute dans le foie chez le fœtus des mammifères et dans la moelle osseuse pour le reste de sa vie. Toutefois, des différenciations subséquentes peuvent se produire dans les organes lymphoïdes secondaires (Carsetti et al., 2004). La différenciation des cellules B est caractérisée par des réarrangements génétiques successifs de différentes portions de leur récepteur principal le BCR, aussi connu sous le nom d'immunoglobuline de surface (Zheng et al., 1998). Ce récepteur est formé de deux chaînes légères (les chaînes α) et de deux chaînes lourdes ancrées dans la membrane plasmique (les chaînes β). Les cellules atteignent la maturité avec l'expression de deux types d'immunoglobulines à leur surface, IgM et IgD (Inaba et al., 1990; Hentges et al., 1994). Toutefois, à ce stade elles sont toujours naïves et les immunoglobulines agissent comme récepteurs d'antigènes circulants.

L'activation des lymphocytes B se fait par une interaction soutenue avec les lymphocytes T. Une fois l'antigène capté par un BCR, les cellules procèdent à le présenter aux lymphocytes T $CD4^+$ préalablement activés par une CPA (Paul et al., 1987). Ceci induit, chez le lymphocyte T, la production de molécules costimulatrices et de cytokines qui activeront le lymphocyte B et permettront la production et la sécrétion d'anticorps. De plus, l'interaction entre la molécule costimulatrice de lymphocyte B CD40 et CD40L, ligand de préférence présent à la surface du lymphocyte T, provoque des réarrangements

génétiques additionnels au BCR. Ceci a pour but d'augmenter l'affinité (capacité de reconnaître l'antigène) et/ou l'avidité des anticorps produits (capacité d'activation, de signalisation) (Lipsky et al., 1997; Grammer et al., 2000). Ces réarrangements permettent au BCR de s'adapter aux types d'antigènes rencontrés et dictent le type d'anticorps qui sera produit. Ainsi, les cellules B produisent des IgG afin de combattre les infections bactériennes et virales, des IgA pour combattre les parasites unicellulaires et des IgE afin de combattre les vers (Paul, 2003). Les cellules B activées deviennent plasmocytaires et connaissent une expansion clonale sous la stimulation de CD40 et IL-4 (Kehry et al., 1996). Les plasmocytes produisent principalement des anticorps, perdent la capacité d'interagir avec les lymphocytes T et une fraction se différencie en cellules mémoires afin de combattre les infections subséquentes causées par les mêmes pathogènes (Banchereau et al., 1994).

1.3.2.3 Cellules NK

Les cellules NK (natural killer) forment une classe à part des lymphocytes B et T. Contrairement à ces derniers, elles n'expriment pas de récepteurs antigéniques issus de la sélection et l'expansion clonale. Une indication de ce fait vient d'études entreprises chez des patients atteints de déficiences génétiques au niveau de la V(D)J recombinase, enzyme responsable de la diversification des récepteurs B et T (Dorshkind et al., 1985). Toutefois, les cellules NK possèdent une grande variété de récepteurs leur permettant de discriminer entre la survie et la lyse des cellules avec qui elles interagissent (Moretta et al., 2004). Elles jouent un rôle important au niveau de la réponse immunitaire. Une fois activées, elles sécrètent des molécules lytiques, les perforines et granzymes, causant la lyse ou l'apoptose de la cellule ciblée d'origine cancéreuse ou infectée par un virus (Kubota et al., 1999; Arase et al., 2004; Sivori et al., 2004). Elles ont aussi la capacité de produire diverses cytokines pro-inflammatoires telles l'interféron- γ et le TNF- α (Bryceson et al., 2006). Ces cytokines

peuvent directement induire une activité antipathogénique chez les macrophages et les neutrophiles. Malgré qu'elles fassent partie de la lignée lymphoïde, leur rôle semble se concentrer davantage au niveau de la réponse immunitaire innée (Paul, 2003). Cette conclusion vient du fait que leur activité est plutôt observée aux stades précoces de la réponse immunitaire, qu'elle n'est pas liée à la production d'anticorps et qu'elle n'engendre pas la différenciation en cellule mémoire.

2 La Phagocytose

2.1 Introduction

Le terme phagocytose vient du mariage de deux mots grecs : ‘phagos’ qui veut dire manger et ‘cytos’ qui veut dire corps ou particule. La phagocytose définit donc le processus permettant à certaines cellules d’internaliser des particules de grosses tailles. C’est un mécanisme cellulaire que l’on retrouve chez une multitude d’espèces allant de l’unicellulaire aux mammifères et dont l’apparition remonte à plusieurs millions d’années (Muller et al., 1999; Hoffman et al., 1999).

2.1.1 Découverte de la phagocytose

Dans les années 1880, la théorie du microbe progresse et commence à se faire de plus en plus persuasive. En 1883, un zoologiste russe, Elie Metchnikov, suggère que des cellules spécialisées pouvaient attaquer des envahisseurs microbiens externes et les éliminer. Cette nouvelle théorie de la phagocytose faisant partie intégrante de la réponse immunitaire est à la base des concepts du soi et du non-soi élaborés plus tard par Burnet et fut, pendant un certain temps, en premier plan sur la scène médicale internationale (Paul, 2003). Docteur Metchnikov a principalement démontré l’existence de ce processus d’internalisation à l’aide de travaux fait en microscopie photonique, une technologie très à la mode à cette époque. Il est le premier à illustrer le modèle de la phagocytose démontrant l’attachement de la particule à la surface des phagocytes, l’invagination de la membrane plasmique et le détachement de la vacuole nouvellement formée qu’il nomma le

phagosome. Ce modèle restera inchangé pendant plus de cent ans (Paul, 2003; Desjardins et al., 2005).

2.1.2 Évolution de la phagocytose

Bien que la recherche sur la phagocytose mette l'emphase sur le contexte immunologique et les interactions hôtes-pathogènes, ce mécanisme d'internalisation est apparu bien avant le développement de la réponse immunitaire. En effet, c'est à l'amibe *Dictyostelium discoideum* que la phylogénie de ce processus remonte (Muller et al., 1999; Desjardins et al., 2005). L'amibe, un organisme unicellulaire, utilise la phagocytose afin d'ingérer les nutriments nécessaires à sa survie. Les particules ingérées par *Dictyostelium* sont rapidement ségréguées dans le compartiment membranaire qu'est le phagosome et le processus d'acheminement vers la dégradation s'apparente à celui retrouvé chez les phagocytes professionnels d'organismes supérieurs. Les conditions retrouvées dans le phagosome aux stades tardifs de maturation permettent la dégradation de molécules complexes, ce qui fournit des nutriments à l'amibe (Janssen et Schleider, 2001; Gotthardt et al., 2002). De plus, en ce qui a trait au matériel non-dégradé, il est relâché dans le milieu externe par un processus appelé égestion (Padh et al., 1993). Ce processus de nutrition a donc permis d'établir les bases moléculaires d'un mécanisme adéquat de 'digestion' à partir desquelles les fonctions physiologiques de la phagocytose prendront de l'expansion à travers l'évolution.

Chez les organismes pluricellulaires, la phagocytose a perdu la fonction nutritionnelle et s'est développée afin d'assurer le remodelage et l'homéostasie tissulaire. Ceci a été mis en valeur par l'étude d'un nématode, *Caenorhabditis elegans* (Gumienny et Hengartner, 2001). L'apoptose, un processus de mort programmée, est un événement clé lors de la différenciation tissulaire. Les cellules mortes engendrées par ce processus sont éliminées par phagocytose (Reddien et Horwitz, 2004). Chez *C. elegans*, cette phagocytose

n'est pas effectuée par des phagocytes professionnels, mais plutôt par une variété de cellules environnantes qui 'apprennent', au fur et à mesure que leurs voisins meurent, comment les phagocyter. Les cellules apoptotiques internalisées sont rapidement détruites et leurs composantes sont recyclées d'une manière similaire à celle retrouvée chez l'amibe. L'évacuation de quantités massives de cellules apoptotiques est aussi retrouvée chez les mammifères lors de l'embryogenèse. Malgré le fait que l'identité des cellules effectuant cette phagocytose reste à être élucidé, ces phagocytes ne semblent pas venir des lignées cellulaires hématopoïétiques d'où sont normalement issus les phagocytes professionnels (Lichanska et Hume, 2000). Chez le mammifère adulte, ce sont les macrophages qui entreprennent la tâche d'évacuer les cellules apoptotiques. Toutefois, ce processus qui n'engendre pas de réponse inflammatoire n'est pas perçu comme faisant partie de la réponse immunitaire (Aderem et Underhill, 1999, deAlmeida et Linden, 2005).

Chez la mouche des fruits, *Drosophila melanogaster*, on peut observer la présence de phagocytes professionnels, les hémocytes. Ceux-ci participent, de concert avec la réponse humorale, à la défense de l'organisme contre les infections. Ceci a été démontré à l'aide de mutations au niveau du gène *imd* (immune deficiency) qui ont causé une augmentation de la susceptibilité à l'infection des mouches suite à l'injection de bactéries dans la cavité abdominale (Elrod-Erickson et al., 2000). Les travaux des membres du laboratoire de Schneider ont démontré que les hémocytes, ayant préalablement phagocyté des billes de latex, étaient incapables de ré-initier le processus de phagocytose suite à l'injection de bactéries dans l'abdomen. Des analyses faites avec l'aide de bibliothèques de petits ARN interférant ont aussi permis d'établir une liste de gènes responsables du processus de la phagocytose chez la drosophile (Ramet et al., 2002). Ceci a permis d'établir les bases génétiques sur l'évolution de la discrimination entre le soi et le non-soi.

L'évolution a mené la phagocytose au cœur de la réponse immunitaire chez les mammifères. Elle permet non seulement l'élimination des dangers d'infections causés par

les pathogènes en les supprimant de la circulation, mais permet aussi de faire le pont entre l'immunité innée et acquise (Aderem et Underhill, 1999, Desjardins et al., 2003). Des peptides immunogènes, issus de la dégradation par phagocytose, sont acheminés vers la surface de cellules spécialisées afin d'être présentés aux cellules médiatrices de la réponse humorale (Jutras et Desjardins, 2005). Le fait que ce type de processus soit accompli par un groupe de cellules hautement spécialisées, dont les tâches se recoupent d'un groupe à l'autre, témoigne de l'importance de la phagocytose et de la présentation antigénique au sein d'un mécanisme de défense efficace contre les infections.

2.2 Récepteurs impliqués dans la phagocytose

Chaque cellule est munie de molécules à sa surface lui permettant d'interagir avec le monde extracellulaire. Chez les unicellulaires, ces récepteurs agissent principalement dans le but de permettre l'adaptation aux changements de l'environnement. Toutefois, chez les organismes pluricellulaires comme les mammifères, ces récepteurs permettent aussi aux cellules de communiquer entre elles ainsi que de discriminer entre ce qui appartient à l'organisme et ce qui vient de l'extérieur. Les phagocytes professionnels ont cette tâche de discrimination et sont munis d'une grande variété de récepteurs afin de l'accomplir. Étant donné le nombre élevé de récepteurs, nous nous concentrerons sur ceux impliqués dans la phagocytose. On peut séparer ces récepteurs selon qu'ils induisent la phagocytose de pathogènes recouverts ou non de molécules issues de la réponse immunitaire adaptative, aussi appelées opsonines.

2.2.1 Reconnaissance innée

Les récepteurs que l'on trouve dans cette catégorie ont la capacité de lier différents résidus selon le patron de glycosylation ou lipidique du ligand. Ils font partie de la famille

des récepteurs à reconnaissance de patron (PRR). Les membres de cette famille sont les récepteurs saprophages « scavenger », aux mannosés (MR) et aux β -glucans. De plus, il existe des molécules sécrétées, les collectines, qui permettent une amélioration de la reconnaissance de pathogènes par les phagocytes et qui seront aussi décrites dans cette section (Paul, 2003).

2.2.1.1 Récepteurs saprophages (Scavenger receptors)

Les récepteurs saprophages (SR) sont principalement retrouvés chez les macrophages et permettent la reconnaissance d'une grande variété de ligands d'origine lipidique, comme les lipoprotéines, et ont été impliqués lors du métabolisme des lipides. Cette fonction attribuée aux SR a longtemps été étudiée. Toutefois, il a aussi été démontré qu'ils pouvaient lier une variété de ligands allant de l'ADN jusqu'aux molécules inertes, ce qui pouvait initier la phagocytose. La famille des récepteurs saprophages comporte les classes A, B et C, malgré que les membres de la classe C ne semblent pas être impliqués dans de la phagocytose (Palcanda et Kobzik, 2001).

2.2.1.1.1 Classe A

Les membres de la classe A sont présents à la surface des macrophages de manière homotrimérique comportant un domaine N-terminal cytoplasmique et un domaine extracellulaire glycosylé fibreux de style 'coiled-coil'. Les récepteurs de type I et II, ainsi que MARCO, ont été impliqués dans la phagocytose (Jozefowski et al., 2005). Le domaine extracellulaire de type collagénique de ces récepteurs joue un rôle crucial lors de la liaison au ligand. Les récepteurs de type I et II, mieux connus sous les noms SR-A1 et SR-A2, sont impliqués lors de la reconnaissance et la phagocytose de particules recouvertes de lipophosphosaccharides (LPS) et d'acide lipothéichoïque, deux molécules retrouvées à la

surface de bactéries gram-négatif (Jozefowski et al., 2005). Il a aussi été démontré qu'ils étaient impliqués lors de la phagocytose de cellules apoptotiques. Le récepteur MARCO (macrophage receptor with collagenous structure), qui partage un domaine C-terminal riche en cystéines (SRCR) avec SR-A1, est impliqué lors de la phagocytose de bactéries et de particules inertes comme des billes de latex (Arredouani et al., 2005). Les domaines SRCR, faisant partie d'une super famille de 50 membres incluant CD6, ont permis de définir une famille conservée de protéines contenant des motifs riches en cystéines. Malgré le fait que les fonctions des domaines SRCR des récepteurs MARCO et SR-A1 restent à déterminer, il a été proposé qu'ils puissent médier un mécanisme additionnel de reconnaissance (Aruffo et al., 1997; Sarrias et al., 2004).

2.2.1.1.2 Classe B

Les membres de la classe B, CD36 et SR-BI, possèdent deux domaines transmembranaires dont les cystéines sont palmytoylées. Des expériences entreprises chez des cellules COS transfectées par CD36 ou Croquemort (homologue drosophilien de CD36/SR-B1) impliquent ces récepteurs dans la phagocytose de cellules apoptotiques (Franc et al., 1996). Étant donné que la séquence et la structure des récepteurs saprophages ne semblent contenir aucun motif de signalisation, leur rôle semble être associé majoritairement à la liaison de ligands, tandis que des molécules costimulatrices initient la phagocytose (Franc et al., 1999).

2.2.1.2 Récepteurs au β -glucan

Étant donné que la plupart des protéines retrouvées à la surface d'organismes vivants sont glycosylées, les phagocytes professionnels possèdent une grande variété de récepteurs capables de discriminer entre les patrons de glycosylation du soi et du non soi

(Paul, 2003). Ceci est possible dû au fait que les enzymes de glycosylation diffèrent grandement entre les microorganismes unicellulaires et pluricellulaires. Ainsi, les microbes ayant développé des stratégies leur permettant d'échapper aux effets opsonisants des anticorps et des composantes du complément peuvent toujours être reconnues comme des envahisseurs via leur patron de glycosylation de surface (Paul, 2003). Le modèle le plus utilisé afin de démontrer le rôle fonctionnel de tels récepteurs vient de la phagocytose de particules de zymosan, une composante de la couche externe de la levure *Saccharomyces cerevisiae* principalement composée de α -mannane/mannoprotéine et de β -glucan. Le récepteur principal du β -glucan est Dectin-1 et permet la reconnaissance de glucans liés β -1,3 et β -1,6 (Taylor et al., 2004). Premièrement identifié chez les cellules dendritiques, d'où lui vient le nom, ce récepteur a ensuite été démontré chez les cellules de la lignée myéloïde (Herre et al., 2004). C'est un récepteur transmembranaire de type I possédant un domaine extracellulaire de reconnaissance de carbohydrate (CRD) dans la région C-terminale ainsi qu'un motif ITAM cytoplasmique (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Adachi et al., 2004). Malgré que la voie de signalisation induite par l'activation de ce récepteur demeure inconnue, la présence d'un domaine ITAM permet de suggérer une signalisation par des tyrosines-kinases de la famille Src, patron de signalisation aussi retrouvé lors de la phagocytose médiée par les récepteurs Fc (figure 1) et MR (Herre et al., 2004).

2.2.1.3 Récepteurs aux mannoses

Cette famille de récepteurs comporte quatre membres dont MR (mannose receptor), PLA₂R (récepteur à la phospholipase A₂), DEC-205 et Endo180, dont seul MR a semble être impliqué dans la phagocytose (Stahl et Ezekowitz, 1998; Apostolopoulos et McKenzie, 2001; East et Isacke, 2002). Majoritairement retrouvé à la surface de macrophages, MR est un récepteur de type I contenant un motif riche en cystéine au domaine N-terminal, un domaine fibronectine de type II ainsi que 8 CRD de la famille de lectine de type C

(Ezekowitz et al., 1990; East et Isacke, 2002). Les différents CRD semblent posséder différentes affinités pour les résidus glycosylés. Il a d'ailleurs été démontré que le CRD4 du MR possède une affinité particulière pour le mannose. En plus de reconnaître les carbohydrates microbiens, il permet aussi l'endocytose de glycoprotéines de l'hôte riches en mannoses. Toutefois, sa fonction première demeure la reconnaissance et l'initiation de la phagocytose de microorganismes. Son implication dans la phagocytose a été démontrée à l'aide d'un essai de compétition entre l'internalisation de levures et l'endocytose de α -mannanes mis en solution. La phagocytose de microorganismes était fortement diminuée lors de l'ajout en excès de molécules compétitrices.

De plus, à l'aide de modèles transgéniques, des études ont démontré que le MR était impliqué dans la phagocytose de bactéries telles *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ; de levures telles *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* ; ainsi que des pathogènes protozoaires tel *Pneumocystis carinii* (Paul, 2003). Il a aussi été démontré que le domaine cytoplasmique de MR possédait un domaine ITAM pouvant initier à lui seul la phagocytose. Ceci a été accompli à l'aide de transfection d'une protéine chimère comportant le domaine extracellulaire du récepteur Fc γ et du domaine intracellulaire de MR (Kruskal et al., 1992). Cependant, les mécanismes d'action régulant la phagocytose par le MR sont encore mal définis. Ceci est dû au fait que plusieurs ligands bactériens sont similaires à certains résidus glycosylés de l'hôte (Paul, 2003). Il a donc été avancé que le MR pouvait travailler de concert avec les récepteurs similaires aux Toll (TLR) afin de procéder à une discrimination plus spécifique de patrons reconnus pouvant alors induire ou non la phagocytose (Paul 2003).

2.2.1.4 Les récepteurs circulants : les collectines

Malgré le fait que les phagocytes peuvent reconnaître des patrons saccharidiques du non-soi par une interaction directe entre récepteurs de surface et ligands menant à

l'initiation de la phagocytose, il existe aussi des récepteurs circulants pouvant lier des motifs saccharidiques présents à la surface de microorganismes : les collectines et les ficolines. Il n'y a cependant que les collectines qui aient montré une capacité à induire la phagocytose. Le rôle précis des ficolines demeure, quant à lui, spéculatif. Les collectines sont principalement retrouvées dans le sérum et dans le mucus, où les possibilités de rencontre avec un pathogène sont élevées. Elles forment un groupe de molécules structurellement liées aux PRRs : trouvées sous forme homotrimérique, caractérisées par la présence d'un CRD de type C lié aux lectines en C-terminal responsable de la fonction de reconnaissance et d'un domaine collagèneux en N-terminal impliqué au niveau des fonctions effectrices des protéines. Six membres de la famille des collectines ont été documentés à ce jour, dont la lectine liant le mannose (MBL), la protéine surfactant A (SP-A) et D (SP-D), la conglutinine, la collectine 43 et CL-L1 (Clark et al., 2000; Paul 2003).

2.2.1.2.1 Lectine liant le mannose (MBL)

La collectine MBL est de loin celle qui a été la plus décrite dans la littérature. Elle se lie de manière calcium-dépendante aux résidus terminaux de mannose et de fucose. Elle permet une meilleure reconnaissance de bactéries telles *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Escherichia coli* ; de mycobactérie telle *Mycobacterium tuberculosis* ; de levures telles *Candida neoformans* et *Candida albicans* ; de virus tels HSV (Herpes Simplex Virus) et HIV (Human Immunodeficiency Virus) ainsi que des pathogènes protozoaires tels *Trypanosoma cruzi* et *Pneumocystis carinii* (Paul 2003). La fonction première de MBL est d'activer la voie classique du complément (Jensenius, 2005). Elle est associée à deux protéases, MASP-1 et MASP-2 (Serine-protéases associées à MBL), qui deviennent activées lorsque MBL se lie à la surface microbienne (Gal et Ambrus, 2001; Thiel et al., 2000). L'activation des MASPs engendre le clivage de C2 et précipite la cascade d'activation du complément. De plus, MBL agit comme opsonine et

interagit directement avec le récepteur de C1q (CR1q), ce qui a pour effet de promouvoir la phagocytose de la particule opsonisée (Thiel et al., 2000).

2.2.1.2.2 Protéines de surfactant A et D (SP-A, SP-D)

Les collectines SP-A et SP-D sont majoritairement exprimées dans les poumons et sécrétées dans les fluides alvéolaires des voies respiratoires par les cellules épithéliales (Crouch et Wright, 2001). Tout comme MBL, elles se lient aux mannoses et fucoses terminaux ainsi qu'aux résidus N-acetyl glucosamine présents à la surface de microorganismes. Elles agissent comme opsonines favorisant la phagocytose des pathogènes par les phagocytes. SP-A, très similaire à MBL, interagit avec le CR1q afin d'induire la phagocytose tandis que SP-D, lui, se lie à Gp340 (Crouch et Wright, 2001). Toutefois, la liaison SP-D/Gp340 ne semble pas induire la phagocytose et son rôle dans un contexte immunitaire reste donc à élucider.

2.2.2 Reconnaissance acquise

Les récepteurs classés dans cette section permettent la reconnaissance de pathogènes ayant été recouverts de molécules produites lors d'une réponse immunitaire adaptative. Contrairement aux récepteurs utilisés pour la reconnaissance innée, ils sont souvent spécifiques à un ligand particulier.

2.2.2.1 Les récepteurs aux composantes du complément (CR)

Les protéines du complément sont trouvées de façon ubiquiste dans le sérum et sont capables d'opsoniser des agents infectieux via deux mécanismes complémentaires, ce qui mène généralement à la formation d'un pore lytique induisant la mort du microorganisme ciblé (Porter, 1985). En plus d'avoir des fonctions lytiques, ces protéines peuvent aussi

agir comme agents chimiotactiques ou opsonines permettant le recrutement de phagocytes professionnels et la promotion de la phagocytose. Malgré le fait que les CR soient incapables d'induire la phagocytose par eux-mêmes, ils sont utilisés comme facteurs costimulateurs pouvant augmenter l'index phagocytaire de manière significative. Trois récepteurs aux composantes du complément sont impliqués dans la phagocytose et sont : CR3, CR4 et CR1q (Carroll, 1998). Même s'ils ont été classés dans cette section, les CR sont aussi impliqués lors de la réponse immunitaire innée, car en plus de reconnaître la présence d'anticorps liés à la surface de pathogènes, ils peuvent aussi interagir avec certains patrons saccharidiques.

2.2.2.1.1 Le récepteur à la composante C3 du complément (CR3)

De loin le récepteur le mieux caractérisé de la famille des CR, CR3 est un hétérodimère de la famille des intégrines aussi connu sous le nom de $\alpha_m\beta_2$ intégrine, CD11b/CD18 et Mac-1 (Paul, 2003, Zeger et al., 1990). Il est exprimé chez les neutrophiles, les macrophages, les granulocytes, les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules NK. CR3 interagit directement avec le domaine A en C-terminal de iC3b, une opsonine centrale de l'activation de la cascade du complément (Paul, 2003). L'opsonisation d'iC3b à la surface de microorganisme peut se faire via une interaction spécifique avec des IgM pentamériques déjà présentes, ainsi que les IgG à moindre degré, ayant liées un épitope à la surface de l'envahisseur (Paul, 2003). Il peut aussi opsoniser un pathogène via une interaction non-spécifique avec des résidus de carbohydrates des glycoprotéines de surface à l'aide de son domaine de type lectine dans la région C-terminale de son domaine A (Palaniyar et al., 2002). Le rôle précis de CR3 pour la phagocytose est quelque peu controversé dû au fait qu'il n'enclenche pas une flambée oxydative, contrairement aux récepteurs Fc (Wright et Silverstein, 1983). Cette différence pourrait avoir des implications au niveau des stratégies de survie de certains pathogènes dont la phagocytose passe principalement par le CR3. Ceci a été mis en évidence par les

travaux d'Astarie-Dequeker et collègues, qui ont démontré que, contrairement à l'entrée médiée par les récepteurs Fc, la phagocytose de *Mycobacterium tuberculosis* via le CR3 n'induisait pas une flambée oxydative et permettait la survie du microorganisme (Astarie-Dequeker et al., 2002). Cependant, d'autres études doivent être menées à terme afin d'élucider les facteurs spécifiques d'une telle stratégie de survie.

2.2.2.1.2 Le récepteur à la composante C4 du complément (CR4)

Le CR4 est aussi un hétérodimère formé d'une chaîne α x et une chaîne β 2 identique à celle du CR3 (Paul, 2003). D'ailleurs, en plus de se lier à C4, CR4 reconnaît aussi iC3b nécessitant cependant des signaux additionnels afin d'initier la phagocytose. Cette signalisation additionnelle permet aussi l'augmentation d'expression et d'affinité des récepteurs aux composantes du complément, ce qui engendre une phagocytose accrue. La présence de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , certaines molécules d'adhésion ainsi que la présence de LPS peuvent promouvoir davantage l'expression de ce récepteur (Aderem et Underhill, 1999; Paul, 2003).

2.2.2.1.3 Les récepteurs à la composante C1q du complément (CR1q)

L'implication de CR1q pour la phagocytose est plutôt récente si on la compare aux autres CR. Son rôle semble principalement axé sur la phagocytose de cellules apoptotiques. Malgré le fait que son ligand de prédilection soit le C1q, il peut aussi interagir avec MBL, ainsi que d'autres opsonines du complément (C3b, iC3b et C4) (Kishore et Reid, 2000). La phagocytose médiée par le CR1q de cellules apoptotiques opsonisées de C1q a des implications directes dans le développement de l'auto-immunité. Il a été démontré que la présence de C1q à la surface de cellules apoptotiques permet l'internalisation de ces dernières par les phagocytes professionnels sans l'élaboration d'une réponse immunitaire humorale (Kishore et Reid, 2000; McGreal et al., 2002). Il a de plus

été documenté que des déficiences au niveau de l'expression de C1q étaient corrélées avec un risque accru de maladies auto-immunitaires (Sontheimer et al., 2005).

2.2.2.2 Les récepteurs Fc (FcR)

Les phagocytes professionnels expriment à leur surface une myriade de récepteurs à immunoglobulines appelés récepteurs Fc (FcR), car ils sont spécifiques pour la reconnaissance de la portion Fc des immunoglobulines. Il existe un type de FcR pour chaque isotype d'immunoglobuline (Paul, 2003).

2.2.2.2.1 Récepteur Fc γ (Fc γ R)

Les Fc γ Rs reconnaissent spécifiquement les IgG et forment le type de FcR le plus diversifié de cette famille de récepteurs, dû au fait que cet isotype d'immunoglobuline est celui le plus produit lors de la réponse immunitaire humorale. Toutefois, il a été documenté que le Fc γ R pouvait aussi lier d'autres molécules comme la protéine C-réactive (CRP) et la protéine du sérum amyloïde P (SAP), chacune impliquée la phagocytose (Bang et al., 2005; Mold et la., 2001). Les Fc γ Rs sont habituellement classés en deux catégories : les récepteurs activateurs et les récepteurs inhibiteurs (Cox et Greenberg, 2001). Les récepteurs activateurs recrutent des kinases de la famille Src via leur domaine cytoplasmique contenant une région ITAM. Ces kinases, une fois activées, permettent la phosphorylation de Syk, ce qui déclenche une cascade de signalisation menant à l'internalisation de la particule opsonisée d'IgG (Strzelecka-Kiliszek et al., 2002). Il existe trois classes de Fc γ R : le Fc γ RI, RII et RIII. Le Fc γ RI constitue le récepteur de haute affinité aux IgG monomériques, tandis que les récepteurs Fc γ RII nécessitent la dimérisation des IgG afin d'activer la cascade de signalisation (Cox et Greenberg, 2001). Dans cette famille, il existe aussi des récepteurs inhibiteurs que l'on retrouve principalement sur les lymphocytes B et T, de plus que sur certains phagocytes. Ces récepteurs, comme le

Fc γ RIIB, possèdent un domaine ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) qui permet le recrutement de phosphatases au lieu de kinases (Aderem et Underhill; 1999; Cox et Greenberg, 2001). Le rôle de ces récepteurs inhibiteurs est de contrôler le degré d'activation des lymphocytes B et protège principalement contre une réponse anaphylactique Ig-dépendante en empêchant la surproduction d'anticorps. Leur rôle fonctionnel chez le phagocyte est à ce jour inconnu, malgré le fait que la surexpression de récepteurs contenant le domaine ITIM bloque la phagocytose de particules opsonisées d'IgG.

2.2.2.2.2 Les récepteurs Fc α et Fc ϵ (Fc α R, Fc ϵ R)

Tout comme les Fc γ Rs, les Fc α R et Fc ϵ R possèdent des domaines ITAM cytoplasmiques permettant l'activation de cascades de signalisation lors de la liaison de leurs immunoglobulines respectives. Ils sont tous deux aussi capables d'initier la phagocytose ainsi que la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules exprimant ces types de FcRs sont principalement retrouvées au niveau des muqueuses intestinales et des voies respiratoires. Les FcRs sont impliqués lors d'une réponse immunitaire contre des parasites protozoaires ou vermiformes. Comme chez le Fc γ RIIB, le Fc ϵ RIIB est un récepteur à domaine cytoplasmique ITIM et procède au contrôle de la réponse immunitaire médiée par les IgE (Aderem et Underhill, 1999; Paul, 2003).

2.4 Biogenèse du phagosome et maturation phagolysosomale

Après que la particule ait été reconnue par les différents récepteurs, l'initiation de la phagocytose est engendrée suite à une cascade de signalisation, apportant plusieurs changements à la morphologie et la physiologie du phagocyte. Plusieurs composantes moléculaires et membranaires sont mobilisées afin de permettre l'internalisation de la particule, la formation du phagosome et la maturation en phagolysosome (Aderem et Underhill, 1999; Desjardins et al., 2003). Afin d'atteindre l'état de maturité, le phagosome subit une série d'événements de fusions séquentielles et transitoires avec les organelles de la voie endocyttaire. Lors de cette maturation, plusieurs protéines sont acquises et perdues, conférant ainsi aux phagosomes les propriétés nécessaires pour accomplir ses fonctions d'organelle de dégradation (Garin et al., 2001, Scott et al, 2003). Les composantes impliquées dans ces processus seront décrites dans les sections qui suivent (figure 2).

2.4.1 Rôles du cytosquelette d'actine

Le premier effet observable de l'initiation de la phagocytose est le réarrangement du cytosquelette d'actine corticale. Ceci permet à la cellule de mobiliser et de remodeler sa membrane plasmique afin de former des pseudopodes et de permettre l'internalisation de la particule. Lors de la maturation du phagosome, la réorganisation de l'actine permet aussi la motilité de cette organelle dans le cytoplasme.

Le réarrangement de l'actine cortical est engendré par l'activation des récepteurs de la phagocytose. L'exemple décrit dans les lignes qui suivent est celui de l'initiation de réarrangements d'actine suite à l'activation des récepteurs Fc (figure 3). Suite à l'interaction entre les FcRs et leur ligand, ces récepteurs se regroupent à la surface de la cellule sous la particule à être internalisée. Ceci permet la phosphorylation des domaines

ITAM des récepteurs et l'initiation de la cascade de signalisation menant à la réorganisation du cytosquelette. La phosphorylation des domaines ITAM permet le recrutement de la tyrosine kinase Syk, ce qui promouvoit l'activité de la PI3K au niveau de la coupe phagocytaire, causant une accumulation de phosphoinositides-3'phosphate (PI3P) (Aderem et Underhill, 1999; Scott et al., 2003). Ceci mène à l'activation de petites GTPases de la famille Rho : Rac-1 et Cdc42 (Niedergang et Chavrier, 2005). Ces GTPases sont particulièrement responsables de la formation de filopodes et de pseudopodes qui permettent l'engouffrement de la particule à la surface cellulaire. Autre que pour la phagocytose, elles ont aussi un rôle important au niveau de la motilité cellulaire. La polymérisation d'actine engendrée par l'activation de ces GTPases est principalement due à l'activation de protéines de nucléation d'actine (Castellano et al., 2001). La protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) est activée à l'aide d'une interaction GTP-dépendante avec soit Rac-1 ou Cdc42 et une forte concentration environnante de PIP₂ (Scott et al., 2005). Cette activation est due à un changement conformationnel lui permettant de quitter son état auto-inhibiteur. À l'état actif, WASP interagit avec le complexe ARP2/3, via son domaine C-terminal, lui permettant d'être recrutée à la coupe phagocytaire et d'initier la nucléation de l'actine (Castellano et al., 2001). La membrane plasmique adjacente à la particule est alors remodelée et la phagocytose est initiée.

Suite à la fermeture du phagosome, causée par l'extension des pseudopodes et la fusion des extrémités des pseudopodes qui entourent la particule à l'aide de l'activité GTPasique de dynamine 2 (Gold et al., 1999), une dépolymérisation contrôlée de l'actine entourant l'organelle se produit. Cette étape est cruciale, sinon le phagosome ne pourra interagir et fusionner avec les organelles de la voie endocytaire. La disparition de filaments d'actine associés aux phagosomes peut être causée par trois processus (i) le débranchement des filaments d'actine suite à la dissociation du phosphate de la forme ADP-Pi causé par l'hydrolyse de l'ATP des filaments, (ii) la troncation des filaments et (iii) la dépolymérisation terminale. Lors des étapes tardives de l'activité des GTPases Cdc42 et Rac-1, il y a activation de LIMK (LIM kinase) (Castellano et al., 2001). Cette protéine,

lorsque sous forme active, permet la phosphorylation de cofilin, ce qui initie une dépolymérisation terminale des filaments d'actine (Matsui et al., 2002).

En plus d'observer une dépolymérisation de l'actine environnant le phagosome nouvellement formé, on remarque aussi une perte significative de la machinerie moléculaire associée à la membrane du phagosome et responsable de la nucléation de l'actine. Il a été démontré que coronine, une protéine initialement identifiée chez *Dictyostelium*, avait la capacité de lier de façon transitoire la membrane de la coupe phagocytaire et causait une perte locale de filaments d'actine lorsqu'elle s'en dissociait (Maniak et al., 1995). Il a été suggéré que la disparition de l'actine était causée par la perte de la machinerie de nucléation d'actine couplée à coronine plutôt qu'à une dépolymérisation locale. Ceci a été élaboré suite à des expériences faites chez des macrophages humains ayant démontré que l'homologue de coronine, TACO (tryptophane aspartate-containing coat protein), était maintenu à la membrane du phagosome par le parasite *M. tuberculosis* (Ferrari et al., 1999). Ceci entraînait le maintien d'une enveloppe d'actine autour du phagosome et inhibait la fusion membranaire avec les organelles de la voie endocytaire. Malgré que les événements menant à la réorganisation du cytosquelette d'actine soient de mieux en mieux décrits, plusieurs questions demeurent quant à la signalisation et au contrôle précis de cette organisation dynamique. Entre autres, quelles régions de la membrane du phagosome sont suscitées lors de la nucléation de l'actine et quels intermédiaires agissent pour spécifier cette localité? La présence de radeaux lipidiques dans la membrane phagosomale fournit peut-être une réponse à ces questions. L'origine et rôle des radeaux lipidiques lors de la formation et la maturation du phagosome seront discutés plus loin dans la section 2.4.5.

2.4.2 Recrutement de membranes lors de l'internalisation

Tel qu'il a été décrit plus haut, la phagocytose est initiée par une réorganisation de l'actine corticale causant un remodelage de la membrane plasmique et menant à l'internalisation de la particule. Ce modèle de phagocytose impliquant la membrane

plasmique comme étant la seule source de membrane pour la formation du phagosome a été établi par Elie Metchnikov il y a plus de cent ans (Desjardins et al., 2003). À travers les recherches faites depuis, une image plus complexe de ce processus émerge. Entre autres, il a été décrit que certains phagocytes, comme les macrophages, avaient un appétit si gargantuesque qu'ils étaient capables de phagocyter des particules faisant une fois et demie leur propre taille (Cannon et Swanson, 1992). Dans la mesure où la cellule n'aurait à sa disposition que sa membrane plasmique pour former ce gigantesque phagosome, cela causerait de sérieuses complications quant au maintien de l'intégrité de la barrière intra/extracellulaire. Or, il a aussi été décrit que les macrophages, malgré le fait qu'ils étaient capables d'internaliser des centaines de particules, maintenaient une morphologie semblable à celle d'une cellule n'ayant pas effectué de phagocytose (Braun et Niedergang, 2006). Il a donc été proposé que d'autres membranes puissent être utilisées afin de former le phagosome. Les premières évidences sont survenues suite à des expériences permettant la mesure de la capacitance de la membrane plasmique de phagocytes lors de la phagocytose. Ces résultats démontrent que la surface cellulaire augmente lors de la phagocytose, ce qui implique une insertion directe de membrane (Hackam et al., 1998; Holevinsky et Nelson, 1998). Des travaux effectués chez les macrophages ont par la suite démontré l'exocytose de lysosomes près ou sous la coupe phagocytaire lors de l'internalisation de *T. cruzi* (Tardieux et al, 1992). Il a aussi été rapporté que des granules azurophiles étaient sécrétés lors de la phagocytose chez les neutrophiles (Suzaki et al., 1997).

Ce nouveau mécanisme appelé exocytose focale a largement été décrit par les travaux des membres du laboratoire de Grinstein (Bajno et al., 2000; Booth et al., 2001). À l'aide d'un modèle de phagocytose frustrée, où des phagocytes professionnels sont déposés sur un substrat solide contenant des anticorps opsonisés, ils ont été capables de démontrer la présence de marqueurs d'endomembranes ancrés dans la membrane plasmique. De plus, des expériences faites à partir de mutants dominant-négatifs de Rab11, une GTPase impliquée au niveau du recyclage d'endosomes, ont démontré une diminution prononcée de

l'index phagocytaire, ce qui suggère fortement un rôle potentiel pour cette protéine dans le recrutement de vésicules de recyclage lors de la phagocytose (Cox et al., 2000). Une autre protéine impliquée dans le recyclage endosomal, ARF6, aurait aussi un rôle clé dans ce processus afin de permettre le recrutement de ce type de vésicules (Niedergang et al., 2003). D'autres marqueurs impliqués dans le recyclage endosomal ont été identifiés sur le phagosome et auraient un rôle à jouer pendant la phagocytose. On compte parmi ces protéines une nouvelle isoforme d'amphiphysine II ainsi que VAMP3 (Gold et al., 2000; Niedergang et al., 2003). Toutefois, la quantité de membrane fournie par ces mécanismes ainsi que leur importance pour le processus de la phagocytose dans un contexte d'infection restent à déterminer. Comme de fait, il a été démontré que certains microorganismes, comme *Salmonella*, pouvaient être phagocytés par les mutants dominant-négatifs de Rab11 (Braun et Niedergang, 2006). L'identité de sources de membranes additionnelles demeure toujours sujette à plusieurs hypothèses.

2.4.3 Rôles des Rabs

Afin que le phagosome puisse atteindre son état de maturité, il doit interagir et fusionner de façon transitoire avec les organelles de la voie endocytaire. La gestion de ces mécanismes de fusion fait appel à des cibles moléculaires, les SNAREs (Soluble NSF attachment protein receptors), et à des promoteurs de fusion, les petites protéines GTPasiques de la superfamille Ras (Tjelle et al., 2000). Des travaux effectués par Duclos et collègues ont permis de mieux comprendre la complexité des interactions modulant ce type de fusion rencontrée lors de la biogenèse du phagolysosome (Duclos et al., 2000).

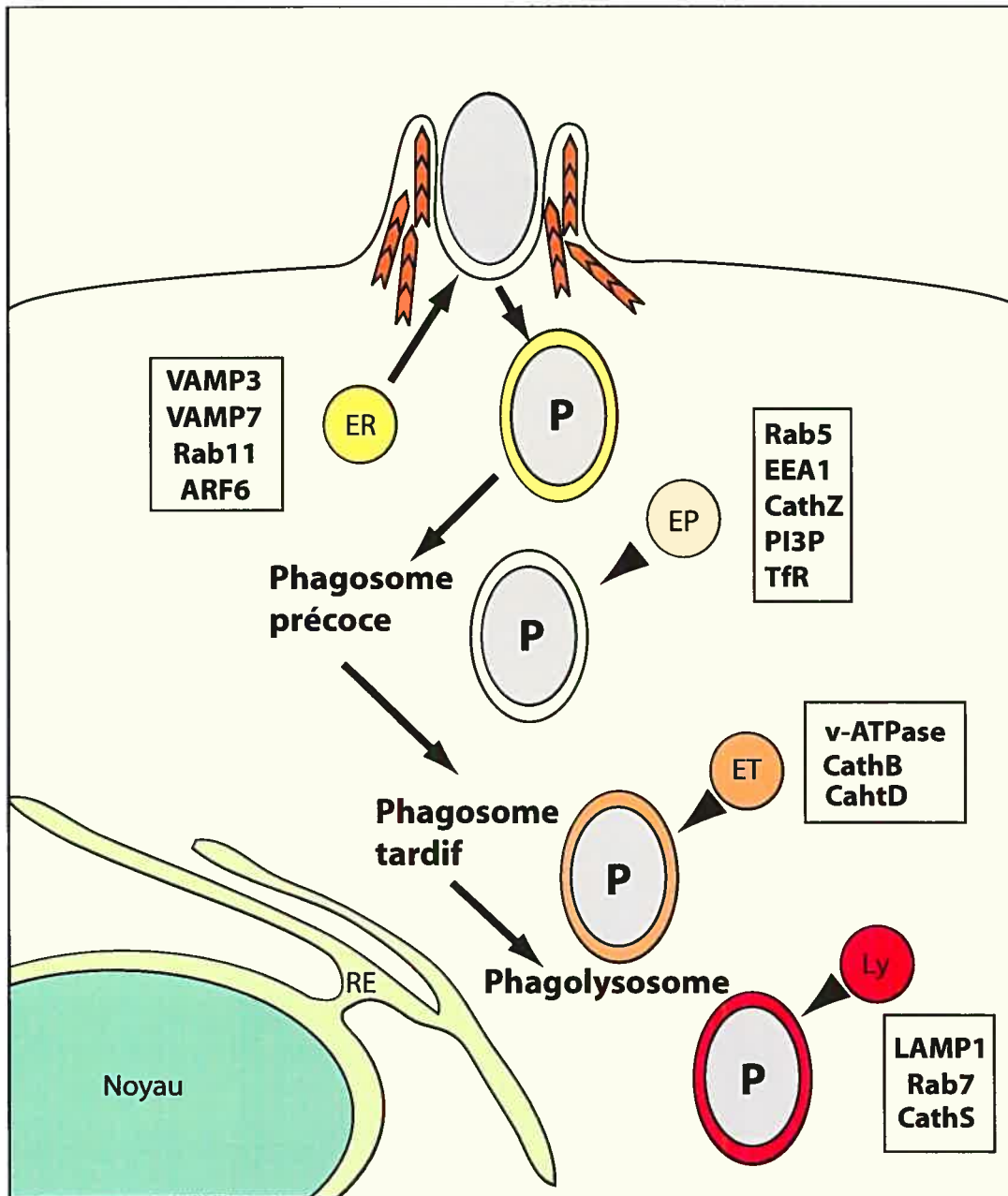
2.4.3.1 Rab5

La protéine Rab5 est retrouvée principalement au niveau des endosomes précoces et module la fusion endosome-endosome. Toutefois, lors de la phagocytose, elle se trouve associée de manière transitoire aux phagosomes nouvellement formés. Il a été démontré que ce recrutement était régulé par la PI3K lors de la formation du phagosome. En effet, il

a été décrit que l'initiation de la phagocytose causait l'accumulation de PIP₃ au niveau de la membrane du phagosome. Une protéine de rapprochement, nommée EEA1 (Early Endosome Antigen 1), possède un domaine de liaison au PIP₃, lui permettant d'être recrutée à la membrane du phagosome, ainsi que deux sites de liaison à Rab5. Ceci permet le recrutement de Rab5 à la membrane de l'organelle (Lawe et al., 2002). À l'aide de protéines de type SNARE, comme syntaxine 13, de la présence de NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) et d'un facteur d'échange de nucléotide Rabex-5, l'activation de Rab5 est complétée et l'événement de fusion est déclenché (McBride et al., 1999; Lippé et al., 2001). La fusion entre ces deux organelles permet le transfert bidirectionnel de molécules présentes dans la lumière et dans les membranes de chacune des vésicules.

Cependant, la fusion entre le phagosome et l'endosome n'est pas complète. Des expériences en vidéo microscopie ont démontré la présence d'interactions transitoires entre ces deux types d'organelles. De plus, à l'aide d'expériences faites en microscopie électronique, où des cellules avaient endocyté de la BSA (Bovine Serum Albumin) couplée à des particules d'or de différentes tailles avant la phagocytose de billes de latex, l'équipe de Desjardins a pu démontrer un transfert sélectif des particules d'or selon leur taille, les plus petites étant transférées de façon préférentielle, vers le phagosome lors des événements de fusion (Duclos et al., 2003). Ce type d'interaction nommé 'kiss and run' a permis de comprendre comment les phagosomes ne devenaient pas immenses suite à de multiples fusions avec les organelles de la voie endocytaire. Il a aussi été démontré que l'alternance entre les formes GTP et GDP de la petite GTPase Rab5 est responsable de la régulation de la fusion transitoire entre les endosomes et les phagosomes précoces (Duclos et al., 2003). La GEF associée à Rab5, Rabex-5, permet le contrôle de la transition entre ces états. Ces travaux ont d'ailleurs permis d'établir les bases moléculaires régulant non seulement les fusions transitoires entre phagosomes et endosomes, mais aussi plusieurs autres types de fusion allant de la formation de lysosome à la sécrétion vésiculaire (Duclos et al., 2003).

Figure 2. Schéma de la maturation phagosomale.



ER= Endosomes de recyclage

EP= Endosomes précoces

ET= Endosomes tardifs

Ly= Lysosomes

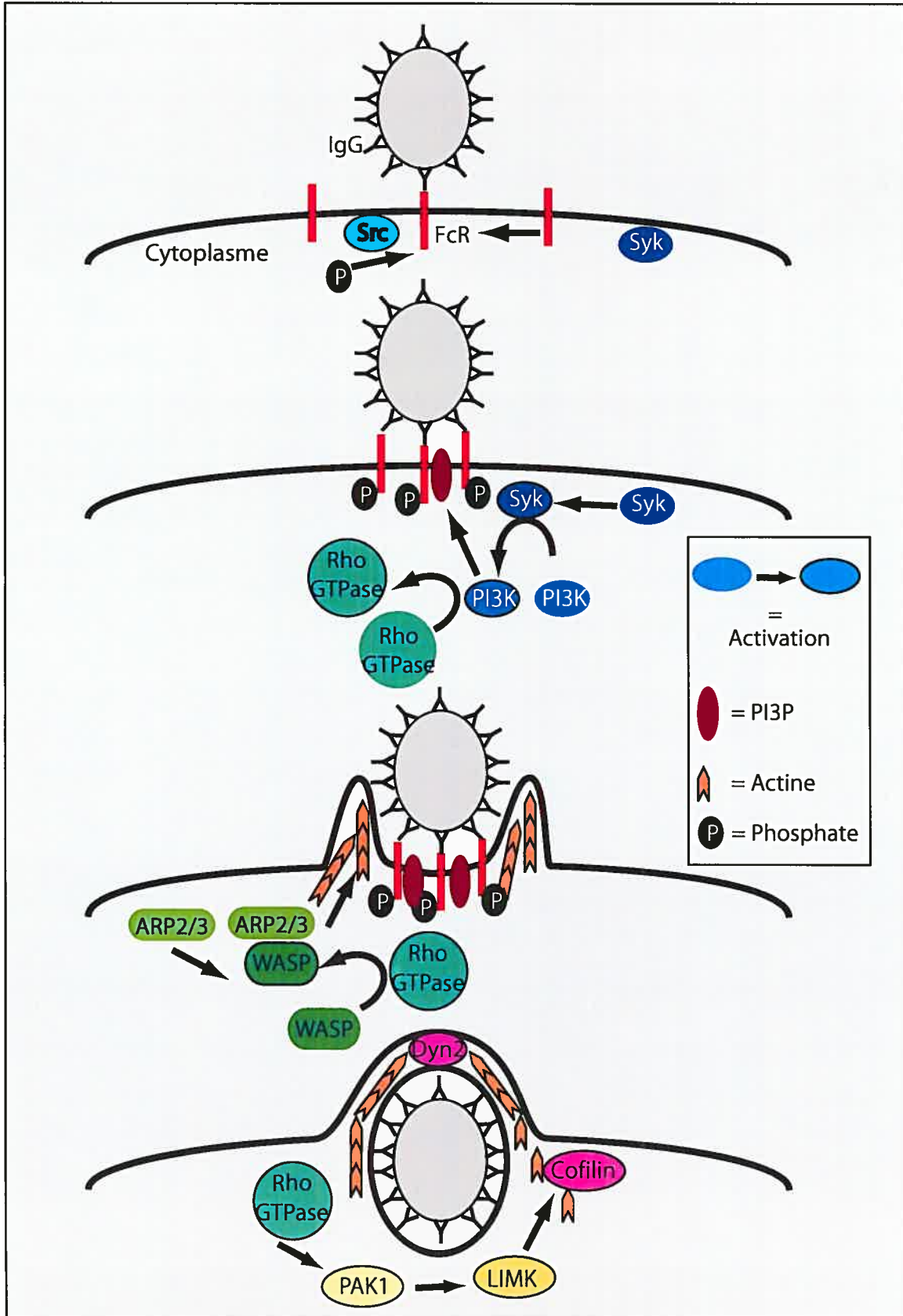
RE= Réticulum endoplasmique

= Fusion transitoire

= Actine

P = Phagosome

Figure 3. Voie de signalisation menant au réarrangement du cytosquelette d'actine.



2.4.4 Acquisition et rôle de molécules microbicides

Afin de générer un environnement hostile aux particules ingérées, le phagosome acquiert, lors de sa maturation, plusieurs protéines et molécules à caractère microbicidal lui permettant de détruire et de dégrader son contenu. On compte parmi ces agents la pompe à proton vacuolaire (V-ATPase), les hydrolases et les molécules réactives dérivées de l'oxygène.

2.4.4.1 Pompes à protons

Les pompes à protons V-ATPasiques sont rapidement acquises lors de la formation du phagosome et forment un oligomère composé de plus d'une dizaine de protéines. Les composantes protéiques sont toutefois divisées en deux sous-unités fonctionnelles, les sous-unités V_0 et V_1 . La sous-unité V_0 est composée de six protéines : a, c, c', c'', d et e (Harrison et al., 2003). Elle est ancrée dans la membrane et sert de canal permettant la translocation des protons vers la lumière de l'organelle. La sous-unité V_1 est composée de huit protéines (A-H) formant un hexamère composé de trois protéines A et trois B, capable d'hydrolyser l'ATP, et une charpente structurale composée des protéines C-H capable de transmettre l'énergie requise à la sous-unité V_0 pour la translocation de protons (Harrison et al., 2003). La translocation de protons H^+ vers la lumière du phagosome provoque une acidification graduelle de l'organelle et contribue à l'établissement d'un environnement hostile pour les particules phagocytées (Jankowski et al. 2002). De plus, l'acidification provoque l'activation et la maturation de plusieurs protéines présentes dans le phagosome (Ishidoh et al., 1999). Ceci a été démontré à l'aide d'un inhibiteur spécifique des pompes à protons, la Bafilomycine 1, qui a eu l'effet d'inhiber la maturation complète du phagosome et la dégradation de la particule ingérée (Bidani et Heming, 1995, vanDeurs et al., 1996). Le contrôle de l'activité des pompes à protons est toujours mal connu, mais pourrait faire intervenir les radeaux lipidiques, dû au fait qu'elles s'y trouvent associées lorsque présentes dans le phagosome (Dermine et al., 2001).

2.4.4.2 Hydrolases et lipases

Les hydrolases sont des enzymes capables de cliver un substrat protéique. On compte plusieurs hydrolases présentes dans le phagosome, notamment les cathepsines A, B, D, J et S. L'acquisition de ces hydrolases semble être régulée, car il a été montré qu'elles étaient recrutées aux phagosomes suivant une chronologie bien définie (Garin et al., 2001). Chacune d'elles possède un substrat spécifique et clive à un endroit précis dans la séquence peptidique de ce substrat. Les hydrolases sont d'abord acquises sous forme immature dans la lumière du phagosome où elles connaissent une maturation fonctionnelle par autoprotéolyse lors de l'acidification de l'organelle (Richo et Connoer, 1991, Ullrich et al., 1999; Garin et al., 2001). Ceci a été démontré pour les cathepsines A, B et D lors de la maturation du phagosome (Garin et al., 2001). Les cathepsines forment les protéines effectrices de la dégradation protéinique et permettent l'élaboration d'un patrimoine peptidique complexe qui pourra être utilisé afin d'initier le développement d'une réponse immunitaire adaptative (Rudensky et Beers, 2006). Les lipases, comme la lipase acide lysosomale, s'attaquent aux lipides de la membrane plasmique des particules phagocytées (Yue et al., 1987). Cependant, leur rôle précis dans la dégradation n'est pas très bien connu.

2.4.5 Origines et rôles des radeaux lipidiques

Il a longtemps été considéré que les protéines ancrées et associées aux membranes cellulaires suivaient un modèle de mosaïque fluide. Ceci permettait le mouvement latéral de ces protéines le long des membranes sans encombrement et semblait expliquer l'observation de la diffusion de protéines marquées de la membrane plasmique d'une région de la cellule à une autre. Cette vision de la distribution des protéines dans les membranes a été altérée lorsque différents laboratoires ont décrit la présence de domaines membranaires à constitution lipidique très spécifique (Grzybeck et al., 2005). Ces domaines, résistants à la solubilisation par certains détergents ioniques, semblaient former des régions spécialisées

de la membrane plasmique et étaient majoritairement enrichis de sphingolipides et de cholestérol. La découverte de deux protéines, Flotilline-1 et 2, démontra l'existence de domaines lipidiques spécifiques à la membrane plasmique qui semblaient aussi contenir une sous-population de protéines très particulière (Bickel et al., 1997; Lang et al., 1998). Les fonctions reliées aux protéines présentes dans les radeaux sont très diverses et pourraient contribuer à la signalisation cellulaire, la fusion membranaire, l'endocytose et la nucléation de l'actine (He et al., 2005; vanMeer et Sprong, 2004, Kirkham et Parto, 2005; Golub et Pico, 2005) .

2.4.5.1 Radeaux lipidiques phagosomaux

Il y a quelques années, il a été suggéré puis démontré que les phagosomes possédaient eux aussi une population de radeaux lipidiques suite à l'identification de flotilline-1 par analyses protéomiques de préparations de phagosomes isolés (Garin et al., 2001). Étant donné qu'à cette époque l'identification formelle de flotilline-1 et des radeaux lipidiques n'avait été faite qu'à la membrane plasmique, il fut supposé que ces derniers étaient acquis suite à l'utilisation de la membrane plasmique lors de la phagocytose. Or, les travaux de Dermine et collègues ont permis d'établir l'existence de deux types de radeaux lipidiques retrouvés sur le phagosome (Dermine et al., 2001; Dermine et al., 2005). L'un était composé du marqueur GM1 et semblait acquis lors de la formation du phagosome à partir de la membrane plasmique. L'autre contenait flotilline-1 et était acquis lors de la maturation du phagosome. Les régions membranaires que semblaient définir ces deux marqueurs étaient exclusives, car aucune colocalisation n'était observée entre GM1 et flotilin-1 en microscopie à fluorescence.

De plus, l'isolation de radeaux lipidiques phagosomaux par flottaison sur gradient de sucrose révèle que leur composition protéique est très particulière (Dermine et la., 2005; Goyette et al., communication personnelle). On remarque entre autre que certaines protéines retrouvées en grande quantité dans la membrane du phagosome, comme LAMP1, sont

exclues de ces régions spécialisées (Dermine et al., 2005). Ceci a permis d'élaborer l'hypothèse qu'ils devaient moduler des fonctions bien spécifiques chez le phagosome dû à leur ségrégation spatiale.

Des travaux faits chez des lignées cellulaires de macrophages ont permis de démontrer qu'ils avaient un rôle clé dans la maturation du phagosome. Ceci a été illustré en étudiant l'internalisation et l'établissement de la niche répliquative du parasite intracellulaire *Leishmania donovani*. Il a été montré que le lipophosphoglycan (LPG), une des molécules de surface prépondérante de *L. donovani*, ciblait particulièrement ces régions et causait la désorganisation de radeaux lipidiques contenant le GM1 et inhibait l'acquisition de ceux contenant flotilline-1 (Dermine et al., 2005). La corrélation entre l'absence de radeaux lipidiques et l'absence de fusion entre phagosomes contenant *L. donovani* et endosomes, préalablement démontré en microscopie électronique (Scianimanico et al., 1997; Dermine et al., 2000), a permis de postuler un rôle précis pour ces microdomaines. L'implication potentielle des radeaux lipidiques contenant flotilline-1 dans la fusion membranaire a de plus été fortement suggérée suite à l'identification de syntaxine 13, une SNARE impliquée dans le ciblage et la fusion membranaire, ainsi que ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) lors d'une co-immunoprécipitation avec flotilline-1 (Bared et al., 2004).

Il se pourrait fort bien que d'autres rôles puissent être attribués aux radeaux lipidiques présents dans les phagosomes. De récents résultats semblent les impliquer au niveau de la présentation antigénique (Poloso et al 2004; Chakraborty et al., 2005). Aussi, des analyses protéomiques ont permis l'identification de plus d'une centaine de protéines présentes dans ces microdomaines membranaires insolubles aux détergents (Goyette et al., communication personnelle). Parmi ces protéines, on retrouve la machinerie des gamma-sécrétases (Jutras et al., 2005). Bien qu'il ait été montré que ce complexe soit fonctionnel lorsqu'associé au phagosome, son rôle reste toutefois à déterminer. Enfin, les protéines identifiées lors des analyses protéomiques des radeaux lipidiques phagosomaux ont permis

d'établir plusieurs nouvelles hypothèses quant à la profondeur et la complexité qu'apportent ces régions membranaires spécialisées aux processus de la phagocytose et de la biogenèse du phagolysosome (Garin et al., 2001; Dermine et al., 2005).

2.5 La modulation du phagosome par les pathogènes

À travers l'évolution, certains parasites se sont développés de manière à pouvoir résister aux différents mécanismes de défense élaborés par les organismes hôtes (Duclos et al., 2000). Ces mécanismes de survie permettent de contrer non seulement une réponse immunitaire humorale, mais aussi cellulaire. Ce qui sera présenté dans les sections suivantes porte sur les mécanismes de survie employés par certains pathogènes afin de moduler le cours normal de la maturation du phagosome. On distingue quatre types de mécanismes utilisés. Le premier mécanisme de survie permet au pathogène de bloquer la maturation phagosomale aux stades précoces. Le second mécanisme permet au pathogène de survivre, et ce, à même les conditions hostiles du phagolysosome. Le troisième permet la modification du phagosome à un tel point qu'il ne ressemble plus à une organelle de la voie endocytaire. Enfin, le quatrième mécanisme employé permet au pathogène de quitter les confinements membranaires du phagosome afin de s'établir dans le cytoplasme (figure 4).

2.5.1 Inhibition de maturation

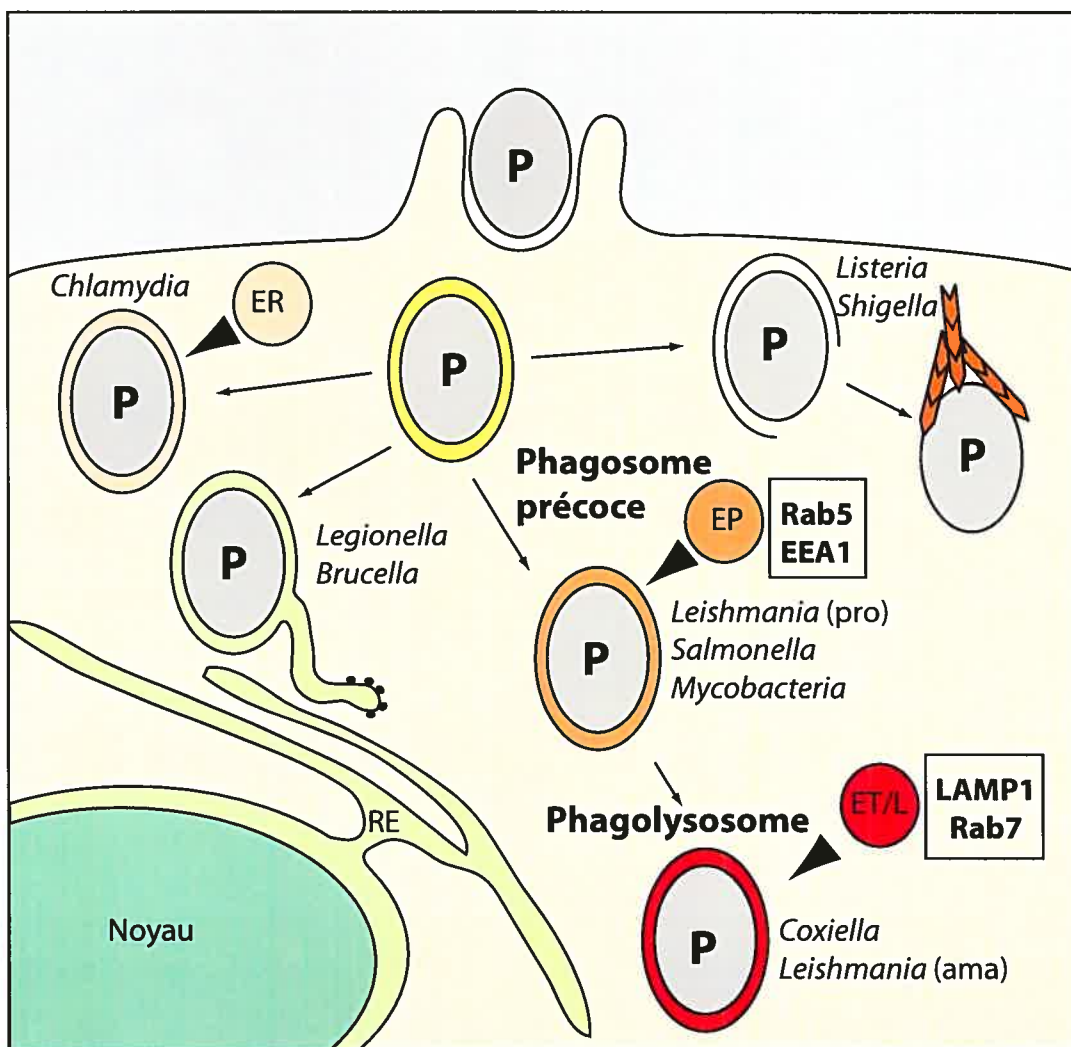
L'inhibition de la maturation aux stades précoces est de loin le mécanisme de survie de prédilection des pathogènes. Le phagosome précoce, n'offrant point un environnement hostile, est une niche privilégiée pour la survie et la multiplication cellulaire. Les mécanismes utilisés par les parasites diffèrent, mais les résultats semblent les mêmes. Les stratégies de survie employées par les pathogènes intracellulaires *Salmonella*, *Mycobactéria* et *Leishmania* promastigote seront décrites dans cette section et donnent une vue globale des machineries moléculaires utilisées afin de stopper la maturation du phagosome.

2.5.1.1 *Salmonella enterica*

Salmonella est une bactérie entéropathogénique gram-négatif pouvant survivre à l'intérieur des cellules hôtes grâce à l'inhibition de la maturation phagosomale aux stades précoces. L'implantation typique de la niche répllicative de *Salmonella* débute par une maturation normale du phagosome lors de sa formation, mais la maturation de celui-ci reste bloquée avant l'acquisition des marqueurs caractéristiques du phagolysosome. La bactérie est donc capable de prendre résidence dans un compartiment propice à la multiplication, ce qui lui permet éventuellement de s'échapper de la cellule hôte et d'infecter les cellules avoisinantes (Schlumberger et Hardt, 2005).

On retrouve deux systèmes spécialisés de sécrétion de type III chez *Salmonella enterica*, chacun requis pour le caractère virulent de la bactérie (Cirillo et al., 1998; Galan et Curtis, 1998). Le premier système de sécrétion, retrouvé dans la région du génome appelé l'îlot de pathogénicité I (SPI-1), permet à la bactérie d'injecter dans la cellule hôte des protéines effectrices requises pour son internalisation chez les cellules non-phagocytaires. Cette injection survient peu de temps après l'adhésion de la bactérie à la cellule et provoque une augmentation de repliements membranaires « ruffles », permettant l'internalisation de la bactérie et la formation de la vacuole contenant la salmonelle (SCV). Ce mécanisme provoqué par *Salmonella* s'apparente de près à celui observé dans le processus de macropinocytose (Francis et al., 1993). Certaines protéines injectées (SipA et SipC) interagissent directement avec l'actine tandis que d'autres agissent indirectement via des interactions avec les membres de la famille des Rho GTPases (SptP et SopE), causant chacune un remodelage du cytosquelette cortical (Fu et Galan, 1998; Hayward et Koronakis, 1999). Une modification des phosphoinositides, comme PIP₂, de la membrane plasmique par les phosphatases SigD et SopB peut aussi contribuer au remodelage du cytosquelette d'actine (Terebiznik et al., 2002). De plus, les protéines encodées SPI-1 semblent avoir un rôle à jouer lors de la prolifération (Steele-Mortimer et al., 2002).

Figure 4. Modèle établi des mécanismes de subversion de la maturation du phagosome.



ER= Endosomes de recyclage

EP= Endosomes Précoces

ET/L= Endosomes tardifs/Lysosomes

RE= Réticulum endoplasmique

P= Pathogène intracellulaire

L'îlot de pathogénicité SPI-2, lui aussi encodant un système de sécrétion de type III, permet la livraison de protéines effectrices à travers la membrane de la vacuole. Contrairement à SPI-1, SPI-2 semble entrer en ligne de compte plus tardivement, après l'internalisation de la bactérie. Les protéines issues de SPI-2 sont relâchées en réponse aux changements du microenvironnement qu'offre la lumière du phagosome (Vescovi et al, 1997; Deiwick et al, 1999). Les protéines effectrices encodées dans cette région sont essentielles à la survie du pathogène chez le macrophage en causant une redirection de la maturation de la SCV hors de la voie normale de biogenèse du phagolysosome (Cirillo et al, 1998). Même si la SCV acquiert tous les marqueurs des phagosomes précoces, ainsi que certains marqueurs tardifs, cette dernière ne maintient pas longtemps l'allure de phagosome en processus de maturation (Meresse et al., 2001; Scott et al., 2002). SpiC, une protéine effectrice de SPI-2, semble inhiber la fusion entre phagosomes et organelles endocytaires selon un mécanisme inconnu (Uchiya et al., 1999; Freeman et al., 2002). Cependant, des études faites chez les cellules mammifères ont démontré l'importance de la formation de longs filaments cytoplasmiques pour la survie des parasites chez les macrophages (Beuzon et al., 2000; Brumell et al., 2001). Ces structures appelées Sifs « *Salmonella* induced filaments » semblent être le résultat de l'activité d'un seul gène, *sifA* (Stein et al., 1996).

2.5.1.2 *Mycobacteria*

Les mycobactéries sont caractérisées par une enveloppe cellulaire atypiquement épaisse et riche en lipides. Contrairement à *Salmonella*, elles ne possèdent aucun mécanisme actif d'infection et nécessitent l'internalisation par des phagocytes professionnels afin de pouvoir établir leur niche répliquative (Ottenhoff, 2005). Elles bloquent les mécanismes intrinsèques de maturation phagosomale, ce qui non seulement leur permet de survivre, mais aussi de rester isolées à l'intérieur du phagosome et donc de rester cachées d'une réponse immunitaire humorale. Malgré que plusieurs récepteurs soient impliqués lors de l'entrée chez le macrophage, le CR3 demeure le plus important, même si l'opsonisation par C3 n'est pas nécessaire à la reconnaissance et à l'internalisation (Cywes

et al., 1997; El-Etr et Cirillo, 2001). L'établissement de l'infection par les mycobactéries dépend grandement du récepteur utilisé lors de l'entrée, car lorsque le parasite entre via le récepteur Fc, suite à l'opsonisation du parasite par des anticorps spécifiques, il est détruit dans le phagosome qui réussit à atteindre la maturité (Astarie-Dequeker et al., 2002).

Les phagosomes contenant les mycobactéries (MCP) acquièrent Rab5 très rapidement, comme le font les phagosomes normaux, mais maintiennent la présence de cette GTPase à leur membrane tandis que des marqueurs tardifs comme Rab7 et LAMP-1 ne sont pas acquis (Via et al., 1997). Il a été toutefois démontré que Rab7 pouvait être acquis par les MCP de cellules HeLa, mais que l'acquisition de LAMP-1 demeurerait toujours défectueuse (Clemens et al., 2002). Même si les cellules HeLa sont de pauvres phagocytes, l'internalisation de pathogènes fut observée. Il a aussi été démontré que l'acquisition d'un marqueur de phagosome précoce, EEA1, était défectueuse chez le MCP (Fratti et al., 2001). Cette défectuosité serait causée par la présence d'une molécule de surface de la mycobactérie, la « mannose-capped lipoarabinomannan » (ManLAM), qui aurait la capacité d'inhiber l'activité de la phosphoinositide-3-phosphate kinase de classe III (PI3K classe III) (Fratti et al., 2001). Le ManLAM bloquerait l'accumulation de PI(3)P, produit direct de l'activité de la PI3K classe III, ce qui aurait pour effet d'inhiber le recrutement de EEA1 et donc d'inhiber la maturation du phagosome. L'inhibition de la PI3K pourrait être causée par une altération des radeaux lipidiques présents dans le phagosome. Il a d'ailleurs été montré que des lipides de haute polarité, comme ManLAM, modifiaient l'acquisition de radeaux lipidiques à la membrane de phagosomes contenant des billes de latex opsonisées de tels lipides (Maldonado-Garcia et al., 2004). Le maintien d'une enveloppe d'actine autour du phagosome, causé par une présence prolongée de TACO, pourrait être un bel exemple de l'altération des fonctions des radeaux lipidiques dû au fait qu'ils sont impliqués dans le dynamisme de ces microfilaments (Ferrari et al., 1999; Gatfield et al., 2000; Pieters, 2001). Toutefois, les mécanismes d'action modulant ces interactions restent à déterminer.

2.5.1.3 *Leishmania* promastigote

Les protozoaires flagellés *Leishmania* sont des parasites intracellulaires facultatifs responsables d'une variété de maladies allant de la lésion cutanée auto-guérisable à l'infection viscérale fatale. Le vecteur principal de ces parasites est la femelle de la mouche des sables du genre *Phlébotomus* (principalement en Afrique) et *Lutzomyia* (en Amérique du Sud) (Lodge et Descoteaux, 2005). L'infection par les parasites débute par l'injection de ces derniers, sous forme promastigote, dans la voie sanguine de mammifères lors du repas sanguin de la mouche (Lodge et Descoteaux, 2005). Ils sont ensuite internalisés par des macrophages ou des neutrophiles dans les tissus. Les parasites *Leishmania* ont la capacité de survivre à l'intérieur des phagosomes à l'aide d'un processus en deux étapes qui leur est propre (Sacks et al., 1989). La première étape consiste à retarder la maturation du phagosome et la deuxième permet la survie du parasite dans les phagolysosomes

L'internalisation du parasite *Leishmania* peut se faire par plusieurs récepteurs (Green et al., 1994; Flandin et al., 2006). Ces récepteurs reconnaissent, entre autres, la molécule de surface la plus abondante, le lipophosphoglycan (LPG) (Descoteaux et Turco, 2002). Le LPG retrouvé à plus de 5 millions de copies à la surface de chaque cellule et contient des unités répétées Gal β 1,4Man-PO₄, un cœur de glycanes et une ancre GPI (Turco et Descoteaux, 1992). Il joue un rôle primordial lors de l'invasion ainsi que dans la survie du parasite à l'intérieur le phagosome. En plus du LPG, plusieurs conjugués glycosylés produits par les parasites, comme le phosphoglycan extracellulaire sécrété (PG) et des glycosylinositolphospholipides (GIPL) de diverses natures, semblent intervenir dans l'établissement de la niche répllicative du parasite (Lodge et Descoteaux, 2005).

Les parasites *Leishmania* sont capables d'infecter les macrophages sans enclencher leur activation, ce qui leur permet de passer inaperçus aux yeux du système immunitaire (Reiner et al., 1994). Il a été démontré que chez des macrophages dérivés de la moelle

osseuse de souris, l'attachement et l'internalisation de *Leishmania* ne menait pas à la phosphorylation de trois protéines kinases activatrices-mitogènes (MAPKs) cruciales à cette activation. L'inhibition des kinases p38MAPK, ERK1/2 et JNK (kinase c-Jun N-terminal) empêche la sécrétion de cytokines et la production de réactifs NO (Privé et Descoteaux, 2000). Ceci bloque le déclenchement d'une réponse immunitaire cellulaire efficace. Le LPG semble jouer un rôle central lors de cette inhibition de signalisation comme en témoignent les travaux du laboratoire de Descoteaux. De plus, ces pathogènes modifient aussi les voies de signalisation des phagosomes en activant les phosphatases à phosphotyrosines et en inhibant l'activité de la PKC. Des travaux ont démontré que la région 1-*O*-alkylglycerol du LPG était en majeure partie responsable de cette inhibition (McNeely et al., 1996). L'inhibition de la PKC a pour effets de prévenir la flambée oxydative, l'expression de *c-fos* induite par le diacylglycerol et la phosphorylation de MARCKS (kinase C riche en alanine myristoylée) (Descoteaux et al., 1991). Malgré le fait que le LPG et la PKC soient de part et d'autre de la membrane du phagosome, le LPG semble avoir une activité inhibitrice transmembranaire.

En plus de bloquer les voies de signalisation du macrophage, ces parasites sont aussi capables de moduler la maturation phagosomale. Les phagosomes contenant *Leishmania* acquièrent les marqueurs précoces comme EEA1 et Rab5, mais sont incapables d'acquérir des marqueurs tardifs comme Rab7 et LAMP-1 (Scianimanoco et al., 1999). Ceci est dû au fait que le LPG semble contrer la fusion entre phagosomes et lysosomes (Dermine et al., 2000; Dermine et al., 2005). Des études ont démontré que le LPG était capable de désassembler les radeaux lipidiques présents dans la membrane du phagosome en plus d'en prévenir leur accumulation (Chakraborty et al., 2005; Dermine et al., 2005). Étant donné la diversité des rôles des radeaux lipidiques dans la maturation du phagosome, il est fort probable que l'absence de ceux-ci puisse altérer le processus de maturation. Il a été démontré que les unités saccharidiques répétées du LPG étaient responsables de la désorganisation des radeaux lipidiques (Dermine et al., 2005). Aussi, il a été avancé que le LPG pourrait s'insérer dans les radeaux lipidiques du phagosome à l'aide de son ancre GPI.

Toutefois, des preuves directes impliquant l'insertion et les modes d'action du LPG manquent toujours à ce jour. Il se pourrait cependant que les mécanismes moléculaires observés ne soient pas uniques au LPG. Les molécules ManLAM, retrouvées à la surface de mycobactéries et similaires en composition au LPG, semblent aussi causer une désorganisation des radeaux lipidiques (Maldonado-Garcia et al., 2004). L'inhibition de la maturation phagosomale causée par le LPG n'est que temporaire et permet au parasite de s'adapter à son nouvel environnement.

2.5.2 Survie dans les phagolysosomes

Certains parasites intracellulaires ont développé des mécanismes leur permettant de survivre à l'intérieur de phagolysosomes matures. Ces parasites semblent pouvoir retarder temporairement la maturation afin de développer leurs mécanismes de survie. La survie dans les phagolysosomes est un mode de survie employé par la forme amastigote de *Leishmania* et par *Coxiella brunetii*.

2.5.2.1 *Leishmania* amastigotes

L'arrêt de maturation des phagosomes par la forme métacyclique de *Leishmania* promastigote n'est que temporaire. Après un certain temps, la maturation phagolysosomale reprend son cours. L'arrêt temporaire de maturation permet au parasite de compléter sa transformation en forme amastigote. Cette forme est caractérisée par l'absence de flagelle et une diminution de l'expression de surface de LPG. Les phagosomes comportant de tels parasites possèdent toutes les caractéristiques des phagolysosomes matures. Les mécanismes permettant la survie de la forme amastigote de *Leishmania* dans les phagolysosomes demeurent inconnus, mais semblent impliquer les GIPL (Peters et al., 1997; Burchmore et Barrett, 2001; Courret et al., 2002).

2.5.2.2 *Coxiella brunetii*

C. brunetii est une bactérie gram-négatif qui, comme *Leishmania*, possède deux stades de maturation. On la retrouve sous la variante de petite cellule (sCV), capable de tolérer des environnements extrêmes, et la variante de grosse cellule (ICV), forme répliquative chez les cellules eucaryotes (Wiebe et al., 1972). La morphologie des ICVs s'apparente à celle retrouvée normalement chez les bactéries bacilles gram-négatif, mais la morphologie de la sCV est plus compacte et les contenus cellulaires sont condensés (McCaul et Williams, 1981). Cette condensation est due à la surexpression de la protéine ScvA, un homologue à l'histone H1, capable de condenser la chromatine (Heinzen et al., 1996). *C. brunetii* est internalisée par les macrophages alvéolaires suite à l'inhalation et se retrouve dans des phagosomes ne possédant pas les marqueurs de phagosomes tardifs. L'altération de la maturation phagosomale serait due au fait que le LPS de surface des sCV empêche la communication croisée entre les récepteurs $\beta 2$ intégrine et CR3 (Capo et al., 1999; Capo et al., 2003). L'inhibition de la signalisation croisée par le CR3 permet à la bactérie de s'établir dans une vacuole dépourvue de la machinerie nécessaire à une maturation adéquate. Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, les variantes sCVs de *Coxiella* se différencient en ICVs (Howe et al., 2000). Cette différenciation est engendrée par une diminution de pH causée par l'initiation de l'acidification de l'organelle par les pompes à protons. Il a d'ailleurs été démontré qu'une inhibition de l'acidification du phagosome par la Bafilomycine A1 empêchait la transformation de la sCV en ICV et entraînait la mort de la bactérie (Heinzen et al., 1996). Les molécules permettant la ré-initiation de la maturation phagosomale ainsi que la survie dans le phagolysosome restent à déterminer.

2.5.3 Changement d'environnement

Certains pathogènes modifient la composition membranaire et protéique du phagosome jusqu'à ce que ce dernier n'ait plus aucune ressemblance avec une organelle de la voie endocyttaire. On retrouve deux mécanismes distincts permettant aux pathogènes de recruter soit des membranes d'origines plus ou moins connues, mécanisme préconisé par *Chlamydia*, soit le recrutement de membranes provenant du réticulum endoplasmique, méthode utilisée par *Legionella* et *Brucella*. Malgré que ces deux derniers pathogènes résident chacun dans une organelle dérivée du RE, l'un le fait en court-circuitant les sites de sortie des vésicules cargo, tandis que le second emprunte l'autophagie afin de recruter ces membranes. Ce sont pour ces raisons que chacun sera décrit dans les sections suivantes.

2.5.3.1 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis est un pathogène intracellulaire obligatoire, ne pouvant survivre et proliférer qu'à l'intérieur d'une cellule hôte, capable d'infecter plusieurs types cellulaires à l'aide d'un système de sécrétion de type III très similaire à celui décrit plus haut chez *Salmonella*. Le pathogène utilise ce système de sécrétion pour injecter des protéines effectrices, désignées IncA, IncB et IncC, lui permettant de court-circuiter la voie normale de maturation (Subtil et al., 2001). La bactérie, une fois internalisée, recrute une quantité massive de membranes provenant de vacuoles d'exocytose et du recyclage d'endosomes afin de former une vacuole d'inclusion (Hackstadt et al., 1996). L'accumulation de membranes autour de la vacuole d'inclusion bloque l'interaction avec les organelles de la voie endocyttaire, ce qui empêche l'acquisition des pompes à protons, bloquant l'acidification, et d'hydrolases (Grieshaber et al., 2002). L'inhibition de fusion semble être limitée aux organelles de la voie endocyttaire, car des fusions homotypiques entre différentes vacuoles d'inclusions, médiées par IncA, sont observables (Hackstadt et al., 1999). Malgré la grande taille des vacuoles d'inclusions, ainsi que de la rapidité avec laquelle elles sont formées, peu est connu sur les mécanismes moléculaires modulant de telles fusions (Scott et al., 2003).

2.5.3.2 *Legionella pneumophila*

L. pneumophila est une bactérie gram-négatif présente de façon ubiquiste dans les environnements aquatiques et est responsable de la maladie du légionnaire. L'infection se produit suite à l'internalisation du pathogène par les macrophages alvéolaires qui sont incapables de le détruire (Fields et al., 1996; Fliermans et al., 1996). L'internalisation du pathogène par les cellules hôtes se fait principalement à l'aide de deux récepteurs aux compléments, le CR3 et le CR1q (Payne et al., 1987). Le choix de ces récepteurs ne semble pas être lié directement à la virulence du parasite dû au fait que les variantes avirulentes du parasite entrent par les mêmes récepteurs (Horwitz et al., 1984). Toutefois, l'entrée d'un parasite opsonisé par des anticorps via le FcR cause une diminution marquée du facteur de multiplication intracellulaire (Nash et al., 1984).

La formation de la vacuole répliquative de *L. pneumophila* est dirigée par un système de sécrétion de type IV encodé par les gènes de virulence *dot*(defect in organelle trafficking)/*icm* (intracellular multiplication) formés de plus de 23 membres situés sur deux loci (Segal et al., 1998; Vogel et al., 1998). Ces gènes auraient des rôles à jouer au niveau du transport d'ADN, de l'augmentation de l'index de macropinocytose et de phagocytose, de recrutement du réticulum endoplasmique (RE), de l'initiation de l'apoptose de la cellule hôte ainsi que de la formation d'un pore lytique permettant la dissémination du pathogène (Segal et al., 1998; Segal et al., 1999; Watarai et al., 2001; Hilbi et al., 2001; Gao et al., 1999; Molmeret et al., 2002). L'établissement de la vacuole répliquative de *Legionella* (LRV) débute de la même manière chez les cellules hôtes de mammifères que protozoaires (Tilney et al., 2001). Elle implique le recrutement de diverses organelles comme certaines vésicules de recyclage, les mitochondries et le réticulum endoplasmique rugueux (RER) par l'entremise des protéines fournies par le système de sécrétion de type IV Dot/Icm (Tilney et al., 2001; Swanson et Isberg, 1995). Ce type de système de sécrétion est similaire à celui utilisé pour le transfert d'ADN entre bactéries (Christie et Vogel, 2000). Les protéines des loci *dot/icm* semblent former un pore permettant le transport de macromolécules à travers la

membrane plasmique et/ou phagosomale afin d'altérer les propriétés fusogéniques de la vacuole de résidence (Kirby et Isberg, 1998). Les protéines effectrices semblent agir uniquement en *cis* dû au fait qu'elles n'altèrent pas la fusogénicité des autres organelles de la voie endocytaire de la cellule infectée (Coers et al., 1999). La protéine DotA est une protéine transmembranaire formant un oligomère et possède des similarités de séquences à TraY, une composante majeure d'un système de sécrétion de type IV requis pour le transport conjugal d'ADN plasmidique. Ceci suggère qu'elle pourrait agir comme pore de transfert de macromolécules bactériennes vers le cytoplasme de la cellule hôte (Segal et al., 1999). D'ailleurs, d'autres effecteurs encodés par le locus Dot/Icm permettent normalement l'insertion de protéines transmembranaires et périplasmiques au niveau de la membrane externe de la bactérie. Cette insertion nécessite l'activité d'un pore-transporteur qui permet le transit à travers les membranes du pathogène et des protéines chaperonnes, comme IcmS et IcmW, pour faciliter le transport de protéines à travers le pore (Coers et al., 2000).

Il semble exister une dichotomie dans les mécanismes d'action pour l'établissement de la niche répliquative. Le mutant *icmR* échappe partiellement la voie endocytaire lorsqu'il est internalisé en empêchant les interactions avec les lysosomes. Cependant, il n'acquiert pas de membranes provenant du RE, démontrant que certaines protéines permettent l'échappement de la voie endocytaire et que d'autres permettent l'acquisition de membranes du RE. Le recrutement de membrane provenant du RE, lors de l'infection à *L. pneumophila*, implique la protéine ARF-1 (ADP ribosylation factor-1) qui est retrouvé sur près de 30% des phagosomes contenant la bactérie. Il a été démontré que le pore encodé par Dot/Icm permet l'injection de RalF, une protéine contenant des domaines homologues à sec 7, qui pourrait être la cause de la subversion de la voie normale de maturation. Cette protéine, une GEF (guanine nucléotide exchange factor), permet l'acquisition d'ARF-1, une composante clé pour la régulation du trafic vésiculaire entre le RE et le Golgi. Toutefois, elle ne semble pas essentielle à la survie du parasite, car le mutant *ralF* peut survivre dans des phagosomes morphologiquement identiques à ceux contenant la forme sauvage. Ces

études semblent démontrer que la LRV intercepte les vésicules de transport issues des sites de sortie du RE (Kagan et Roy, 2002). Plusieurs mécanismes semblent être employés afin de recruter les membranes du RE et d'établir la niche répllicative.

2.5.3.3 *Brucella sp.*

Les membres du genre *Brucella* sont des pathogènes pouvant infecter plusieurs mammifères et sont très bien adaptés à la survie prolongée dans leurs hôtes. Contrairement à *Legionella*, elles sont mieux adaptées à la multiplication intracellulaire parasitaire, ne pouvant survivre sous la forme répllicative extracellulaire que pour une période brève (Gorvel et Moreno, 2002). Les facteurs de virulence retrouvés chez *Brucella* sont axés sur la subversion de la maturation phagosomale et la résistance aux activités hydrolytiques de certaines enzymes (Pizarro-Cerda et al., 1998). Tout comme *Legionella*, *Brucella* possède un système de sécrétion de type IV et trouve sa niche répllicative dans une vacuole possédant les caractéristiques du RER. Cependant, les mécanismes qui permettent la survie de *Brucella* diffèrent de ceux employés par *Legionella*.

L'entrée du micro-organisme peut se faire par les récepteurs CR3 et FcR, mais peut aussi se faire par les récepteurs de type lectine ou fibronectine pouvaient (Harmon et al., 1988). La voie d'entrée est directement reliée au taux de survie du pathogène. Il a été documenté que la survie de *Brucella* est grandement amoindrie lorsque ce dernier est internalisé via les récepteurs Fcs (Harmon et al., 1988; Harmon et al., 19889). Les récepteurs et ligands permettant l'entrée de la bactérie dans les conditions non-opsonisantes demeurent méconnus. Toutefois, *Brucella* pourrait se servir d'une molécule de surface, le O-polysaccharide (OPS), afin d'adhérer aux cellules et promouvoir son internalisation (Moreno et al., 1981). Ceci a été démontré à l'aide d'un mutant de ce pathogène qui ne possède pas d'OPS. Ce dernier était incapable d'adhérer et d'être internalisé en aussi grand nombre que la forme sauvage. Le rôle de cette molécule semble être restreint à l'entrée du

pathogène, car le même ratio de bactéries semble pouvoir survivre à l'intérieur de la cellule hôte une fois internalisées (Sola-Landa et al., 1998; Detilleux et al., 1990).

La bactérie possède aussi un système à deux composantes, BvrS-BvrR, impliqué dans l'entrée de la bactérie. Il a été démontré que les mutants négatifs de ces composantes étaient incapables de pénétrer dans la cellule hôte (Sola-Landa et al., 1998). Ces mutants sont incapables d'induire l'activation la GTPase de la famille Rho, Cdc42, ce qui cause le maintien du pathogène à la surface. Une analyse de la couche externe de ce mutant a révélée une défectuosité majeure au niveau de la présence de plusieurs molécules de surface. En effet, deux protéines de la membrane externe, Omp3a et Omp3b (Outer membrane protein), ainsi que le LPS (Guzman-Verri et al., 2001) étaient absents. Ces protéines ne semblent pas agir de manière complémentaire, car le mutant négatif *omp3a* est toujours apte à être internalisé (Edmonds et al., 2001).

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, la vacuole contenant *Brucella* (BCV) interagit rapidement avec les organelles de la voie endocytaire et on peut y observer la présence de marqueurs d'endosomes précoces comme Rab5 et EEA1 au niveau de la membrane (Pizarro-Cerda et al., 1998). Par contre, la vacuole n'acquiert jamais certains marqueurs d'endosomes tardifs ou de lysosomes comme Rab7, malgré que LAMP1 est acquis (Pizarro-Cerda et al., 1998). Cependant, la présence de marqueurs du RE on été observés dans la vacuole contenant *Brucella*. À ce stade, la BCV ressemble beaucoup aux autophagosomes dû au fait qu'elle possède des marqueurs lysosomaux et du RE. Dans les stades tardifs de l'infection, la BCV perd ses caractères d'autophagosomes, n'ayant plus les marqueurs lysosomaux, mais maintient la présence de Sec61 β ainsi que les autres marqueurs du RE (Detilleux et al., 1990; Pizarro-Cerda et al., 1998).

Tout comme *Legionella*, *Brucella* fait aussi usage d'un système de sécrétion de type IV pour modifier le protéome du phagosome (Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001). Ce système est encodé par les gènes VirB et semble jouer un rôle principalement au

niveau du trafic de la bactérie lors de l'infection. En effet des mutants exprimant des formes atténuées des gènes de l'opéron VirB :*virB2*, *virB4*, *virB8*,*virB9* et *virB10* sont internalisés au même rythme que la forme sauvage et s'établissent dans les autophagosomes. Toutefois, le recrutement additionnel de membranes du RE est défectueux. Ceci démontre que les protéines encodées par l'opéron VirB semblent être importantes pour l'établissement de la niche répliquative en permettant l'acquisition de membranes du RE. Plusieurs membres de cet opéron sont des protéines de type transmembranaire, ce qui suggère qu'ils pourraient permettre la sécrétion de molécules effectrices dans lumière du phagosome ou dans le cytoplasme de la cellule hôte (DeVecchio et al., 2002).

2.5.4 Échappement vers le cytoplasme

Certains micro-organismes ont développé des mécanismes leur permettant de s'évader des conditions hostiles retrouvées dans les phagolysosomes en dégradant la membrane de la vacuole. Ceci leur permet de s'échapper dans le cytoplasme où ils peuvent utiliser la machinerie moléculaire de la cellule hôte afin d'assurer leur survie et promouvoir l'infection de cellules avoisinantes. On trouve parmi ce type de pathogène *Listeria monocytogenes* et *Shigella flexernii*. Malgré que leur mécanisme de transgression de la membrane phagosomale soit similaire, leurs mécanismes d'entrée sont très différents. Dû au fait que les mécanismes d'entrée de *Shigella* s'apparentent à ceux décrits pour *Salmonella*, seuls les mécanismes d'infection employés par *Listeria monocytogenes* seront élaborés afin de minimiser la redondance (Cossart et la., 2003).

2.5.3.3 Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes est un pathogène d'origine alimentaire causant la listériose, une infection causant un taux de mortalité pouvant atteindre 30% des cas répertoriés. *Listeria* a la capacité d'infecter les cellules non-phagocytaires, phagocytes professionnels et

peut même se propager d'une cellule à l'autre, ce qui fait de cette bactérie un pathogène très infectieux (Vasquez-Boland et al., 2001). Le cycle infectieux débute par l'attachement à la surface d'une cellule hôte, l'internalisation de la bactérie par phagocytose, la lyse de la membrane phagosomale suivie de l'échappement vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, la bactérie se propulse à l'aide d'une polymérisation d'actine polarisée, ce lui permet d'infecter les cellules avoisinantes (Cossart et Lecuit, 1998).

L'entrée de *Listeria* dans les cellules non-phagocytaires ne se fait pas à l'aide d'un mécanisme de sécrétion de type III comme *Salmonella enterica*. Deux protéines majeures, les internalines InlA et InlB, sont responsables de l'attachement et l'internalisation de la bactérie et déterminent le type cellulaire infecté (Ireton et Cossart, 1997). Il a été démontré qu'InlA liait de façon spécifique le domaine EC1 de la E-cadhérine présente à la surface des cellules hôtes humaines (Lecuit et al., 1999). Cette liaison initie un réarrangement du cytosquelette, similaire à celui retrouvé lors de la formation de jonctions serrées, et provoque l'internalisation de la bactérie. InlB, contrairement à InlA, ne se trouve pas de manière ancrée à la surface des bactéries de sorte qu'on puisse en trouver sous forme sécrétée dans le milieu. Elle se lie de manière moins spécifique à plusieurs récepteurs dont CR1q et Met, un récepteur proto-oncogène normalement lié à la prolifération cellulaire (Braun et al., 2000; Bierne et al., 2002; Banerjee et al., 2004). L'interaction entre InlB et son récepteur enclenche le réarrangement du cytosquelette d'actine via le recrutement du complexe Gab1, Cbl et Shc, menant à l'activation de la PI3K et l'initiation de la phagocytose (Ireton et al., 1999; Shen et al., 2000; Sun et al., 2005).

Une fois à l'intérieur du phagosome, *Listeria* induit une rupture de la membrane phagosomale à l'aide de deux protéines effectrices : la listeriolysine-O (LL-O) (la toxine shiga chez *Shigella* est son homologue fonctionnel) et la lipase phosphatidylinositol-spécifique C (PI-PLC) (Sibelius et al., 1999). La LL-O est insérée dans la membrane de la vacuole et sert de pore de grande taille et faible sélectivité (Gedde et al., 2000). Ceci provoque un passage transmembranaire de protons, rétablissant un pH neutre dans le

phagosome, et le transport de facteurs bactériens comme la PI-PLC dans le cytoplasme. Cette lipase est activée par des effecteurs bactériens et cause une rupture de la membrane du phagosome, permettant la sortie du pathogène dans le cytoplasme. Dans cet environnement, *Listeria* court-circuite une fois de plus la machinerie modulant la polymérisation de l'actine par l'activité de sa protéine actA, une homologue à N-WASP, afin de se propulser dans le cytoplasme. ActA permet entre autre le recrutement polarisé d'agents de nucléation d'actine comme Arp2/3, ce qui provoque la polymérisation dirigée de filaments d'actine à une extrémité de la bactérie, lui permettant de se déplacer et d'infecter les cellules avoisinantes par perforation de leur membrane plasmique (Cossart, 2000; Zalevsky et al., 2001).

3 La présentation antigénique

Le développement d'une réponse immunitaire adaptative nécessite l'élaboration de peptides immunogènes et leur présentation sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les CMH sont polygéniques et polymorphiques, ce qui veut dire qu'ils sont encodés par plusieurs gènes et possèdent un domaine de liaison aux peptides immunogéniques hautement diversifié. Ce haut degré de variabilité est généré par une recombinaison génétique dans les gènes codant pour les chaînes légères. La grande diversité du domaine de liaison peptidique permet aux organismes vertébrés de reconnaître une quantité quasi-infinie de peptides. Lorsque liés à un peptide immunogénique, les CMH ont la capacité d'activer les lymphocytes T et d'enclencher la réponse immunitaire. Il existe deux types de CMH, les CMH de classe I et de classe II. Ils ont la capacité d'activer les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T CD4⁺ respectivement et exclusivement. Les antigènes qu'ils présentent peuvent venir de deux sources. Ils sont soit endogènes, produits par la machinerie de néosynthèse de la cellule, ou exogènes et proviennent de la dégradation d'organismes lors de la phagocytose ou de la dégradation de protéines antigéniques solubles par endocytose (Paul, 2003).

3.1 Mécanisme de présentation des antigènes endogènes par le CMH de classe I

Les antigènes endogènes présentés par les CMH de classe I sont issus de la dégradation de protéines reconnues comme étant aberrantes, incompatibles ou étrangères par les mécanismes de contrôle de qualité retrouvés dans toutes les cellules nucléées d'organismes vertébrés. Ces mécanismes permettent à l'organisme de suivre l'état des cellules qui le constituent et donc de reconnaître et d'éliminer les cellules malades, tumorales et infectées par des virus. Le CMH de classe I est une protéine hétérodimérique composé d'une chaîne transmembranaire polymorphique, la chaîne α , ainsi qu'une chaîne

soluble, la β 2-microglobuline. Les CMH-I sont retrouvées à la surface de toutes les cellules nucléées de mammifères (Figure 5).

3.1.1 Génération des peptides

Les peptides endogènes présentés par les CMH de classe I sont générés suite à la dégradation de protéines dans le cytoplasme. Cependant, ces protéines peuvent être transmembranaires ou luminales. Toutes les protéines que l'on retrouve dans la lumière ou ancrées dans la membrane d'une organelle sont synthétisées et modifiées dans le réticulum endoplasmique (RE) (Meusser et al., 2005). Le RE possède un mécanisme de contrôle de qualité visant à sélectionner et détruire les protéines aberrantes, mal repliées ou dont la glycosylation est inadéquate. Ce mécanisme permet aussi la reconnaissance de protéines incompatibles comme les protéines virales (Hampton, 2002). Le ERAD « endoplasmic reticulum associated degradation » se sert de chaperonnes, comme calnexine et calréticuline, afin de scruter l'état de synthèse des protéines (Figure 5). Lors d'une synthèse normale, ces chaperonnes permettent aux protéines d'atteindre leur structure finale en facilitant le repliement protéique et validant leur état de N-glycosylation (Helenius et Aebi, 2004). D'autres chaperonnes, comme les protéines de la famille hsp70-hsp90, assurent la fonctionnalité des domaines cytoplasmiques, tandis que PDI assure la formation de ponts disulfures (Meacham et al., 2001; Connell et al., 2001; Wang et Chang, 2003). Toutes protéines qui échouent à ce contrôle de qualité sont ciblées pour la dégradation. Dans le cas de protéines avec des aberrations dans leur état de glycosylation, elles recyclent longuement associées à calnexine ou calréticuline. Éventuellement, elles sont ciblées vers la mannosidase I du RE afin de convertir leurs glycans $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Trombetta et al., 2003). Cette modification permet le recrutement spécifique de la protéine EDEM «ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like » qui sert de ciblage pour la dégradation (figure 5) (Jakob et al., 2001; Olivari et al., 2001). Dans le cas de protéines dont la formation de ponts disulfures est inadéquate, elles sont premièrement reconnues par

PDI pour ensuite interagir avec l'oxidoreductase Eps1 et ciblées vers la dégradation (Wang et Chang, 2003).

Les protéines ciblées pour la dégradation doivent traversées la membrane du RE afin d'atteindre le cytoplasme. Le moyen par lequel elles réussissent à atteindre le cytoplasme reste encore mitigé. Cependant, plusieurs travaux ont permis de démontrer que le translocon Sec61 (Figure 5), normalement utilisé pour la translocation de chaînes naissantes lors de la synthèse protéique passant par le RE, pouvait permettre la rétrotranslocation de peptides et de protéines matures (Tirosh et al., 2003). Ceci a été démontré à l'aide d'observation faite sur la colocalisation de marqueurs du complexe Sec61 et la protéine DHFR-GFP ciblée pour la dégradation par le ERAD (Fiebiger et al., 2002; Tirosh et al., 2003). De plus, de récents résultats ont permis de démontrer l'existence de pores additionnels de rétrotranslocation dans le RE (Ye et al., 2004). Derlin-1, une protéine contenant plusieurs domaines transmembranaires, serait responsable de la rétrotranslocation de certains substrats associés à ERAD (Lilley et Ploegh, 2004). Il a d'ailleurs été démontré que Derlin-1 se trouvait en complexe avec les CMH de classe I lorsque ceux-ci étaient ciblés pour la dégradation par US11, une protéine virale promouvant la survie du CMV (Cytomégalovirus) (Ye et al., 2004). D'autres candidats comme Hrd1 et Doa10p pourraient aussi permettre la translocation rétrograde de peptides vers le cytoplasme compte tenu du nombre de domaines transmembranaires qu'ils possèdent (Huyer et al., 2004).

Une fois du côté cytoplasmique, les protéines doivent se disloquer du canal de translocation afin d'être marquées pour la dégradation. La dislocation serait engendrée par l'activité ATPasique de Cdc48/VCP « valsolin containing protein », une protéine cytosolique comportant un domaine AAA-ATPase (Jarosch et al., 2002; Ye et al., 2001). VCP pourrait être recrutée par VIMP « VCP associated integral membrane protein » vers le canal de translocation, car une colocalisation entre VCP, Derlin-1 et l'ubiquitine ligase résidente du RE, E3gp78, a été établie. De plus, il a été démontré que ces protéines étaient

associés au RE (Ye et al., 2004; Zhong et al., 2004). Afin d'être acheminées vers la dégradation par le protéasome, les protéines ciblées doivent être marquées à l'aide d'ajouts de d'ubiquitines. Les enzymes E1, E2 et E3 permettent l'ajout d'ubiquitines sur les lysines de la protéine à être dégradée (Figure 5). Premièrement, l'enzyme activatrice de l'ubiquitine, E1, hydrolyse l'ATP et forme un lien de haute énergie via sa région contenant une cystéine active et le domaine C-terminal de l'ubiquitine (Ub). Une fois activée l'Ub est transférée vers E2, une enzyme conjugatrice et est ajoutée à la chaîne latérale des lysines des protéines retrotransloquées avec l'activité de la ligase E3. Les protéines polyubiquitinées sont maintenant prêtes à la dégradation par le protéasome. (Meusser et al., 2005).

Le protéasome est le complexe protéique qui effectue la dégradation de protéines et de polypeptides polyubiquitinés. Chez les mammifères, le protéasome 26S est composé d'une unité catalytique, le protéasome 20S, flanquée de deux unités régulatrices, le cap 19S (Peters et al., 1999; Glickman et al., 1999). Ce complexe protéique est parmi un des plus gros de la cellule, possédant une masse avoisinant les 2,5 méga Daltons. De plus, ses constituants sont parmi les plus abondants de la cellule. Les unités régulatrices possèdent une activité ATPasique qui semble moduler l'ouverture du pore de l'unité catalytique du protéasome 20S (Glickman et al., 2002). De plus, la sous-unité S5a du protéasome permet une interaction directe avec les substrats polyubiquitinés (Young et al., 1998). L'unité catalytique permet la dégradation d'une multitude de substrats étant donné la présence de sous-unités possédant des activités protéolytiques différentes et complémentaires. De plus, l'activité protéolytique du protéasome peut être modifiée par l'interféron γ . Ce dernier cause une substitution des sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ par LMP-2, MECL et LMP7 respectivement (Brown et al., 1991; Nandi et al., 1996). Ceci permet au protéasome de générer des peptides ayant une affinité accrue pour les CMH de classe I, ce qui aurait pour effet d'augmenter la reconnaissance par le récepteur T CD8.

Le recrutement du protéasome semble nécessiter la formation du complexe VCP-Npl4p-Ufd1p qui, suite à la dislocation du peptide du translocon, dirige la protéine polyubiquitinée vers ce dernier (Ye et al., 2004). Ceci a été démontré suite à des observations faites sur des mutants dominants négatifs de Npl4p et Ufd1p. Ces mutants n'étaient plus capable d'effectuer la dégradation via le protéasome et accumulaient des protéines polyubiquitinées du côté cytoplasmique des membranes du RE (Bays et al., 2001; Jarosch et al., 2002).

3.1.2 Chargements de peptides et transport vers la surface

Les peptides produits par le protéasome sont ensuite réacheminés vers les membranes de RE et sont retransloqués vers la lumière par le complexe hétérodimérique TAP (Figure 5). Ce complexe, formé de TAP1 et TAP2, possède une affinité pour des peptides de petites tailles propices à être chargés sur des CMH-I (Meusser et al., 2005). Le rôle du transporteur TAP est essentiel à la présentation d'antigène, car il a été démontré que des mutants négatifs d'une des deux composantes du complexe étaient incapables de promouvoir la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ lorsque mis en présence de l'antigène.

Les peptides retransloqués vers la lumière du RE sont pris en charge par le complexe hétérodimérique calréticuline/Erp57 préalablement recruté vers le complexe TAP1/2 via une interaction spécifique avec tapasine (Tan et al., 2002; Sadasivan et al., 1996; Hughes et Cresswell; 1998). Les peptides associés à calréticuline/Erp57 sont par la suite acheminés vers le CMH de classe I. L'association entre calréticuline et CMH-I est nécessaire au bon repliement de la chaîne α du CMH et permet l'ajout de la β 2-microglobuline afin de former un complexe mature (Helenius et Aebi, 2001). Le chargement du peptide se fait au niveau de la fente peptidique, retrouvée dans la portion hypervariable de la chaîne alpha du CMH-I avec l'aide de Erp57 (Morrice et Powis, 1998, Dick, 2004). Une fois le peptide chargé, le complexe CMH-I/peptide se dissocie des chaperonnes du RE et emprunte la voie biosynthétique vers le Golgi en se liant à BAP31.

Le complexe atteint la surface suivant la voie de sécrétion constitutive (Paquet et al., 2004) (Figure 5). Une fois à la surface, il est en mesure d'interagir avec les récepteurs TCD8⁺ et d'initier l'activation cellulaire et d'enclencher une réponse immunitaire (Paul 2003).

3.2 Mécanisme de présentation des peptides exogènes par le CMH de classe II

La présentation d'antigènes exogènes par le CMH-II est une étape essentielle quant à l'élaboration d'une réponse immunitaire adaptative face aux envahisseurs microbiens. Elle permet aux CPAs d'initier l'activation des cellules effectrices de la réponse humorale, les lymphocytes T CD4⁺, qui à leur tour activeront les lymphocytes B à produire et sécréter des anticorps spécifiquement dirigés contre l'épitope présenté. Contrairement au CMH-I, le CMH-II est composé de deux chaînes transmembranaires, les chaînes α et β , possédant chacune un domaine d'hypervariabilité (Paul, 2003). De plus, les mécanismes de présentation de peptides exogènes par le CMH-II ne sont retrouvés que chez les CPA et constituent un processus de présentation antigénique spécialisé et hautement adapté à ce type de cellule (Paul, 2003).

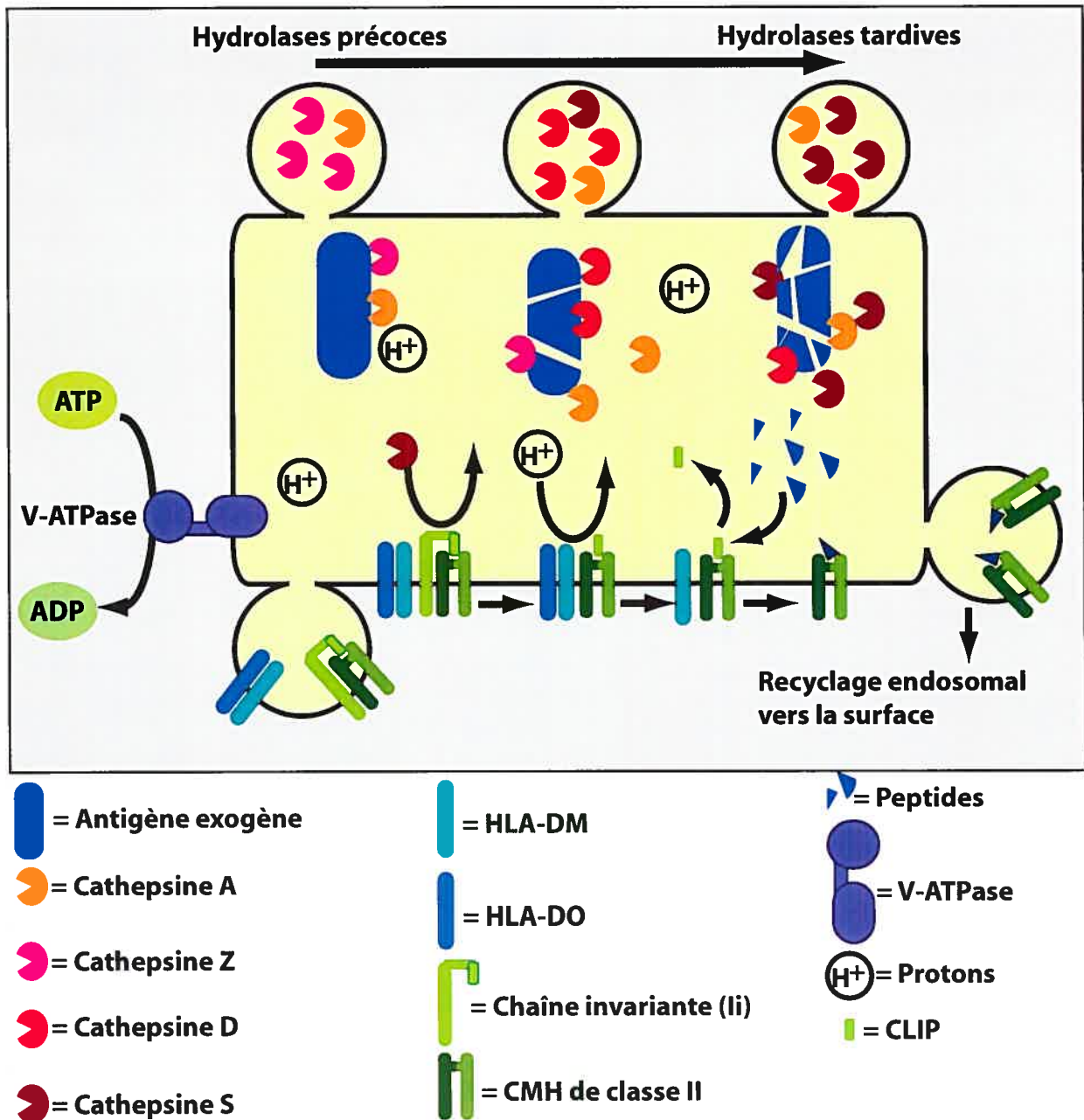
3.2.1 Génération des peptides

Les peptides exogènes présentés par le CMH-II sont issus de la dégradation de protéines étrangères ayant empruntées la voie endosomale. Ces protéines sont de nature soluble, internalisées par endocytose, ou particulières, internalisées par phagocytose (Watts, 1997). La dégradation des protéines internalisées est un processus hautement complexe, dont on commence à peine à comprendre les bases régulatrices. En effet, un équilibre entre la dégradation constructive et destructive doit être atteint afin de permettre l'élaboration d'un patrimoine peptidique élargi (Villadangos et al., 2005). Cet équilibre est atteint grâce au contrôle de l'acquisition et de l'activité lytique des protéases présentes dans la lumière

du compartiment (Figure 6). Il a été démontré que l'acquisition de cathepsines dans les compartiments endosomaux se faisait de manière séquentielle et hautement régulée (Garin et al., 2001). En plus de contrôler l'arrivée séquentielle de certaines protéases, l'activité hydrolytique de ces dernières est modulée lors de la maturation du compartiment. Bohley et Seglen ont démontré que l'activité lytique des cathepsines dépendait non seulement de l'autoprotéolyse régulée par l'acidité de la vacuole, mais pouvait aussi impliquer la présence de protéases actives additionnelles (Bohley et Seglen, 1992). L'acquisition et l'activation des cathepsines peuvent aussi être modulées par GILT (Gamma-Interferon-inducible Lysosomal Thiol Reductase), une enzyme lysosomale synthétisée lors d'une activation par l'interféron- γ (Phan et al., 2000). Cette dernière a de plus un rôle à jouer au niveau du dépliement des protéines étrangères en provoquant la rupture des ponts disulfures, ce qui facilite l'activité protéolytique des cathepsines (Driessen et al., 1999). L'équilibre entre la dégradation constructive et destructive est atteint lorsque la CPA arrive à générer un peptide d'une taille adéquate et de le charger sur le CMH-II avant que la dégradation ne soit trop prononcée (Villadangos et al., 2005).

Les protéases qui permettent la génération du patrimoine peptidique d'antigènes exogènes sont les cathepsines (Villadangos, 2005). Il existe une grande variété de cathepsines et leur niveau d'expression, leur localisation cellulaire et leur activité hydrolytique peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre. Ceci permet à certaines cellules de présenter de peptides de manière exclusive. Il a d'ailleurs été démontré que les niveaux d'expression des cathepsines S et L se complémentaient selon l'état de maturation des cellules dendritiques (Paul, 2003). La variabilité du bagage d'hydrolases que contiennent les cellules présentatrices pourrait permettre l'élaboration d'une diversité et d'un nombre accrus de peptides immunogènes.

Figure 6. Modèle de présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe II.



3.2.2 Chargement de peptides et acheminement vers la surface

Les peptides produits lors de la dégradation de protéines exogènes, ayant empruntés la voie endocytaire, diffèrent selon la vacuole dans laquelle ils ont été générés. Ainsi, les patrons peptidiques varient selon le niveau de maturation de la vacuole de dégradation (Villadangos, 2001). Ceci implique que la présence des CMH-II à tous les niveaux de maturation est cruciale afin d'assurer la génération d'une grande diversité de peptides présentés. Le maintien de la présence des CMH-II est rendu possible grâce à plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires (Villadangos, 2001; Cresswell, 1996). Afin de bien comprendre ces mécanismes, il est important de connaître comment le CHM-II atteint sa maturité.

Suite à la synthèse des chaînes α et β , celles-ci sont glycosylées et assemblées dans le RE (Roche et al., 1991). La poche peptidique du CMH-II est stabilisée grâce à l'interaction avec la portion CLIP de la chaîne invariante (Ii) (Ghosh et al., 1995). La chaîne invariante se trouve sous forme trimérique et promouvoit la formation de trois complexes Ii/CMH-II en interagissant avec plusieurs domaines des chaînes α et β du CMH-II (Cresswell, 1996; Castellino et al., 2001). La formation d'un nanomère composé de trois complexe trimériques $(\alpha\beta Ii)_3$ permet au CMH-II de quitter le RE et d'atteindre le compartiment trans-golgien. Les complexes sont ensuite ciblés vers les endosomes grâce au domaine cytosolique d'Ii (Wolfe et Ploegh, 1995).

Dans les endosomes, les CMH-II couplés à Ii ne sont pas capables de lier des peptides, même si ceux-ci sont présents en excès. Il doit y avoir une libération de la poche peptidique afin d'obtenir cette liaison. Ceci est rendu possible grâce à la dégradation séquentielle d'Ii puis la dissociation de CLIP de la poche peptidique (Figure 6). La dégradation de Ii se fait principalement par l'activité de cathepsine S (Nakagawa et al., 1999; Shi et al., 1999). Cependant, cette dégradation est incomplète et une portion d'Ii, CLIP, demeure liée à la poche peptidique du CMH-II. La libération de la poche peptidique

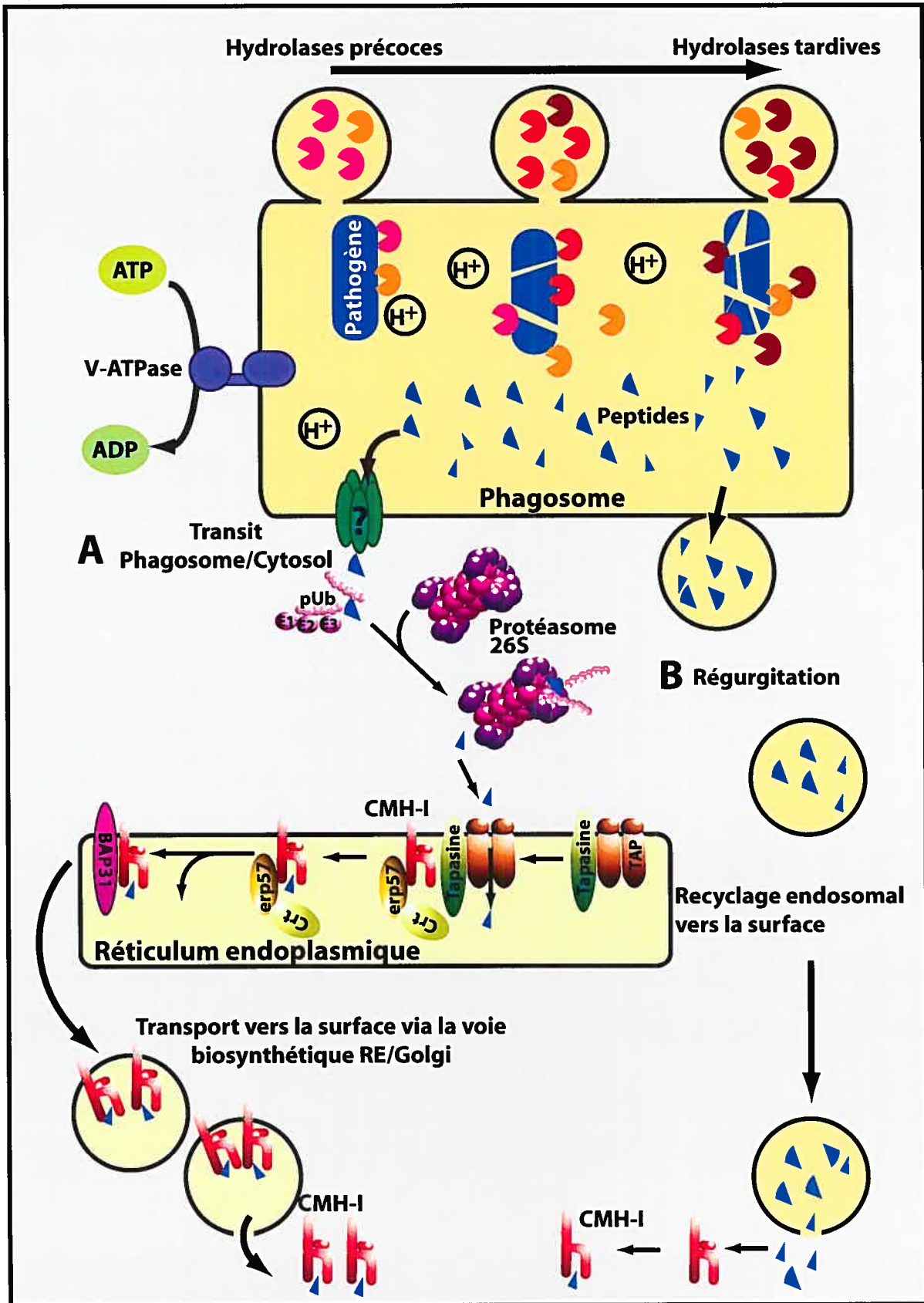
est effectuée par l'activité hydrolytique de DM, une protéine transmembranaire de type II de la famille des CMH (Kropshofer et al., 1999). La dissociation de CLIP permet de maintenir une poche peptidique 'ouverte' et promouvoit la liaison des peptides exogènes générés dans le compartiment. L'activité de DM est non seulement modulée par le pH, mais aussi par DO, autre chaperonne de la famille des CMH, que l'on retrouve uniquement chez les lymphocytes B. Grâce aux activités modulables de cathepsines, de DM et de DO (Alfonso et al., 1999), les CMH-II sont présents à travers la diversité des populations de vacuoles endosomales, ce qui permet le chargement d'un grand nombre de peptides, générés tout au long du processus de dégradation.

Les complexes CMH-II/peptides sont alors extirpés des vacuoles endosomales de manière préférentielle, ce qui implique un facteur de tri et un mécanisme de reconnaissance de complexes immunologiques chargés (Figure 6). Les mécanismes employés par la cellule restent toutefois à être déterminés. Cependant, ceux-ci semblent être très spécifiques et impliquent une reconnaissance spécifique de la liaison peptide/MHC-II dû au fait que des peptides comportant les mêmes séquences peptidiques enfouis dans la poche immunologique semblent être regroupés lors du transport vers la surface (Engelhard, 1994). L'acheminement vers la surface est accompli par le recyclage des endosomes et impliquerait les mêmes machineries moléculaires (Askew et al., 2000).

3.3 Présentation croisée des peptides exogènes par le CMH de classe I

Les deux modèles précédents de présentations antigéniques ont permis l'explication d'une grande partie des observations faites lors de l'élaboration d'une réponse immunitaire. Cependant, certains résultats concernant les parasites intracellulaires ne semblaient pas cadrer avec ces modèles. Des observations faites chez des souris injectées de souches irradiées de *Mycobacterium leprae* ont démontré la présence de cellules T cytotoxiques capables de lyser les macrophages présentant des antigènes dérivés de ce pathogène (Chiplunkar et al., 1986). Ceci paru très étonnant vu la nature exogène des antigènes. Des expériences, faites ultérieurement dans des cellules de Schwann infectées du même parasite, ont démontré que l'activité lytique des CTL devait passer par une présentation antigénique via le CMH-I. Les chercheurs sont arrivés à cette conclusion, car les cellules de Schwann ne possèdent pas de molécules de CMH-II pour la présentation antigénique (Steinhoff et Kaufmann, 1988). Plus tard, des travaux réalisés par le groupe de Ken Rock ont démontré que la phagocytose de billes de latex couvertes d'un antigène soluble, l'ovalbumine, menait à l'activation de populations de lymphocytes T CD8⁺ et engendrait la lyse du phagocyte présentateur (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993). Ils ont de plus été capables de démontrer que la voie d'entrée de l'antigène avait une forte incidence sur le potentiel activateur de la présentation antigénique croisée. En effet, ces résultats présentent la phagocytose comme étant le moyen le plus efficace pour promouvoir la présentation croisée d'antigènes exogènes, ayant un potentiel activateur de lymphocytes TCD8⁺ de 1000 à 10000 fois plus puissant que lorsque l'antigène est ingéré par endocytose (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993). Cependant, les mécanismes régulant cette forme de présentation antigénique demeurent inexpliqués. Ceci vient du fait que la machinerie responsable du chargement des peptides réside dans un compartiment cellulaire complètement distinct, le réticulum endoplasmique. Les sections qui suivent illustrent deux modèles cherchant à expliquer le phénomène de présentation antigénique croisée (Figure 7).

Figure 7. Modèle de présentation croisée d'antigènes exogènes par le CMH de classe I.



3.3.1 Présentation croisée selon le modèle de la régurgitation

Les peptides présentés lors de la présentation croisée sont acquis par deux mécanismes d'internalisation : l'endocytose et la phagocytose. Étant donné que la phagocytose semble être la voie d'entrée permettant l'activation la plus efficace des CTL (Kovacs-Bankowski et al., 1993; Harding et Song, 1994), seule cette dernière sera considérée lors des descriptions de modèles de présentation.

Les antigènes particuliers internalisés par phagocytose sont graduellement dégradés dans la lumière du phagosome lors de sa maturation (Figure 7). Les hydrolases acquises pendant la biogenèse du phagolysosome sont responsables de l'activité lytique de l'organelle et pourraient être responsables de la génération des peptides à être présentés sur les CMH-I (Harding et Song, 1994). Cependant, la machinerie de présentation associée aux CMH-I se trouve dans le RE. L'équipe de Song propose un modèle où les peptides antigéniques générés dans le phagosome sont régurgités dans le milieu extracellulaire puis chargés sur les CMH-I déjà présents à la surface de la cellule (Figure 7B). Ce modèle a été établi suite à des expériences effectuées sur deux populations de macrophages cultivées dans des chambres conjointes, séparées d'une membrane poreuse. L'une des populations de macrophages était préalablement fixée avant l'expérimentation. L'autre population de macrophages a internalisé des billes de latex couplées à de l'ovalbumine par phagocytose. Après une période d'incubation, des lymphocytes TCD8⁺ ont été rajoutés dans la chambre de culture contenant la population de macrophages fixés, ce qui a causé l'activation des cellules T et la sécrétion d'IL-2. Ces résultats démontrent que les peptides générés par les macrophages viables ont été relâchés dans le milieu extracellulaire et ont diffusé jusque dans la chambre de culture avoisinante à travers la membrane poreuse. Ils ont finalement été chargés sur les CMH-I présents à la surface des macrophages fixés, où ils ont été capables d'activer les lymphocytes ajoutés. Le modèle de Harding et Song propose aussi que les peptides sont générés entièrement dans la lumière du phagosome suite à l'activité

hydrolytique des protéases (Figure 7B). Cependant, ce modèle sera fortement critiqué due à la piètre efficacité du système utilisé.

3.3.2 Présentation croisée selon le modèle du transit phagosome-cytosol-RE

Contrairement aux résultats générés par l'équipe de Song, les travaux effectués par l'équipe de Fleischacker démontrent que l'inhibition de protéases ou de la maturation phagosomale n'altèrent pas la capacité des macrophages à effectuer la présentation croisée et à activer les CTL (Rock et al., 1993). Cependant, l'inhibition de la synthèse protéique par la gelonine diminue de manière significative la présentation croisée par les CMH-I. De plus, des résultats impliquant le protéasome dans la présentation antigénique croisée remettent en question le modèle de régurgitation (Rock et al., 1993; Kovacovics-Bankowski et al., 1995; Oh et al., 1997; Shen et al., 1997). Aussi, un transfert du contenu antigénique de la lumière du phagosome vers le cytosol est observé tant chez les macrophages que les DC (Shen et al., 1997). Des expériences de phagocytose de billes de latex couvertes d'ovalbumine biotinylée ont confirmé ces observations. (Oh et al., 1997). Les résultats permettent de suggérer la présence d'une machinerie de rétrotranslocation pouvant permettre un tel transfert. Toutefois aucune cible moléculaire n'est alors identifiée (Figure 7A). Le modèle de transit phagosomal-cytosol propose aussi que les peptides retrouvés dans le cytoplasme sont processés de la même manière que ceux normalement pris en charge par la voie classique de présentation par le CMH-I (Figure 7A). Ils subissent une étape de polyubiquitination, suivie de la dégradation par le protéasome. Suite à cette dégradation, les peptides diffuseraient de manière passive ou active vers le RE, où ils seraient retransloqués vers la lumière du RE via le transporteur TAP (Rao et al., 1997; Guermonprez et al., 1999). L'importance de TAP pour la présentation croisée a été démontrée à l'aide de mutants *TAP^{-/-}* qui n'expriment pas ces protéines. Ces mutants étaient incapables de stimuler la prolifération de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à l'antigène utilisé. Suite à la retranslocation, les peptides sont chargés sur les CMH-I à l'aide des chaperonnes du RE et transitent vers la membrane plasmique selon la voie

normale de biosynthèse via le Golgi (Figure 7A). L'inhibition de la voie biosynthétique à l'aide de la Brefeldine A (BFA) bloque la présentation des peptides exogènes et empêche l'activation des CTLs. Par contre, des résultats démontrant un acheminement vers la surface par une voie insensible aux traitements à la BFA pourrait bien illustrer la présence de routes complémentaires (Harding et Song, 1994).

Le modèle du transit antigénique du phagosome vers le RE par l'intermédiaire du cytoplasme semble bien expliquer les observations faites par plusieurs groupes de chercheurs. Or, la manière avec laquelle les peptides sont rétrotransloqués dans le cytoplasme, ciblés pour la dégradation vers le protéasome puis transportés vers le RE restent jusqu'à ce jour inexplicables. Dernièrement, une analyse protéomique rigoureuse de la composition protéique du phagosome a permis de fournir des hypothèses quant à l'identité de la machinerie requise pour effectuer ces étapes encore mal comprises (Garin et al., 2000). En effet, plusieurs composantes du RE, aussi impliquées dans l'apprêtement et le chargement de peptides sur les CMH de classe I, ont été identifiées sur le phagosome (Garin et al., 2001). Cependant, le rôle que pourrait jouer l'apport de cette organelle n'est pas encore connu.

4 Transport d'ARN messagers et contrôle de la traduction locale.

4.1 Introduction

La découverte du transport d'ARN chez les eucaryotes remonte à il y a environ 40 ans (Bodian et al., 1965). Cependant, ces résultats préliminaires n'ont pas été reçus avec grand enthousiasme par les chercheurs. Même après la démonstration d'un ciblage dirigé d'ARN et de complexes ribosomiaux dans les années 80, ces phénomènes sont demeurés obscurs et perçus comme étant artéfactuels (Steward et al, 1982; Jeffery et al., 1983). Vers la fin des années 80 et le début des années 90, il devient clair que la machinerie impliquée dans la biosynthèse, ainsi que des molécules d'ARN individuelles pouvaient être ciblées vers des sites cellulaires pouvant se trouver à des distances considérables du noyau. Des preuves venant de plusieurs modèles cellulaires incluant la drosophile, les oocytes de *Xenopus* et le neurone sont venus supporter ce concept et ont permis de démontrer que ce dernier était conservé dans l'évolution des eucaryotes (Huang et Richter, 2004; King et al., 2005).

Aujourd'hui, notre compréhension du phénomène s'est grandement approfondie et nous dépeint un modèle où les ARN messagers sont transportés, localisés et traduits localement de manière régulée chez plusieurs types cellulaires eucaryotiques (Kindler et al., 2005). Ces mécanismes semblent être fondamentaux pour la régulation de l'expression génique, car ils permettent à la cellule de déléguer ce contrôle à des sites autonomes. Ceci est particulièrement important chez le neurone, une cellule fortement polarisée, chez qui la plasticité de la modulation des connections synaptiques forme le moteur même des fonctions cérébrales relatives à l'apprentissage et la mémoire. Ces remodelages

synaptiques nécessitent des changements au niveau de l'expression génique ainsi qu'une production *de novo* de protéines. L'avantage de pouvoir contrôler ces mécanismes localement devient alors évident, surtout que le neurone peut effectuer des milliers de connections à ses terminaisons dendritiques (Kindler et al., 2005).

Malgré que les mécanismes décrits plus haut sont observés dans plusieurs types cellulaires, le neurone sera utilisé afin d'illustrer les modèles décrits dans les lignes qui suivent puisqu'il représente le modèle le plus approfondi sur le sujet. Cependant des exemples illustrant d'autres types cellulaires seront énoncés là où les avancements scientifiques développent le modèle davantage.

4.2 Transport et localisation d'ARN messagers

Le transport et la localisation d'ARN sont des phénomènes assez répandus chez les eucaryotes, ayant été observés chez des organismes unicellulaires (levures), des cellules germinales et embryonnaires (*Drosophila sp.* et *Xenopus*), des cellules végétales ainsi que chez les cellules mammifères (Huang et Richter, 2004; King et al., 2005). Ce ciblage actif nécessite la participation d'éléments agissant en *cis*, des régions de l'ARN ciblé comportant des codes spécifiant ce ciblage et d'éléments agissant en *trans* pouvant lier ces régions et effectuer la localisation. Les interactions entre éléments *cis* et *trans* permettent la formation de complexes ribonucléiques, les granules d'ARN, pouvant s'associer et voyager le long de filaments de microtubules, propulsés par des moteurs protéiques. Arrivés à destination, ces granules d'ARN sont fins prêts pour la traduction. Dans cette section seront décrits les facteurs menant au transport et à la localisation de l'ARN.

4.2.1 Éléments de ciblage agissant en *Cis et en Trans*

Les éléments agissant en *cis* (EAC), encodant la localité des transcrits, ont été identifiés sur plusieurs ARNs exprimés chez différents types cellulaires eucaryotiques dont les neurones. Des éléments de ciblage dendritique (ECD) ont été retrouvés dans plusieurs ARNm neuronaux. Les ECDs ne semblent pas posséder une longueur définie et pourraient fort bien encoder, dans leur séquence, plusieurs destinations au niveau de l'arborisation dendritique du neurone. Le maintien et la complexité de la mosaïque macromoléculaire du répertoire protéinique à ces sites cellulaires sont atteints grâce à la traduction locale des transcrits disponibles, plutôt que d'un ciblage distal de protéines synthétisées au corps cellulaire. La diversité des EACs identifiés chez un type de cellule, comme le neurone, reflète la gamme de cibles cellulaires disponibles. Quant aux facteurs agissant en *trans* (FAT), ils sont en général de nature protéinique et assurent le transport et la localisation des ARNm en liant directement les EACs. Dans ce contexte, les FATs peuvent être considérés comme des agents décodeurs pouvant relier la localité à un ARN donné. Plusieurs exemples de ciblage d'ARNm spécifique existent dans la littérature, mais seul celui du transport et de la localisation de l'ARNm codant pour la β -actine sera développé dans les lignes qui suivent, considérant son importance au niveau de la phagocytose.

4.2.1.1 Ciblage de l'ARNm codant pour la β -actine

L'actine, élément prépondérant du cytosquelette, sert à maintenir la forme de la cellule, assure la motilité cellulaire et d'organelles et prend part à d'autres processus cellulaires. La polymérisation de l'actine au niveau de la frange de progression (leading edge) de cellules en mouvement régule l'extension de lamellipodes, de filopodes et de pseudopodes (Rafelski et Theriot, 2004). Tel que décrit plus haut, l'extension des pseudopodes est aussi un événement crucial lors de la phagocytose (Aderem et Underhill, 1999). Il a été démontré que les transcrits de l'ARNm de la β -actine étaient ciblés à proximité de la frange frontale de fibroblastes et de myoblastes (Lawrence et Singer, 1986).

Une séquence de 54 nucléotides (zipcode 54) trouvée dans la région non traduite 3' (3'UTR) de cet ARNm est responsable du ciblage (Kislauskis et al., 1994). Chez le neurone du rat, le ciblage aux dendrites des ARNm de la β -actine nécessite aussi la présence de cet ECD (Eom et al., 2003). Par contre le ciblage de l'ARNm de la γ -actine est différent et ne possède pas cette même séquence de 54 nucléotides (Medrano and Steward, 2001). Ceci démontre que certains ECDs sont conservés à travers l'évolution des espèces et ajoute à l'importance de ces derniers dans les processus cellulaires.

Afin de discriminer entre la localisation de la β et la γ -actine, la cellule possède des FAT pouvant assurer cette tâche. ZBP1 (Zipcode binding protein) fait partie de la famille de protéines liant l'ARN possédant deux sites de liaison pour cette macromolécule et quatre domaines homologues à hRNP K (heterogeneous ribonucleoprotein K) (Yaniv et Yisraeli, 2002). Des mutations dans la région de zipcode 54 de l'ARNm de la β -actine réduit l'association avec ZBP1 causant une diminution marquée de la localisation de ce transcrit au niveau de la frange de progression (Ross et al 1997). Chez le neurone en développement, une diminution de l'interaction entre zipcode 54 et ZBP1 bloque le ciblage de l'ARNm de la β -actine au cône de croissance lors d'une réponse à la neurotrophine et diminue significativement la croissance du cône (Zhang et al., 2001). Chez le neurone mature, ZBP1 et l'ARNm de la β -actine sont tous deux localisés dans les prolongements et les épines des dendrites et un niveau amoindri de ZBP1 cause une diminution de la présence d'ARNm dans ces régions cellulaires. Une surexpression d'ARNm comportant les séquences zipcode 54 causent une augmentation de ces transcrits à ces sites (Eom et al., 2003). Ces résultats démontrent clairement le rôle conjoint des régions non codantes de l'ARNm de la β -actine et ZBP1 pour le ciblage adéquat chez le neurone. Le ciblage d'autres ARNm nécessite d'autres types de FAT. Toutefois, certains FAT peuvent être employés afin de cibler plus d'un ARNm.

4.2.2 Le cytosquelette et les moteurs moléculaires

Afin d'arriver à leur site de traduction, les ARNm ainsi que leurs protéines régulatrices associées doivent voyager à travers la cellule. Plusieurs éléments cytosquelettiques supportent le transport et l'ancrage local d'ARNm. Chez les fibroblastes, les microfilaments sont employés afin de transporter et localiser l'ARNm de la β -actine. Par contre, chez le neurone, le transport du granule d'ARNm de l'actine et ZBP1 s'opère par les microtubules (Bassell et Kelic, 2004). Ceci semble suggérer que le transport distal des ARNm est assuré par les microtubules tandis que la localisation serait atteinte grâce aux microfilaments d'actine (Muslimov et al., 2002). Les granules contenant CPEB (cytoplasmic polyadénylation element binding protein), une protéine qui assure le transport et la répression traductionnelle des ARNm, sont aussi composés de kinésine et de dynéine, deux moteurs moléculaires ATPasiques. Ces complexes moléculaires ribonucléoprotéiques voyagent de manière bidirectionnelle sur les filaments de microtubules (Huang et al., 2003). D'autres granules d'ARNm, dont la présence de kinésine fut révélée lors de différentes études, comportaient aussi une variété de FAT, dont certains ont été mentionnés plus haut (Kanai et al., 2004). Ces résultats appuient l'hypothèse que le transport distal d'ARNm, en grande partie effectué par les moteurs moléculaires kinésine et dynéine, implique le support de microtubules.

4.3 Contrôle local de la traduction

Afin de permettre à ce mécanisme de prendre toute son importance au niveau des fonctions cellulaires, les ARNm transportés doivent subir un contrôle rigoureux de leur traduction. Non seulement la traduction de ces derniers est réprimée lors du transport, mais elle est aussi fortement régulée une fois le complexe arrivé à destination. Cette section traitera des mécanismes de répression de la traduction d'ARNm lors du transport et ceux employés afin de contrôler la synthèse protéique une fois l'ARNm localisé.

4.3.1 Répression traductionnelle lors du transport

La répression traductionnelle lors du transport d'ARNm a été démontrée chez plusieurs types de cellules et semble constituer la règle générale en ce qui a trait à ce processus. Elle permet entre autre de prévenir la traduction lorsque l'ARNm est en route afin d'empêcher l'expression ectopique (Kwon et al., 1999). Chez le neurone, une coordination entre le transport et la répression est effectuée par CPEB qui, lorsque colocalisée avec maskin (répresseur de eIF4E), contrôle en même temps l'activité de CPE (cytoplasmic polyadénylation element) et le transport du granule d'ARNm en liant les filaments du cytosquelette (Huang et al., 2003). Ces granules ribonucléoprotéiques forment des complexes macromoléculaires pouvant contenir d'autres types d'ARN non-traduits, plusieurs FATs en plus de composantes de la machinerie de traduction (Anderson et Kedersha, 2006). Ces méga-complexes semblent pouvoir se former assez rapidement. Des travaux faits chez les oligodendrocytes ont démontré que les granules d'ARN étaient formés seulement quelques minutes après une injection d'ARNm de la MBP (myelin basic protein) dans le corps cellulaire (Ainger et al., 1997). Toutefois, la traduction de ces ARNm ne s'effectuait qu'une fois qu'ils étaient localisés au niveau des prolongements myélinisés (Boccaccio, 2000). D'ailleurs, une isolation de granules d'ARN, suite à un marquage métabolique de courte durée, n'a révéler aucune présence d'acide aminé radioactif, démontrant clairement la répression traductionnelle lors du transport de granules d'ARN (Krichevsky et Kosik, 2001). Il a aussi été montré que ces complexes ribonucléoprotéiques ne possèdent pas certains facteurs clés reliés à la machinerie traductionnelle et que certains répresseurs connus de la traduction, comme RNG105, peuvent être localisés dans les granules expliquant ainsi la répression traductionnelle observée (Shiina et al., 2005)

4.3.2 Mécanismes de contrôle traductionnel

Une fois arrivés à destination, les granules d'ARN sont toujours maintenus sous un contrôle traductionnel. Afin de bien comprendre ces mécanismes de régulation, il est important de connaître les étapes requises à la traduction. Celle-ci se passe en trois étapes distinctes : (1) l'initiation, (2) l'élongation et (3) la terminaison. Chacune de ces étapes peut être sujette à la régulation. Cependant, puisque l'initiation traductionnelle constitue une étape limitante dans ce processus, cette dernière est souvent la cible de régulateurs de l'expression génique (Kapp et Lorsch, 2004).

Durant l'initiation, le complexe de pré-initiation 43S est formé à partir de la sous-unité ribosomale 40S ainsi que le complexe tertiaire composé d'eIF2 (initiation factor 2), GTP et Met-tRNA (ARN de transfert associé à la méthionine). Le complexe 43S est alors recruté au codon d'initiation AUG de l'ARNm afin de former le complexe 48S. Cette étape requiert la participation d'une série de facteurs de la famille eIF4. Suite à la dissociation subséquente de ces facteurs, la sous-unité ribosomale 60S rejoint la 40S afin de former le ribosome mature de 80S et l'élongation s'ensuit (Hershey et Merrick, 2000). Durant l'élongation, eEF1A (elongation factor 1A) dirige l'arrivée des aminoacyl-tRNA au site A ribosomal. Une fois le lien peptidique formé, le ribosome est transloqué vers le codon suivant sous l'effet catalysant d'eEF2. Ceci se reproduit sur toute la longueur de l'ARNm jusqu'à l'arrivée du codon stop, ce qui termine la traduction et induit le relâchement des facteurs et du ribosome (Hershey et Merrick, 2000).

Tel que mentionné plus haut, l'initiation de la traduction est souvent la cible de régulateurs traductionnels. Le facteur d'initiation de traduction eIF4E, composante du complexe eIF4F, lie la région 5' de l'ARNm et permet le recrutement du complexe 43S enclenchant ainsi une série d'événements menant à la synthèse protéique (Kapp et Lorsch, 2004). Plusieurs voies de signalisation permettent la régulation de la traduction en visant

eIF4E et les deux premiers exemples qui suivent en font partie. Le troisième exemple, lui, décrit un mécanisme de contrôle de l'élongation lors de la traduction.

4.3.2.1 Contrôle de la traduction par mTOR

Le contrôle traductionnel au niveau des connections synapto-dendritiques, vu leur importance dans la plasticité neuronale, sert de modèle afin d'étudier les mécanismes de la régulation locale de la traduction. La plasticité synaptique est, entre autre, médiée par la neurotrophine BDNF (brain-derived neurotrophic factor) qui permet l'initiation de la traduction en agissant sur mTOR (mammalian target of rapamycin), une kinase sérine/thréonine. Une fois activée, mTOR phosphoryle les protéines associées à eIF4E, ce qui engendre leur dissociation de cette dernière. Une fois libérée, eIF4A devient phosphorylé sous l'effet de mTOR et l'initiation de la traduction est engendrée (Raught et al., 2000). Les joueurs clés de cette voie de signalisation : mTOR, eIF4E et eIF4E-BP (eIF4E binding protein) ont tous été localisés dans les régions post-synaptiques du neurone et semblent être essentiels à la potentiation synaptique à long-terme (Tang et al., 2002). L'application de la rapamycine sur des tranches d'hippocampes inhibe la potentiation de la synapse induite par BDNF (Tang et al., 2002). La phosphorylation de eIF4E-BP par mTOR semble donc être l'événement crucial afin de libérer eIF4E et induire la traduction lorsqu'en présence de BDNF (Takei et al., 2001, 2004).

4.3.2.2 Contrôle de la traduction par CPE

La voie de signalisation par CPE passe aussi par la régulation de l'initiation de la traduction et a longuement été étudiée chez les oocytes de *Xenopus*. Certains ARNm, possédant une queue poly-A écourtée en 3', demeurent traductionnellement dormants. L'initiation de ce type d'ARNm passe par l'activité de CPE qui permet le rajout d'adénines (Mendez et al., 2001).

Chez le neurone, l'extension et l'arborisation des dendrites sont, en partie, régulées par CaMKII α (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha). Ceci permet au neurone de posséder une plasticité au niveau des connections synapto-dendritiques. L'ARNm de CaMKII α possède deux sites de liaison à CPE dans sa région 3' UTR. La traduction de cet ARNm dépend de l'élongation de la queue poly-A par CPE. L'activation du NMDAR (N-methyl-d-aspartate receptor) à la jonction post-synaptique induit la phosphorylation de la kinase Aurora. Cette dernière phosphoryle à son tour CPEB qui se lie ensuite à CPE permettant le recrutement de la poly-A polymérase afin de poly-adyler les ARNm ciblés. Une fois phosphorylée, CPEB est reconnue par Symplekin, une protéine de charpente, et xGLD-2, une autre poly-A polymérase (Barnard et al., 2004). La polyadénylation induit la dissociation de Maskin, ce qui démasque alors eIF4A et initie la traduction (Richter, 2000).

4.3.2.3 Contrôle de la traduction par FMRP

FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) est impliquée dans la régulation de la traduction dendritique, malgré que le mode exact de son action demeure incertain. Il a été suggéré que FMRP pourrait inhiber la traduction en se liant directement à l'ARNm ciblé (Li et al., 2001). Au niveau de la synapse, l'induction de traduction causée par l'activation de NMDAR et mGluR (metabolic glutamate receptors) met en ligne de cause FMRP (Antar et al., 2004; Gabel et al., 2004). Une suppression de la traduction de groupes d'ARNm impliquerait une interaction entre FMRP et BC1, un ARN non-traduit connu pour agir comme répresseur traductionnel (Zalfa et al., 2003). Cependant, certaines études tendent à démontrer que FMRP et BC1 n'interagissent pas directement l'un avec l'autre dû au fait que l'un est isolé avec les polysomes (Stefani et al., 2004), tandis que l'autre est retrouvé dans la fraction plus légère avec les RNPs (Krichevsky et Kosik, 2001).

Aussi, l'état de phosphorylation de FMRP pourrait être un autre déterminant de son activité. Sous son état déphosphorylé, FMRP est associé à des polysomes en traduction

active, alors que phosphorylé, on la retrouve associée à des polysomes inactifs (Ceman et al., 2003). De plus, des études ont démontré que FMRP s'associe directement à l'ARNm d'eIF1A bloquant ainsi la traduction de ce dernier (Sung et al., 2003). Étant donné le rôle d'eIF1A dans l'initiation de la traduction, une chute dans l'expression de cette protéine aurait un impact fort important sur la traduction locale et globale. Finalement, il a même été proposé que FMRP puisse agir de concert avec les microARN, de petits ARN (21-24 nucléotides), qui agissent comme répresseur de la traduction de manière similaire aux petits ARN interférants (siRNA) (Jin et al., 2004; Ambros, 2003). Quoi qu'il en soit, FMRP semble avoir un rôle important au niveau du contrôle de la traduction locale chez le neurone. D'autres études portant sur le mode d'action exact de cette protéine nous permettront de mieux comprendre le phénomène de la répression traductionnelle lors du transport et la localisation des ARNm.

5. Objectifs de travail

La protéomique révèle la présence du réticulum endoplasmique : contaminant ou composante du phagosome?

L'analyse protéomique d'échantillons contenant une préparation hautement enrichie de phagosomes isolés à partir de cellules d'une lignée immortelle de macrophages a permis l'identification de plus de 150 protéines (Garin et al., 2001). L'observation que la majorité de ces protéines avaient déjà été liées à ce type d'organelle a fourni la preuve que la méthodologie employée était bonne et que la protéomique s'avérait être un outil indispensable quant à l'analyse du patrimoine protéinique du phagosome. Avec l'aide de diverses méthodes biochimiques, les auteurs ont pu développer davantage la caractérisation du protéome du phagosome. Les analyses protéomiques combinées à d'autres techniques microscopiques et biochimiques ont démontré la présence d'un dynamisme très complexe quant à l'acquisition et la perte de certains marqueurs lors de la maturation phagosomale. Ceci a été particulièrement efficace lors de la démonstration de l'acquisition séquentielle de plusieurs hydrolases présentes dans la lumière du phagosome (Garin et al., 2001).

Cependant, en plus des protéines dont on s'attendait retrouver dans une organelle dont la fonction première était la dégradation, certaines familles de protéines étaient aussi présentes de manière très distincte. La découverte de la présence de flotilline 1 lors de ces analyses a servi d'étincelle afin d'arriver, après maintes expériences et démonstrations, que les radeaux lipidiques étaient présents dans les membranes phagosomales et qu'ils remplissaient des rôles tout aussi importants (Dermine et al., 2001; Gulbins et al., 2004). Des analyses faites à l'aide de parasites intracellulaires ont démontré qu'ils pouvaient même être la cible de facteurs microbiens causant ainsi une dérégulation de la maturation phagosomale (Dermine et al., 2005; Kim et al., 2004; Maldonado-Garcia et al., 2004). En plus des radeaux lipidiques, les analyses ont révélé la présence de protéines associées à la

régulation de l'apoptose. Des études subséquentes entreprises par d'autres unités de recherches ont pu démontrer que certains parasites intracellulaires avaient la capacité de moduler l'induction de l'apoptose des cellules hôtes, leur permettant ainsi une survie prolongée ou constituaient un mécanisme d'échappement et de réinfection (Laskay et al., 2003; Borjesson et al., 2005).

En plus de ces protéines nouvellement identifiées comme étant associées aux phagosomes, plusieurs protéines du réticulum endoplasmique ont aussi été identifiées. Comme de fait, plus d'une dizaine de protéines appartenant au RE furent identifiées lors de ces analyses (Garin et al., 2001). Cependant, l'identification de protéines par analyses protéomiques ne signifient pas nécessairement que celles-ci soient des composantes formelles de l'organelle analysée. Le RE, étant une organelle représentant près de 40% de la totalité des membranes retrouvées chez le macrophage, pourrait mener à l'identification de certaines de ses composantes lors d'analyses d'échantillons contaminés par de telles membranes. Toutefois, des analyses protéomiques de phagosomes provenant de l'amibe, une cellule aussi composée d'un réticulum endoplasmique très développé, n'ont pas révélé la présence d'une seule de ses composantes (Okada et al., 2005). De plus, l'absence quasi-totale de « contamination » venant d'autres organelles a permis l'élaboration de l'hypothèse que le RE devait faire partie intégrale au phagosome. Cette hypothèse est le fondement des résultats présentés dans cette thèse et constitue le sujet de la discussion qui suit.

Chapitre II : Résultats Article 1

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J.M., Desjardins, M. (2001) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131

Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages.

Etienne Gagnon¹, Sophie Duclos¹, Christiane Rondeau¹, Eric Chevet², Pamela H. Cameron³, Olivia Steele-Mortimer⁴, Jacques Paiement¹, John J. M. Bergeron^{3#} and Michel Desjardins^{1#*}

1) Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

2) Department of Surgery, McGill University, Montréal, Québec, Canada

3) Department of Cell Biology and Anatomy, McGill University, Montréal, Québec, Canada

4) Rocky Mountain Laboratories, Laboratory of Intracellular Parasites, NIAID, Hamilton, MT

#) Caprion Pharmaceuticals Inc., Montréal, Québec, Canada

* corresponding author

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. Centre ville tel: 514 343-7250

Montréal, Québec

fax: 514 343-2459

Canada, H3C 3J7

email: [REDACTED]

Running title: ER-mediated phagocytosis

Key words: Phagocytosis, Membrane fusion, Calnexin, Autophagy, Vacuolar ATPase, Leishmania

Summary

Phagocytosis is a key process in our innate ability to fight infectious diseases. In this study, fusion of the endoplasmic reticulum (ER) with the macrophage plasmalemma, underneath phagocytic cups, has been uncovered as a source of membrane for phagosome formation. Successive waves of ER are also recruited to maturing phagosomes during phagolysosome biogenesis, identifying ER as a compartment displaying unexpected pluripotent fusion properties. ER-mediated phagocytosis is regulated in part by phosphatidylinositol 3-kinase and used for the internalization of inert particles and intracellular pathogens, regardless of their final trafficking in the host. In neutrophils, where pathogens are rapidly killed, phagocytosis does not proceed by ER recruitment. We propose that intracellular pathogens have evolved to use ER-mediated phagocytosis as a Trojan horse to find safe haven and survive within their host cells.

Introduction

Phagocytosis, the process by which cells engulf foreign particles, occurs in a variety of organisms from unicellular, which use phagocytosis for nutrition, to mammals where phagocytosis plays a key role in innate immunity (see Aderem and Underhill, 1999). Phagocytosis, is initiated by the binding of particle ligands to a variety of receptors at the cell surface, triggering a diversity of signals leading to fine rearrangement of the actin cytoskeleton (May and Machesky, 2001), a step controlled by various small GTPases of the Rho/Rac family (Caron and Hall, 1998; Massol et al., 1998). Phosphatidylinositol 3-kinase is also recruited to the plasma membrane (PM) where it plays a role in pseudopodia extension and phagosome formation (Cox et al., 1999; Vieira et al., 2001). The remarkable capacity of macrophages for phagocytosis is illustrated by their ability to internalize particles often as large as themselves, without impairing their function and viability (Cannon and Swanson, 1992). Since the early report by Heine and Schnaitman (1971), it is widely accepted that phagosomes are formed by invaginations of the PM. To overcome the loss of the cell surface membrane, the PM components present on phagosomes are believed to be rapidly recycled to the cell surface (Pitt et al., 1992), while additional membranes are recruited to maturing phagosomes through fusion events with organelles of the endocytic and post-Golgi pathways (Desjardins et al., 1994a; Jahraus et al., 1998).

To understand the molecular mechanisms involved in phagolysosome biogenesis, we have undertaken a comprehensive characterization of the composition of latex bead-containing phagosomes using a proteomics approach. This led to the identification of over 250 proteins from this organelle (Garin et al., 2001; unpublished results) providing novel insights into the mechanisms of phagolysosome biogenesis. Surprisingly, the phagosome preparations contained several proteins of the endoplasmic reticulum (ER), including calnexin and calreticulin, suggesting that ER might either be a contaminant or play a role in the phagocytic process (Garin et al., 2001).

In the present study, we show that phagosomes are formed by the direct recruitment and fusion of ER to the PM during early phagocytosis. ER is also recruited in successive waves to supply membrane at various steps of phagosome maturation. ER-mediated phagocytosis is a widely used process in macrophages for the internalization of both inert particles and intracellular pathogens, including *Salmonella enterica serovar typhimurium* and *Leishmania donovani* shown to be present within phagosomes displaying ER characteristics. ER-mediated phagocytosis provides a framework to explain, among others, how ER proteins can reach the cell surface, and why antigens from intracellular pathogens can be presented by MHC class I molecules.

Results

Recruitment of calnexin-rich ER membranes to early phagosomes

To distinguish whether ER proteins are contaminants or genuine phagosome components, we used Western blot analysis and showed that the well-characterized ER proteins calnexin, calreticulin, and sec61p are highly enriched in phagosomes when compared to the total cell lysate and post-nuclear supernatant (Fig. 1a), indicating that these proteins are unlikely to arise from contamination.

If ER vesicles are contaminating the phagosome preparations, we expect these vesicles to be either inside the phagosomal lumen or loosely associated with the cytoplasmic surface of phagosomes. If, instead of being a contaminant, ER fuses directly with phagosomes, we expect the transfer of ER membrane proteins to the phagosome membrane, and the transfer of luminal ER proteins to the lumen of phagosomes. To address these possibilities, we performed pronase digestion on purified intact phagosomes, a procedure that degrades all the protein moieties exposed on the cytoplasmic side of these organelles, followed by a second isolation procedure to separate phagosomes from the released materials (Garin et al., 2001). This treatment resulted in the degradation of the cytoplasmic domain of calnexin, as shown by the loss of phagosome immunoreactivity to a calnexin C-terminus specific antibody (Fig. 1a). The deduced presence of the C-terminal domain of calnexin on the cytoplasmic side of phagosomes ruled out the presence of ER vesicles in the phagosome lumen that would otherwise be inaccessible to pronase. Since the intraluminal ER soluble protein calreticulin was insensitive to pronase treatment, this also ruled out the loose association of ER vesicles at the phagosome surface, as such vesicles would have been released by pronase treatment. Hence, calnexin and calreticulin are in their native orientation in phagosomes, as expected if direct fusion between ER and phagosomes occurs.

To demonstrate directly the presence of ER elements on the phagosome membrane, we performed confocal analysis with anti-calnexin antibodies on macrophages that had internalized latex beads for 30 min. The results showed a strong labeling for calnexin dispersed in the cytoplasm and around latex bead-containing phagosomes in situ (not shown). However, it was difficult to determine if phagosomes were really labeled or if they were simply present in a strongly ER-positive surrounding. Accordingly, we isolated phagosomes and performed the immunofluorescence analysis on purified organelles. This approach showed the presence of labeling around more than 70% of the isolated phagosomes (insert in Fig. 1b). Using preembedding immunogold labeling at the electron microscope (EM) level with antibodies against the cytoplasmic tail of calnexin, we were able to demonstrate the direct association of calnexin to the phagosome membrane (Fig. 1b; of 1095 gold particles counted, 88% were on the phagosome membrane). A strong labeling was also observed on rat liver ER microsomes added to our samples as a positive control (Fig. 1b, top right panel). In contrast, as a negative control, no labeling was observed when antibodies against the luminal domain of calnexin were used since this part of the molecule is not accessible by antibodies under our conditions (Fig. 1b, bottom right panel). These results identify calnexin as a *bona fide* constituent of the phagosome membrane. In most phagosomes, the calnexin labeling was not uniform across the membrane (Fig. 1c, left panel), being particularly abundant in thin membranes (large arrows; 94% of the labeling was present on thin membranes, ca. 6 nm in thickness). Parallel immunolabeling with anti-LAMP1, a marker of late endosomes and lysosomes, revealed labeling over thicker parts of the phagosome membrane (Fig. 1c, right panel, small arrows) (92% of the labeling was present on membranes ca. 9 nm thick). These results suggest that both ER and endocytic organelles contribute elements to the phagosome membrane.

In order to investigate when ER was recruited to phagosomes, we compared the relative abundance of calnexin on phagocytic structures isolated at different time points

after the addition of latex beads to macrophages. The various time points studied were chosen in order to allow for the separation of various phagocytic organelles including 1) phagocytic cups, which are membrane structures surrounding partially engulfed particles, and 2) phagosomes at various level of maturation along the phagolysosome pathway. Two approaches were used to identify the nature of these phagocytic structures. First, we measured by EM the number of beads present in closed phagosomes after each internalization time point. Second, we analyzed the biochemical composition of the various phagocytic organelles by taking advantage of our 2-D gel database containing more than two hundred identified protein spots (Garin et al., 2001). The results showed that cells fed latex beads for 15 min contained less than 10% of the number of phagosomes observed in cells that had internalized beads for 60 min, indicating that a minor part of the phagocytic structures analyzed at 15 min were closed phagosomes. Furthermore, 2-D gel analyses of the phagocytic structures isolated for our study clearly indicated that the earliest phagocytic structures formed in our conditions (15/0) differed greatly from maturing phagosomes (1h/3h and 1h/6h) (Fig. 2a). Densitometric analysis of the 2-D gels indicated that large amounts of antichymotrypsin, a serum protein attached to the surface of latex beads, was observed in the 15 min compartment while members of the cathepsin family, including cathepsin D, were not present (Fig. 2a, bottom right). These features are expected from phagocytic cups or very early phagosomes. Remarkably, high levels of the ER proteins GRP 94, BiP, PDI, and calreticulin were observed on the 15 min phagocytic cups/phagosomes. At later time points, the internalized antichymotrypsin was degraded by the acquired hydrolases during phagosome maturation. Densitometric measurement also showed that the level of ER proteins (e.g. PDI) decreased during the early stages of phagosome maturation, followed by an increase 6 h after bead internalization. This showed that phagocytic structures ranging from phagocytic cups to mature phagolysosomes could be isolated and that ER is already present on phagocytic cups.

To confirm kinetics of ER recruitment to phagosomes, we monitored by immunoblotting the acquisition of calnexin and LAMP1 (a marker of phagosome maturation) on the various phagocytic structures. When the same number of organelles was analyzed, the earliest compartments studied displayed the strongest signal for calnexin, while LAMP1 was present in low amounts (Fig. 2b), confirming that ER is recruited very early during phagosome formation. During phagosome maturation (confirmed by the gradual accumulation of LAMP1 at the other time points), full-length calnexin diminished in intensity while smaller forms of the protein still recognized by the anti-cytoplasmic tail antibody accumulated (including a band around 36 kDa). This pattern is consistent with the intraphagosomal degradation of the luminal domain of calnexin during phagolysosome biogenesis. Remarkably, mature phagosomes (1h/ON: over night chase of beads for 15h) displayed a strong signal for full-length calnexin and a diminished signal for LAMP1, suggesting that additional rounds of ER are recruited to mature phagosomes, diluting the LAMP1 content. The recruitment of successive waves of ER to phagosomes during phagolysosome biogenesis was confirmed by following several ER proteins, using polyclonal antibodies raised against a highly enriched rat liver ER fraction (Fig. 2c). Taken together, these results clearly indicate that ER recruitment occurs at a very early stage of phagosome formation, as well as at various intervals during phagolysosome biogenesis.

Newly synthesized proteins and calnexin substrates are rapidly delivered to phagosomes

To determine if newly synthesized proteins were quickly delivered to phagosomes, cells were allowed to internalize latex beads for 30 min, in the presence of ^{35}S methionine for the last 5 min. In these conditions, isolated phagosomes displayed a distinct set of radiolabeled proteins compared to the total cell lysate (see supplemental data). To determine if some of the newly synthesized proteins transferred to phagosomes were calnexin substrates, immunoprecipitation with an anti C-terminal calnexin antibody was

performed on phagosomes isolated from these cells. The co-immunoprecipitated newly synthesized calnexin substrates were identical in both phagosomes and the total cell lysate, indicating their common ER origin. The specificity of these results was demonstrated by showing that no major protein was observed when the immunoprecipitation was performed with pre-immune serum in control HepG2 cells (human hepatocytes) and J774 macrophages. Moreover, immunoprecipitation with the calnexin antibody from cells pre-treated with tunicamycin revealed diminished labeling, consistent with the glycoprotein specificity of calnexin-associated substrates (Ou et al., 1993). Finally, ^{32}P orthophosphate in vivo labeling of J774 macrophages revealed the presence of phosphocalnexin in phagosomes. These results indicate that newly synthesized incompletely folded glycoproteins associated with functional calnexin are recruited rapidly to phagosomes.

ER recruitment during phagosome formation and phagolysosome biogenesis in situ involves phosphatidylinositol 3-kinase and the proton pump ATPase

Both phagocytosis and autophagy are known to be altered by PI3 kinase inhibitors such as Ly294002, wortmannin, and 3-methyladenine (Blommaert et al., 1997; Cox et al., 1999). To determine if PI3K is involved in ER-mediated phagocytosis, cells were treated with various inhibitors and their effects on the formation and composition of phagosomes examined. Pretreatment with 3-MA or wortmannin (Fig 3 a-e), or Ly294002 (not shown) resulted in a sharp decrease of phagocytosis (more than 65% inhibition for each drug), (3-MA is shown in Fig. 3b) and accumulation of beads at the cell surface within pseudopodia (phagocytic cups). Observation of these structures at the EM level revealed an unexpected feature occurring during the early phase of phagocytosis. Direct contacts and apparent continuities were observed between ER and the PM, at sites of bead internalization (Fig. 3c and d), suggesting that ER was recruited directly at the cell surface to form phagosomes. A similar phenomenon was observed for wortmannin (Fig. 3e). The global composition of the few phagosomes formed in 3-MA treated cells was compared with those formed in

untreated cells using 2-D gel electrophoresis. This revealed no major difference and, very importantly, the presence of known spots corresponding to ER proteins in phagosomes isolated in both conditions. This indicated that treatment with 3-MA did not trigger an internalization process different to that occurring in untreated cells (Fig. 3f).

Phagocytosis is also markedly reduced by bafilomycin A1 (Bidani and Heming, 1995), an inhibitor of the vacuolar proton pump ATPase. Treatment of J774 macrophages resulted in a marked decrease of latex bead phagocytosis (around 95% inhibition). Although some latex beads were present in phagocytic cups, we were unable to observe any ER membrane connecting these structures. However, when beads were internalized first, followed by bafilomycin treatment, observation at the EM level revealed that numerous connections between phagosomes and ribosome-free ER-like structures occurred in these conditions. To confirm the ER nature of these structures, we took advantage of a cytochemical technique revealing the activity of the ER enzyme glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) at the EM level on Epon sections, ensuring high preservation of the morphological features of the cells (Griffiths et al., 1983). As expected, ER throughout the cell and the juxtaposed nuclear envelope displayed a strong G-6-Pase activity, while no labeling was observed on other cellular organelles and the PM, validating the high specificity of this cytochemical approach to identify ER (see Figs. 5-7). Thus, by using this well established approach, we were able to observe the dense precipitate generated by the G-6-Pase activity in the reticular structures connected to phagosomes after bafilomycin treatment, confirming their ER origin (Fig. 4a). To test if some of the ER and phagosomes were directly connected after bafilomycin treatment, the following experiment was performed. Cells preloaded with latex beads were allowed to internalize BSA-gold by endocytosis for 15 min, a period of time allowing endosome-phagosome fusion and the transfer of BSA-gold particles to phagosomes (Desjardins et al., 1997). When these cells were treated with bafilomycin, the reticular structures connected to phagosomes (similar to those displaying G-6-P activity in panel a) contained BSA-gold, demonstrating the continuity between the

two organelles (Fig. 4b). These results indicate that fusion/fission between phagosomes and ER structures is regulated, at least in part, by the activity of the proton pump ATPase.

ER-mediated phagocytosis is a widely used process of internalization in macrophages

Phagocytosis begins by the formation of a membrane structure, referred to as phagocytic cup, believed to originate from the plasma membrane, which invaginates and seals to form the phagosome. Based on the results obtained so far, we argue that ER is directly recruited to phagocytic cups to provide some of the membrane required for phagosome formation. In order to visualize this process, we formed phagocytic cups by centrifuging latex beads to the surface of cells at 4°C, followed by a 10 min incubation at 37°C. Both confocal microscopy (Fig. 5a and b) and EM cytochemistry (Fig. 5c and d) revealed ER recruitment to phagocytic cups during latex bead internalization. Confocal analysis with anti-calnexin and anti-LAMP1 antibodies indicated that ER was highly enriched in pseudopodia surrounding latex beads (white arrows), while LAMP1 was not yet recruited. Samples from the same experiment were processed and visualized at the EM level. Observation confirmed that some of the membrane used for phagosome formation is of ER nature, as revealed by the presence of G-6-Pase labeling on membranes surrounding partially engulfed latex beads (Fig. 5c). After their formation, a large proportion of the phagosomes displayed a strong G-6-Pase labeling (Fig.5d and Table 1).

The standard protocols to form phagosomes for biochemical analysis involve the internalization of latex beads in near-saturating conditions (a 1:10 to 1:50 dilution of a 10% bead suspension in culture medium). These conditions result in the internalization of up to 100 beads per cell, a situation in which a large quantity of membrane is needed and where the use of the ER might not be representative of the “natural” process of phagocytosis. To demonstrate that ER-mediated phagocytosis is not simply used in extreme cases, latex beads were internalized for 60 min at a high dilution of 1:200 instead of 1:10. This resulted

in the internalization of less than 5 beads per cell (results not shown), a less demanding situation that could possibly be accommodated by using only the plasma membrane. Nevertheless, phagosomes formed under these conditions still displayed the same overall protein profiles in 2-D gels, including high levels of ER proteins (results not shown), indicating that ER is used for phagocytosis even when small amounts of membrane are required.

Next, we performed experiments to evaluate if ER-mediated phagocytosis is a general way of entry in macrophages. First, we used 2-D gel analysis to compare the overall composition of phagosomes formed by normal beads (which get opsonized in the culture medium containing heat-inactivated fetal calf serum) or by the internalization of beads through the Fc and complement receptors, after opsonization with albumin and anti-albumin or mouse serum respectively (Duclos et al., 2000). Phagosomes containing the three types of beads displayed similar 2-D patterns, including all the known ER proteins (not shown). Second, morphological analysis showed that large proportions of the three types of latex beads were present in strongly labeled G-6-Pase-positive phagosomes (Table 1). To further demonstrate that entry through the Fc receptor leads to ER-derived phagosomes, similar analyses were performed with IgG-opsonized red blood cells. In this case, a majority of the erythrocytes were in phagosomes displaying G-6-Pase activity (see Fig. 6e, and Table 1).

It remained uncertain if ER-mediated phagocytosis is also used for the internalization of pathogens. To address this issue, we examined the process used to internalize *Leishmania donovani*, a large intracellular pathogen not known to interact with ER elements. When cells infected with wild-type *Leishmania* were analyzed for G-6-Pase activity, a strong labeling was observed in the lumen of parasite-containing phagosomes (Fig. 6a-c, and Table 1), indicating that ER is also involved in the internalization of pathogens. In several occasions, ER recruitment was observed at sites of *Leishmania*

internalization, as shown by direct contacts between ER cisternae and newly formed *Leishmania*-containing phagosomes near the cell surface (Fig. 6b, black arrows). Furthermore, because phagocytosis of *L. donovani* begins by the entry of the parasite body followed by its long flagellum, we observed, in several cases, G-6-Pase positive membranes already present at the base of incompletely engulfed parasites while their flagella was still outside the cells (Figs. 6a and 7a shows two examples), as observed for latex beads (see Fig. 5c). In all cases, the flagellum was observed between short pseudopodia, which did not appear to extend around the long parasite. A mutant parasite displaying a truncated form of lipophosphoglycan at its surface was also observed in G-6-Pase positive compartments. To further determine whether ER-mediated phagocytosis is a general process, we infected the macrophage cell lines J774 as well as the epithelial cell line IEC-18 with *Salmonella typhimurium*, and measured the number of phagosomes displaying G-6-Pase activity. Both macrophages (Fig. 6d) and epithelial cells (not shown) displayed bacteria in G-6-Pase positive compartments. Again, large proportions of the phagosomes containing *Salmonella* were positive for G-6-Pase (Table 1). Altogether, these results indicate that, in macrophages, ER recruitment is a widely used process occurring at the cell surface, before closure of the phagocytic cup.

Phagocytosis was also studied in neutrophils. In contrast to macrophages (Fig. 7a), latex bead particles and *Leishmania* parasites were present in phagosomes not displaying G-6-Pase activity, despite the strong labeling observed in the ER and nuclear envelope (Fig. 7b). Also contrasting with macrophages Fig. 8a), the pseudopodia surrounding the *Leishmania* parasites are clearly made of large extensions of membrane (Fig. 7c), indicating that ER-mediated phagocytosis may not be the preferred path of entry for microorganisms into neutrophils.

Discussion

Phagocytosis can require large amounts of membranes and sources other than the highly specialized PM may contribute to phagosome formation. Using metabolic and surface radioactive labeling, Vicker (1977) showed that only a portion of the phagosome originated from the PM, while an important part appeared to be made of newly synthesized membranes of undefined origin. Grinstein and colleagues have shown that exocytosis at or near the site of phagocytosis of endomembranes, possibly originating from recycling endosomes, is required for complete particle internalization (Hackam et al., 1998). Studies have also revealed that lysosomes can be rapidly recruited to the PM at sites of internalization during *T. cruzi* infection (Tardieux et al., 1992). However, lysosomes are unlikely to be part of a general process of membrane recruitment since most of the phagosomes containing microorganisms or inert particles in macrophages are initially devoid of lysosomal markers (Méresse et al., 1999; see also 15/0 in Fig. 2a).

Our results clearly identify ER as an important contributor to the phagosome membrane. The presence of calnexin in its native orientation in the phagosome membrane was shown directly by preembedding immunogold labeling, and confirmed by pronase digestion. Immunoblotting further indicated that the rapid recruitment of calnexin to phagosomes was followed by the gradual intraphagosomal degradation of its luminal domain during phagolysosome biogenesis. In addition, pulse-chase experiments demonstrated that calnexin glycosubstrates are recruited rapidly to phagosomes, within 5 min of phagocytosis. At that point, the logical interpretation of our results was that ER was recruited rapidly after phagosome formation as a source of replacement for the plasma membrane. However, further analyses revealed the unexpected finding that ER is recruited directly to the PM during phagosome formation. Kinetic studies revealed that ER molecules are already present in high amounts on isolated phagocytic cups (15/0 in Fig. 2a-c). Under normal conditions, latex beads and several *Leishmania* parasites were

surrounded by membranes displaying G-6-Pase activity (i.e. ER), while distal portions of the beads or pathogens and their flagella were still outside the cell. Close apposition of ER elements with the PM underneath phagocytic cups were also observed in cells treated with the PI3K inhibitors wortmannin and 3-MA. In our study, 3-MA was shown to slow down the initial steps of latex bead phagocytosis, resulting in a decrease of the phagocytic rate with the accumulation of beads within pseudopodia at the cell surface. In normal cells, apparent continuities were difficult to observe, possibly due to their rapid and transient nature. Indeed, fusion between ER and plasma membrane likely occurs as rapidly as that between secretion vesicles and PM during stimulated exocytosis, a process rarely visualized at the EM level. However, using 2-D gel electrophoresis, we confirmed that early phagosomes formed in both control and 3-MA-treated cells were highly similar, and thus unlikely to be induced by different mechanisms.

PI3K is relevant to ER-mediated phagocytosis. PI3K is involved in the association to nascent phagosomes of amphiphysin II, a protein linked to the recruitment of dynamin and required for phagosome formation (Gold et al., 2000). PI3K also participates in the deactivation of PAK1, a step possibly needed for phagosome closure (Diakonova et al., 2002). These data support the proposal that PI 3K is required for coordinating exocytic membrane insertion and pseudopodia extension (Cox et al., 1999). Botelho et al. (2000) showed that particles associated with phagocytic cups at the PM displayed peripheral phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (4,5-PIP₂) that rapidly disappeared after phagocytosis, while early phagosomes displayed a strong peripheral signal for diacylglycerol (DAG). They suggested that focal PM changes in lipid metabolism involving phospholipase C, and possibly PI3K, were responsible for the rapid transformation of 4,5-PIP₂ into DAG. These results could also be interpreted to suggest the rapid transfer of particles from the 4,5-PIP₂-enriched PM to DAG-enriched ER. Indeed, following hydrolysis of phosphoinositides (PI) into DAG and phosphatidate (PA) at the PM, two enzymes (CDP-DG synthase and PI synthase) located on the ER function

sequentially to convert PA back into PI. Whatmore and collaborators (1999) concluded that PI resynthesis by ER enzymes at the PM is dependent neither on vesicular transport mechanisms nor on freely soluble transport proteins. They suggested, rather, that it occurred through a membrane-protein-mediated process at sites of close contacts between the two organelles. Our results clearly suggest that such close contacts exist during phagocytosis.

ER interactions with phagocytic organelles also appear to be regulated, in part, by the vacuolar proton pump ATPase. Bafilomycin A1, a pump inhibitor, stabilizes membrane connections between phagosomes and ER, allowing the free diffusion of the luminal content of these organelles and the transfer of BSA-gold from the phagosome lumen to the lumen of ER. The recent identification of the V-ATPase as a fusion protein on yeast vacuoles (Peters et al., 2001), suggests that this protein could also regulate some of the fusion/fission properties of phagosomes. Focal contacts between phagocytic organelles and the ER as a prelude to fusion events between these two compartments could take place at sites of lipid microdomains, a structure where fusion proteins have been previously identified (Lafont et al., 1999), including the V-ATPase (Dermine et al., 2001).

ER-mediated phagocytosis provides a framework to comprehend several poorly understood processes involving ER. Direct fusion of ER with the PM may explain why ER proteins such as calnexin and calreticulin have been observed at the cell surface (Okazaki et al., 2000; Johnson et al., 2001). The role of ER proteins at the surface is, however, poorly understood. Exogenously added Bip/GRP78 was shown to stimulate phagocytosis (Kakimura et al., 2001). In addition, recent studies have shown that calreticulin, together with CD91, the alpha-2-macroglobulin receptor, are required for phagocytosis of apoptotic cells (Ogden et al., 2001). Our data extend these observations and suggest that the entry of *Leishmania* in macrophages could also involve calreticulin and calnexin. Indeed, the major glycoprotein at the parasite surface, GP63, contains a terminal $\text{Glc}_1\text{Man}_6\text{GlcNac}_2$

(Olafson et al., 1990), a saccharidic structure recognized by both calreticulin and calnexin (Zapun et al., 1999). A role for these proteins in phagocytosis is also supported by the finding that, in *Dictyostelium*, double-null mutants for calreticulin and calnexin inhibit phagocytosis (Müller-Taubenberger et al., 2001). Thus, we postulate that ER fusion with the plasma membrane underneath phagocytic cups may allow the delivery of calreticulin and calnexin at sites of internalization and enable their use as part of a phagocytic receptor.

In the ER, calnexin is a major component of the glycoprotein quality control machinery (Zapun et al., 1999). The delivery of substrates of calnexin to phagosomes (and lysosomes?) could potentially be exploited as an alternative route to degradation for improperly folded proteins along the quality control path. The participation of ER in phagosome formation and the presence of newly synthesized peptides in phagosomes also provide a potential explanation for the still poorly understood process by which antigens from intracellular pathogens can be presented by MHC class I molecules, a process which usually takes place in the ER (Kleijmeer et al., 2001).

Intracellular pathogens such as bacteria of the genus *Brucella* (Anderson and Cheville, 1986; Pizarro-Cerda et al., 1998) and *Legionella pneumophila* reside within compartments displaying ER features (Horwitz, 1983; Swanson and Isberg; Tilney et al., 2001). Although both of these pathogens are believed to transit through plasma membrane-derived vesicles (based on morphological observations) before entering ER, it is possible that ribosome-free ER participates in their internalization at the cell surface. Indeed, previous morphological observations failed to reveal the ER nature of latex bead-containing phagosomes (Desjardins et al., 1994a). We show here that *Salmonella typhimurium*, and *Leishmania donovani* (wild type and lpg- mutants) are present initially within ER-derived compartments (as revealed by G-6-Pase cytochemistry). These pathogens alter the properties of their phagosomes to different extents (Méresse et al., 1999). Despite their common entry into the ER, wild type *L. donovani* parasites are maintained in early

phagosomes for several hours after their internalization, while *lpg*-deficient mutants are rapidly transferred to phagolysosomes (Scianimanico et al., 1999).

Accordingly, we propose that ER-mediated phagocytosis is a general mechanism of entry (Fig. 7d). Binding of a particle to the cell surface initiates the formation and elongation of pseudopodia firmly attaching it to the PM. During this process, the ER is recruited close to the surface where it fuses with the PM and opens at the site of particle contact. The particle then slides into the opened ER and the PM is resealed at the end of the entry process. This leads to the formation of phagosomes made largely of ER, a process that minimizes the use of the highly specialized PM. Newly formed phagosomes then rapidly interact with endocytic organelles in a highly regulated process allowing phagolysosome biogenesis (Desjardins, 1995). To ensure their survival within host cells, pathogens have evolved ways to inhibit the maturation of ER-derived phagosomes at different stages during phagolysosome biogenesis and thus avoid the lytic environment of phagolysosomes. Pathogens such as *Legionella* and *Brucella* would exert their effect on phagolysosome biogenesis very early in the process, when they are still in ER-derived compartments, while others like *Salmonella*, *Mycobacteria* and *Leishmania* would allow the initiation of phagosome maturation and block the completion of this process later on.

In neutrophils, the entry of both latex beads and *Leishmania* parasites does not require the recruitment of ER, as shown by the lack of G-6-Pase activity in phagosomes housing these particles (Fig. 7b). It is known that, in neutrophils, biogenesis of phagolysosomes is a very rapid event initiated with nascent unclosed phagosomes. This process is accompanied by the release of lysosomal enzymes such as beta-glucuronidase in the extracellular medium (Cougoule et al., 2002), suggesting that azurophil granules are recruited and provide membrane to nascent phagosomes. In contrast to serum-opsonized *Mycobacterium smegmatis*, entry of non-opsonized mycobacteria takes place without enzyme release at the cell surface (Cougoule et al., 2002). Along this path, a recent study

indicated that neutrophils possess mechanisms for both opsonin/complement-dependent and -independent uptake of *Leishmania* (Laufs et al., 2002). The opsonin/complement-dependent mechanism of entry leads to rapid internalization and killing of parasites, while the latter mechanism requires hours and leads to the internalization of parasites in phagosomes where they survive for long periods of time. Because neutrophils display a rudimentary ER, we propose that the slow opsonin/complement-independent uptake of *Leishmania* observed by Laufs and colleagues (2002) may take place by a long process of ER recruitment requiring neosynthesis of this organelle. Interestingly, Katz and Hashemi (1982) have shown that while *Legionella* survive and replicate in ER-like compartments in macrophages, they are rapidly killed and degraded in compartments not displaying ER features in neutrophils. Accordingly, ER-mediated phagocytosis appears to be a doorway to safe haven that intracellular pathogens have evolved to exploit as a Trojan horse for survival in their host cells.

Experimental procedures

Cell culture and phagosome isolation

Neutrophils were isolated from dog blood using standard protocols (Mehri *et al.*, 1999). Phagosomes formed by the uptake of 0.8 μm or 3 μm latex beads (Sigma) diluted 1:10, 1:50, or 1:200 for various periods of time at 37⁰C, were isolated from J774 mouse macrophages (Desjardins *et al.*, 1994a). Phagosome were also formed by internalizing sheep red blood cells for 30 min (Vieira *et al.*, 2001), or infecting cells for 30 min with the intracellular parasite *Leishmania donovani* and 5 min with *Salmonella enterica serovar typhimurium* (Scianimanico *et al.*, 1999; Steele-Mortimer *et al.*, 1999). Immunoprecipitation of calnexin and its associated proteins in macrophages or isolated phagosomes was performed using an anti-calnexin directed against the cytoplasmic tail of the protein or a pre-immune serum (Ou *et al.*, 1993).

2-D gel electrophoresis, and SDS-PAGE for Western blot analysis

The kinetic analysis of phagosome formation and phagolysosome biogenesis was evaluated using 2-D gel electrophoresis or immunoblotting on 1-D gels (Garin *et al.*, 2001). The relative enrichment of some ER proteins on phagosomes compared to the total cell lysate, the post-nuclear supernatant (the supernatant obtained after a 900 X g centrifugation), or a total membrane preparation (100 000 X g pellet) was also evaluated by Western blot. This was done by loading on SDS-PAGE an equal amount of protein from each sample (15 μg), measured using the BioRad DC protein assay. The antibodies used were: polyclonal anti-calnexin, directed against the last 18 amino acid of the cytoplasmic tail of the protein (Ou *et al.*, 1993); polyclonal antibodies against Sec 61p (Ou *et al.*, 1993); polyclonal antibodies against calreticulin (Rokeach *et al.*, 1991); a rat monoclonal anti-

Lamp1 (Desjardins et al., 1994b); and a polyclonal anti-ER raised against purified rat liver microsomes (Païement and Roy, 1988).

Cell treatment with PI3-K inhibitors and Bafilomycin A1

To test the possible involvement of PI3K in ER-mediated phagocytosis, cells were preincubated for 60 min with 10 mM of 3-methyladenine (3-MA) (Sigma) as described (Seglen and Gordon, 1982), 200 μ M Ly294002, and 100 nM wortmannin. Latex beads were then internalized for 60 min, followed by incubation in culture medium for 30 min in continuous presence of the drug. The possible involvement of the vacuolar proton pump ATPase in phagosome-ER interaction was tested as follows. Latex beads were internalized for 30 min followed by a 30 min chase to form phagosomes. Cells were then allowed to internalize BSA-gold 16 nm added to the culture medium for 15 min, followed by a 30 min incubation leading to the transfer of BSA-gold from early endosomes to phagosomes (Desjardins et al., 1997). Cells were finally incubated for 60 min in medium containing or not bafilomycin A1 (0.5 μ M) (Kamiya), and prepared for EM.

Immunofluorescence and EM

Immunofluorescence and confocal microscopy was performed as described previously (Scianimanico et al., 1999; Dermine et al., 2001). For immunofluorescence, 30% phagosomes were isolated and the presence of calnexin revealed using the anti-cytoplasmic tail antibody. For confocal microscopy, 3 μ m latex beads added to cold medium were centrifuged onto cells at 57 X g for 3 min. Cells were then incubated at 4^oC for 30 min, followed by an incubation at 37^oC for 10 min to allow for the formation of phagocytic cups. Anti-calnexin (cytoplasmic or luminal domain) and anti-LAMP1

(cytoplasmic domain; Méresse et al., 1997) were used to assess the presence of these proteins. Preembedding immunolocalization of calnexin and LAMP1 was done on isolated phagosomes (Lavoie et al., 2000). In some experiments, rough microsomes (60µg protein), isolated as described previously (Paiement and Bergeron, 1983), were added to the phagosome preparation as a positive control to test the specificity of the calnexin antibody. Glucose-6-phosphatase (G-6-P) activity was revealed using EM cytochemistry (Griffiths et al., 1983).

Acknowledgements

The authors thank Dr. Hojatollah Vali, J. Mui and François St-Louis for their help with the EM. Drs. Jean-Gilles Latour and Claudette Léger-Gauthier for the preparation of neutrophils. Dr. Stéphane Méresse for the kind gift of antibodies against the cytoplasmic domain of LAMP1, Dr. Luis Rokeach for the antibodies against calreticulin, and Dr. Chris Nicchitta for the anti Sec61p antibodies. The authors thank Drs. Clarissa Desjardins and Roger Lippé for their helpful comments. This work was supported by grants # MT-5605 to J.J.M.B and G-15526 and MOP-12951 to M.D, from the CIHR.

References

- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 593-623.
- Anderson, T.D., and Cheville, N.F. (1986). Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *Am. J. Pathol.* *124*, 226-37.
- Berón, W., Colombo, M.I., Mayorga, L.S., and Stahl, P.D. (1995). In vitro reconstitution of phagosome-endosome fusion: evidence for regulation by heterotrimeric GTPases. *Arch. Biochem. Biophys.* *317*, 337-342.
- Bidani, A., and Heming, T.A. (1995). Effects of bafilomycin A1 on functional capabilities of LPS-activated alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *57*, 275-281.
- Blommaart, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelarova, H., Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* *243*, 240-246.
- Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T., and Grinstein, S. (2000). Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J. Cell Biol.* *151*, 1353-1368.
- Cannon, G.J., and Swanson, J.A. (1992). The macrophage capacity for phagocytosis. *J. Cell Sci.* *101*, 907-913.

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

Cougoule, C., Constant, P., Etienne, G., Daffe, M., and Maridonneau-Parini, I. (2002). Lack of fusion of azurophil granules with phagosomes during phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis* by human neutrophils is not actively controlled by the bacterium. *Infect. Immun.* 70, 1591-1598.

Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G., and Greenberg, S. (1999). A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 274, 1240-1247.

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.

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

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

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

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

Diakonova, M., Bokoch, G., and Swanson, J.A. (2002). Dynamics of cytoskeletal proteins during Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol. Biol. Cell* *13*, 402-411.

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.

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

Gold, E.S., Morrisette, N.S., Underhill, D.M., Guo, J., Bassetti, M., and Aderem, A. (2000). Amphiphysin II α , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* *12*, 285-292.

Griffiths, G., Quinn, P., and Warren, G. (1983). Dissection of the Golgi complex. I. Monensin inhibits the transport of viral membrane proteins from medial to trans Golgi cisternae in baby hamster kidney cells infected with Semliki Forest virus. *J. Cell Biol.* *96*, 835-850.

Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Sjolín, C., Schreiber, A.D., Trimble, W.S., and Grinstein, S. (1998) v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 11691-11696.

Heine, J.W., and Schnaitman, C.A. (1971). A method for the isolation of plasma membrane of animal cells. *J. Cell Biol.* *48*, 703-707.

Horwitz, M.A. (1983). Formation of a novel phagosome by Legionnaires' disease bacterium *Legionella pneumophila* in human monocytes. *J. Exp. Med.* *158*, 1319-1331.

Jahraus, A., Tjelle, T.E., Berg, T., Habermann, A., Storrie, B., Ullrich, O., and Griffiths, G. (1998). In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. *J. Biol. Chem.* *273*, 30379-30390.

Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., and Eggleton, P. (2001). The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* *11*, 122-129.

Kakimura, J., Kitamura, Y., Taniguchi, T., Shimohama, S., and Gebicke-Haerter, P.J. (2001). Bip/GRP78-induced production of cytokines and uptake of amyloid-beta (1-42) peptide in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *281*, 6-10.

Katz, S.M., and Hashemi, S. (1982). Electron microscopic examination of the inflammatory response to *Legionella pneumophila* in guinea pigs. *Lab. Invest.* *46*, 24-32.

Kleijmeer, M.J., Escola, J.M., UytdeHaag, F.G., Jakobson, E., Griffith, J.M., Osterhaus, A.D., Stoorvogel, W., Melief, C.J., Rabouille, C., and Geuze, H.J. (2001). Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic.* *2*, 124-137.

Lafont, F., Verkade, P., Galli, T., Wimmer, C., Louvard, D., and Simons, K. (1999). Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *9*, 3734-3738.

Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., Solbach, W., and Laskay, T. (2002). Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. *Infect. Immun.* *70*, 826-835.

Lavoie, C., Chevet, E., Roy, L., Tonks, N.K., Fazel, A., Posner, B.I., Paiement, J., and Bergeron, J.J. (2000). Tyrosine phosphorylation of p97 regulates transitional endoplasmic reticulum assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 13637-13642.

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

May, R.C., Machesky, L.M. (2001). Plagiarism and pathogenesis: common themes in actin remodeling. *Dev. Cell.* *3*, 317-318.

Méresse, S., André, P., Mishal, Z., Barad, M., Brun, N., Desjardins, M., and Gorvel, J.P. (1997). Flow cytometric sorting and biochemical characterization of the late endosomal rab7-containing compartment. *Electrophoresis* *18*, 2682-2688.

Méresse, S., Steele-Mortimer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B.B., and Gorvel, J.P. (1999). Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: A matter of life or death. *Nature Cell Biol.* *1*, E183-E188.

Merhi, Y., Provost, P., Chauvet, P., Theoret, J.F., Phillips, M.L., and Latour J.G. (1999). Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2, 372-377.

Müller-Taubenberger, A., Lupas, A.N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E., and Gerisch, G. (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* 20, 6772-6782.

Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 194, 781-795.

Okazaki, Y., Ohno, H., Takase, K., Ochiai, T., and Saito, T. (2000). Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 275, 35751-35758.

Olafson, R.W., Thomas, J.R., Ferguson, M.A., Dwek, R.A., Chaudhuri, M., Chang, K.P., and Rademacher, T.W. (1990). Structures of the N-linked oligosaccharides of Gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. *J. Biol. Chem.* 265, 12240-12247.

Ou, W.J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J. (1993). Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* 364, 771-776.

Paiement, J., and Bergeron, J.J. (1983). Localization of GTP-stimulated core glycosylation to fused microsomes. *J. Cell Biol.* 96, 1791-1796.

Paiement, J., and Roy, L. (1988). Electrophoretic protein blots as aids in choosing fixatives for immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 36, 441-446.

Peters, C., Bayer, M.J., Buhler, S., Andersen, J.S., Mann, M., and Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409, 581-588.

Pitt, A., Mayorga, L.S., Stahl, P.D., and Schwartz, A.L. (1992). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J. Clin. Invest.* 90, 1978-1983.

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

Rokeach, L.A., Haselby, J.A., and Hoch, S.O. (1991). High-level bacterial expression, purification and characterization of human calreticulin. *Prot. Eng.* 4, 981-987.

Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.F., Méresse, S., Descoteaux, A., and 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.

Seglen, P.O., and Gordon P.B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1889-1892.

Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J.P., Toh, B.H., and Finlay, B.B. (1999). Biogenesis of *Salmonella* typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves Interactions with the early endocytic pathway. *Cell. Microbiol.* *1*, 33-49.

Swanson, M.S., and Isberg, R.R. (1995). Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect. Immun.* *63*, 3609-3620.

Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E., and Andrews, N.W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* *71*, 1117-1130.

Tilney, L.G., Harb, O.S., Connelly, P.S., Robinson, C.G., and Roy, C.R. (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J. Cell Sci.* *114*, 4637-4650.

Vicker, M.G. (1977). On the origin of the phagocytic membrane. *Exp. Cell Res.* *109*, 127-138.

Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., Schreiber, A., Backer, J.M., Cantley, L.C., and Grinstein, S. (2001). Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.* *155*, 19-25.

Whatmore, J., Wiedemann, C., Somerharju, P., Swigart, P., and Cockcroft, S. (1999). Resynthesis of phosphatidylinositol in permeabilized neutrophils following phospholipase C beta activation: transport of the intermediate, phosphatidic acid, from the plasma

membrane to the endoplasmic reticulum for phosphatidylinositol resynthesis is not dependent on soluble lipid carriers or vesicular transport. *Biochem. J.* 341, 435-444.

Zapun, A., Jakob, C.A., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (1999). Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure Fold. Des.* 7, R173-182.

Figure 1. ER proteins are enriched in phagosomes

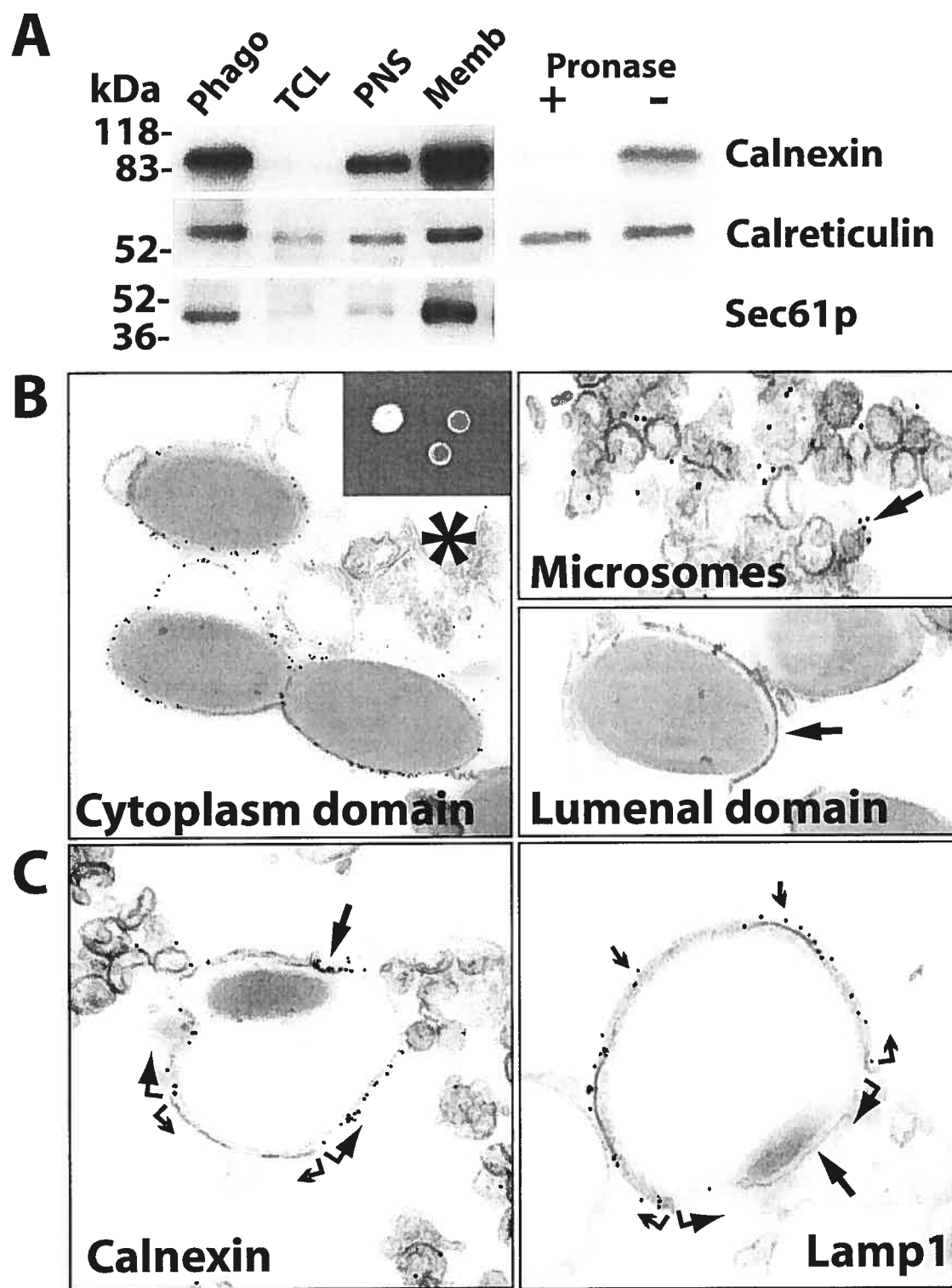


Figure 2. Calnexin is degraded during phagolysosome biogenesis

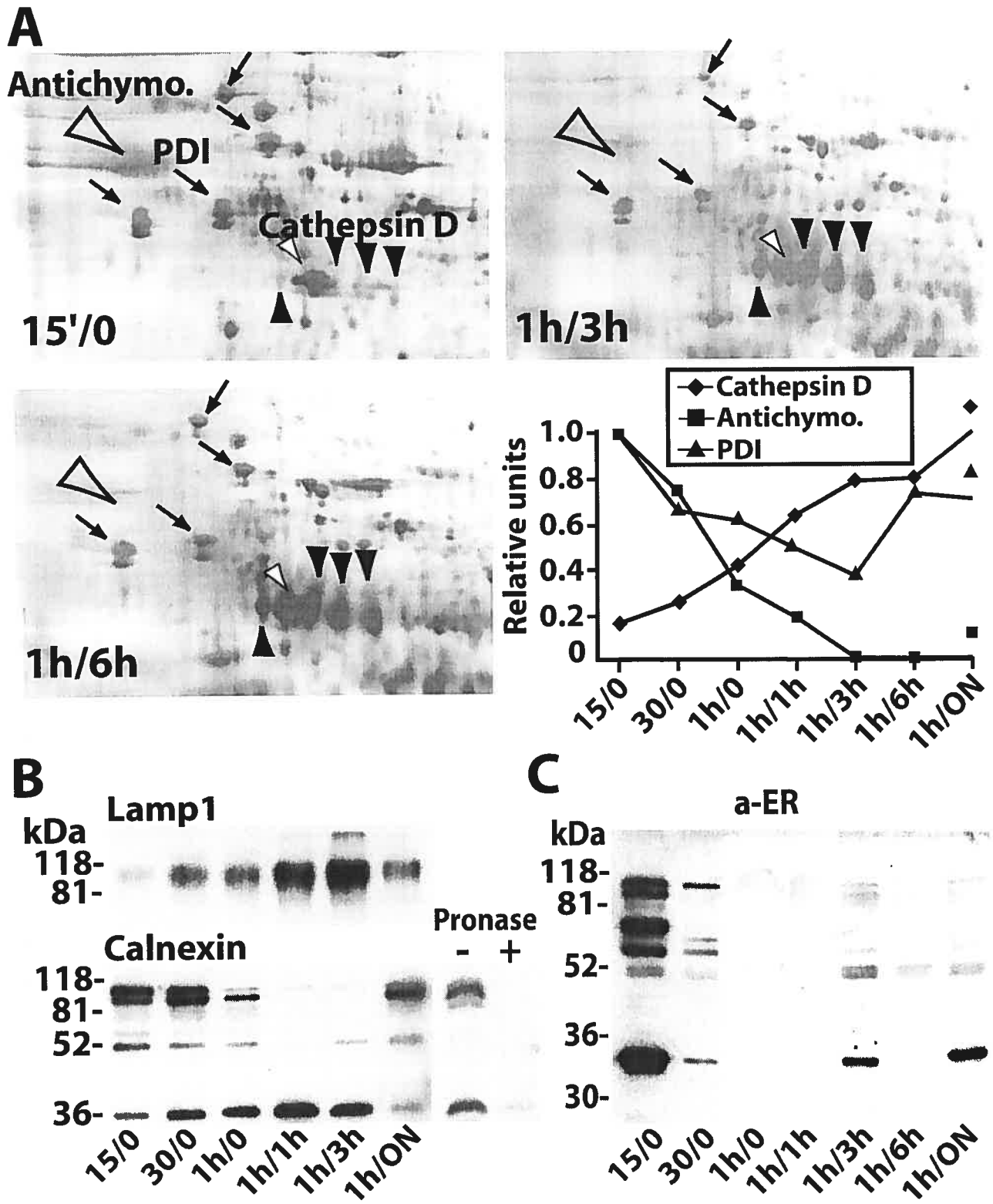


Figure 3. ER-mediated phagocytosis involves PI3K

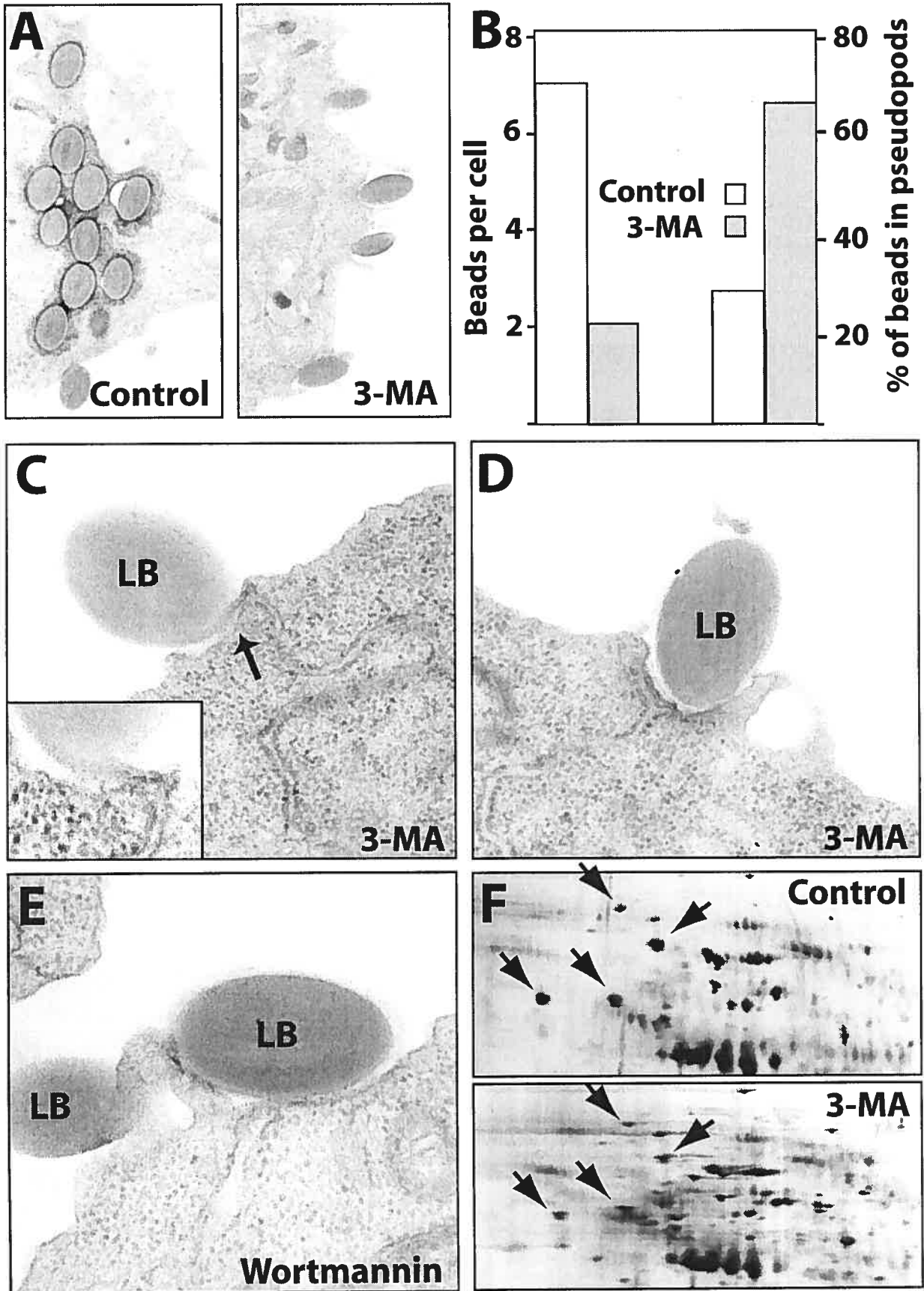


Figure 4. ER-phagosome interaction is regulated in part by the vacuolar proton pump ATPase.

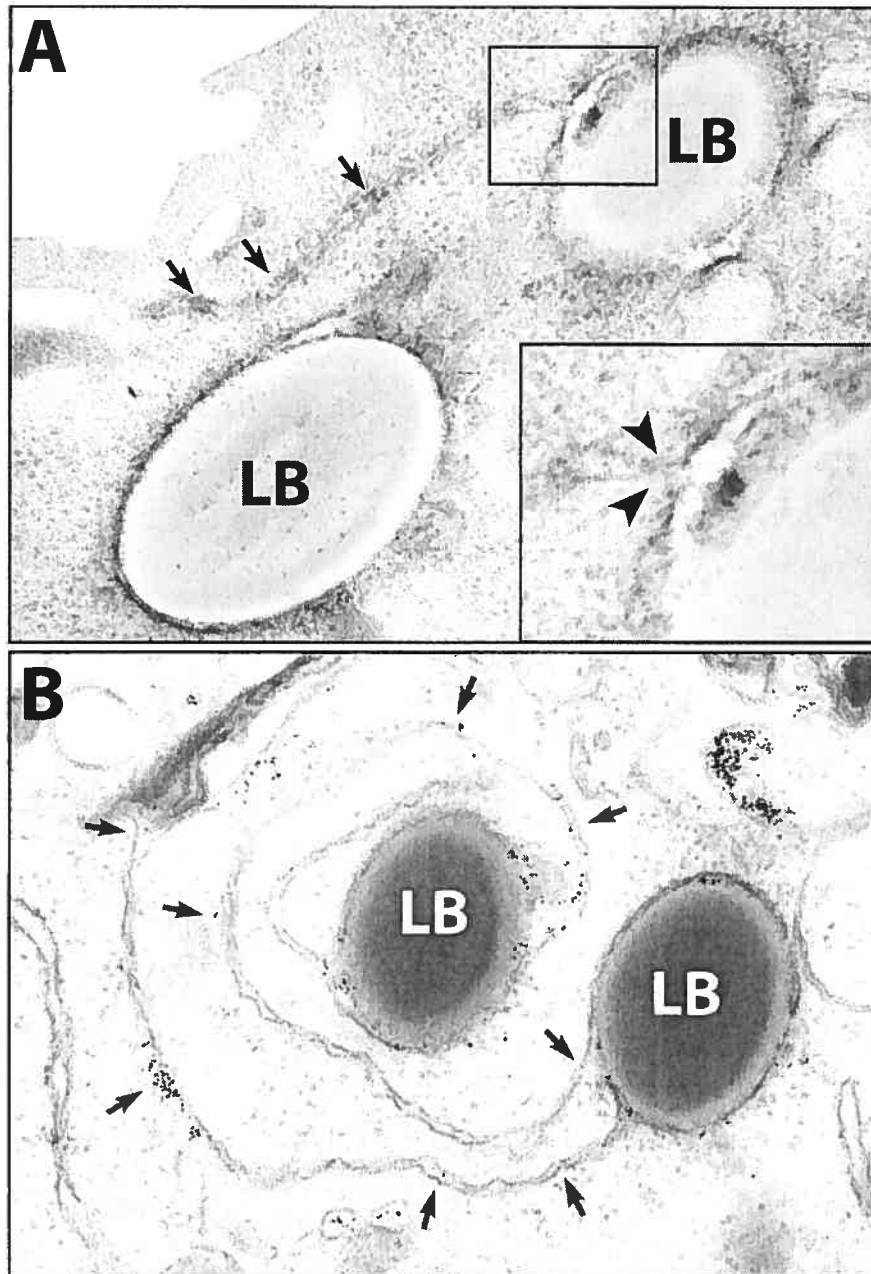


Figure 5. ER elements are present in pseudopodia during phagocytosis

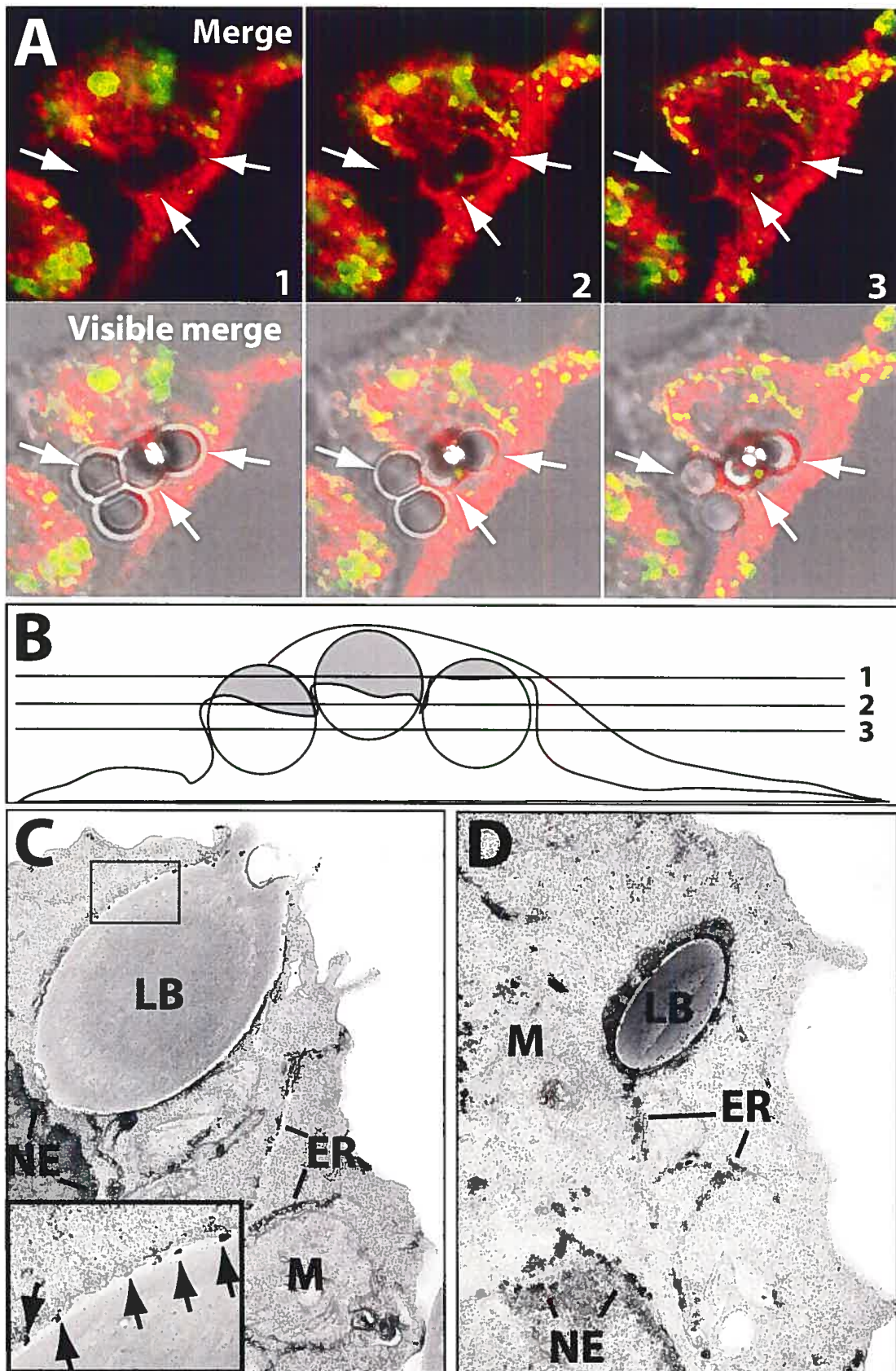


Figure 6. ER-mediated phagocytosis in a general mode of entry into macrophages.

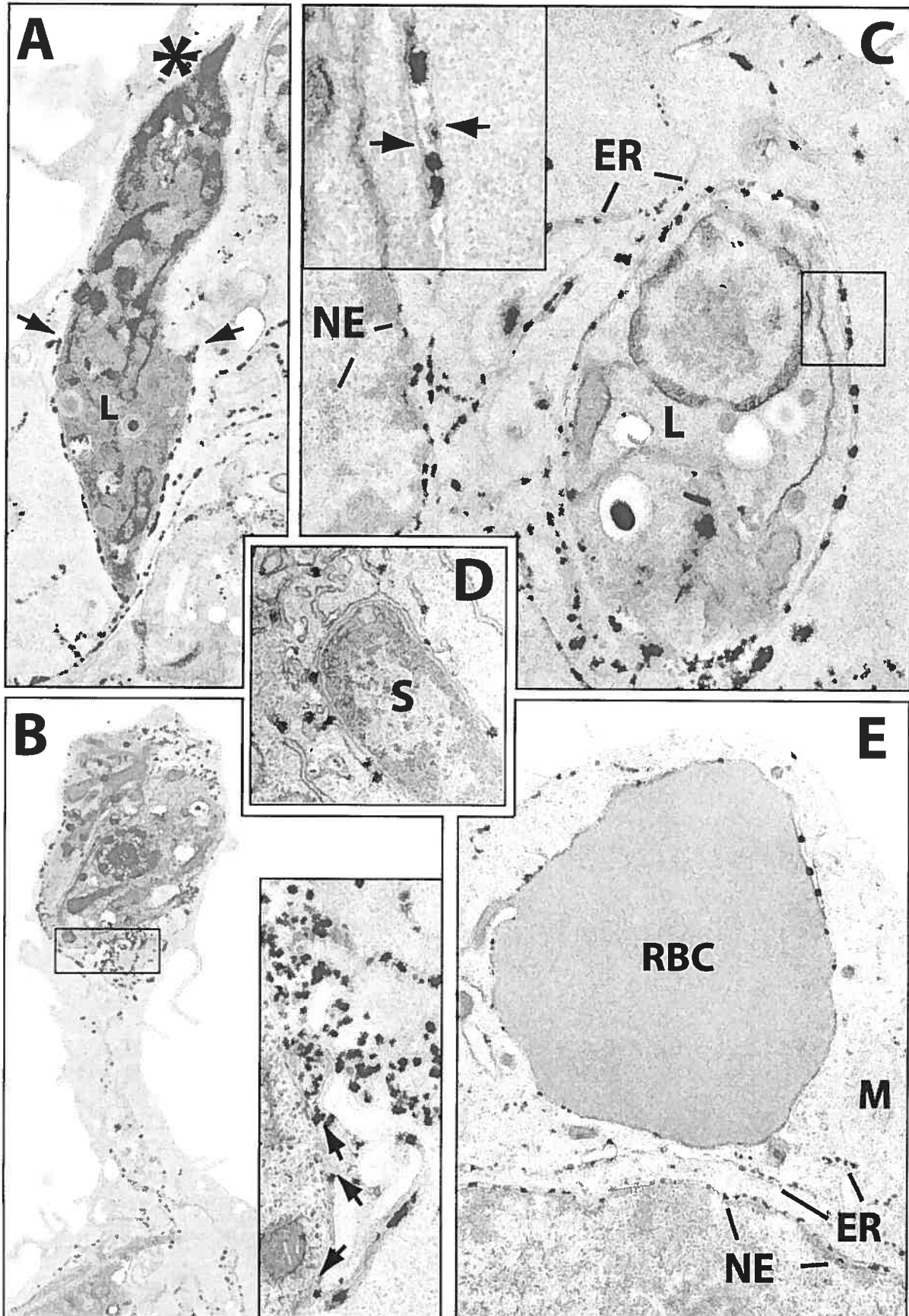


Figure 7. ER-mediated phagocytosis is not used for the internalisation of latex beads and Leishmania parasites in neutrophils.

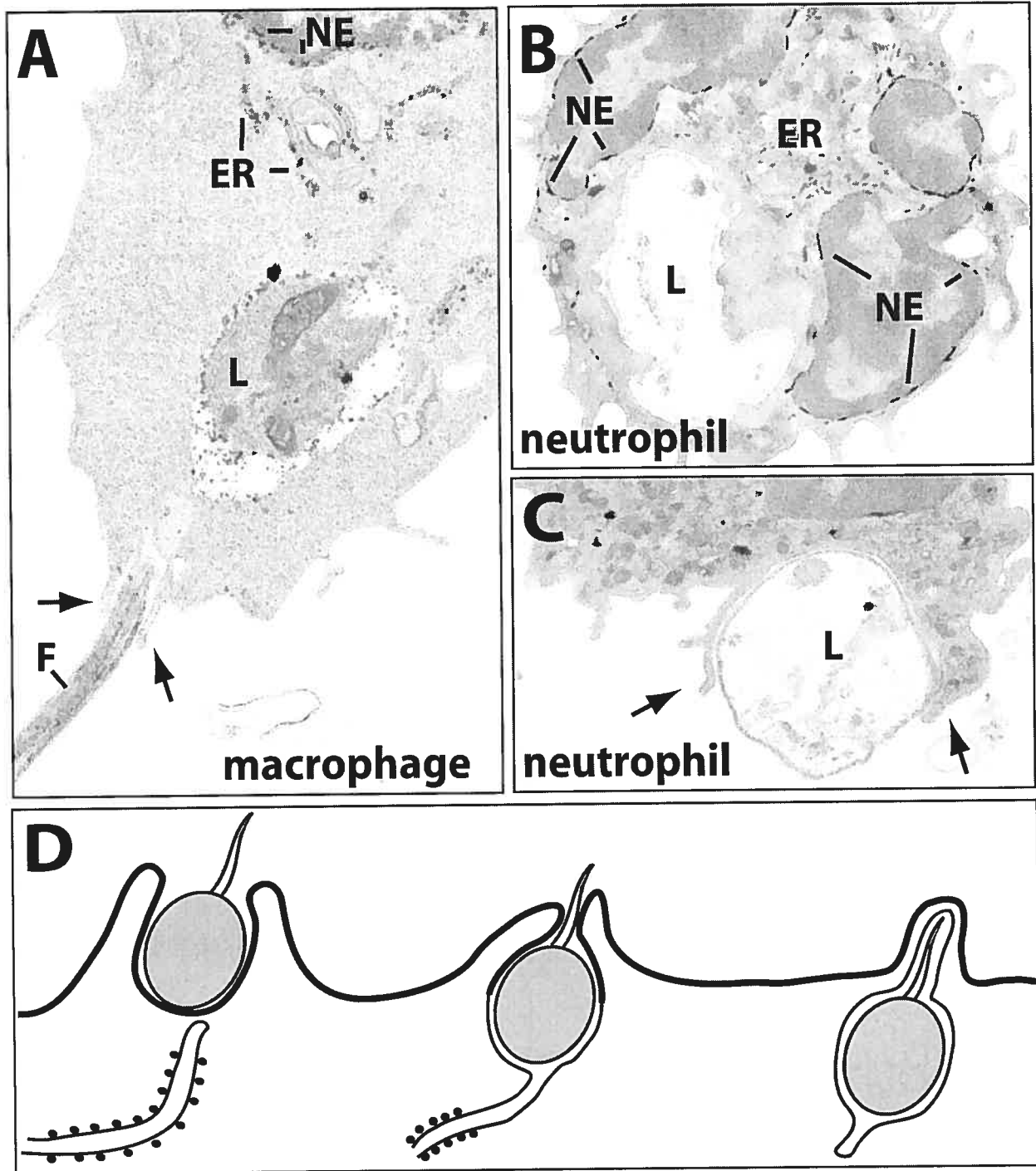


Figure supplémentaire. Substrates of calnexin are present in phagosomes.

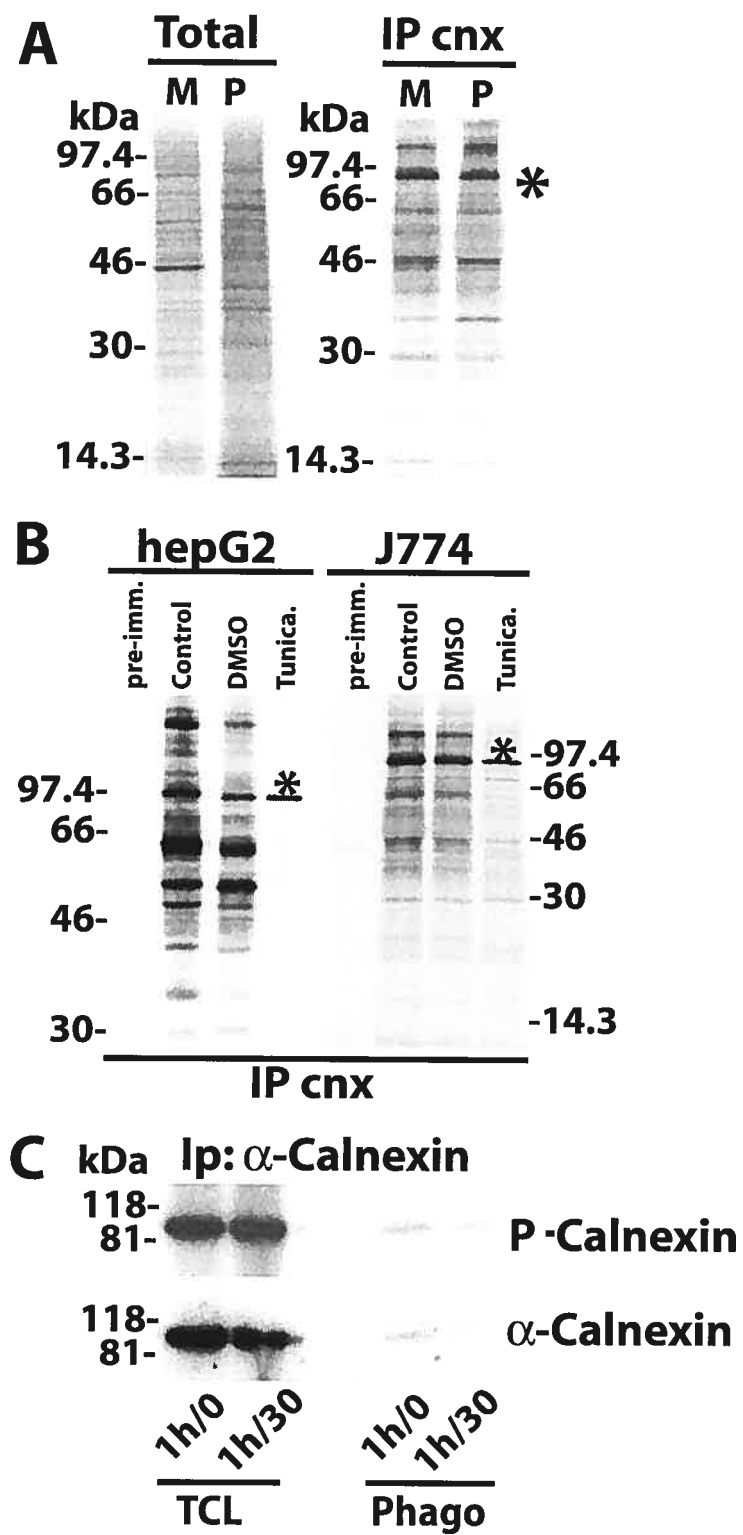


Figure Legends

Fig. 1. ER proteins are enriched in phagosomes. **A)** The protein profiles of 30 min phagosomes (Phago) were compared to a macrophage total cell lysate (TCL), a macrophage post-nuclear supernatant (PNS) or a total macrophage membrane preparation (Memb). Equal amounts of protein were loaded in each lane (15 μ g). Western-blot analysis shows that the ER proteins calnexin, calreticulin and sec61p are enriched in phagosomes, compared to the TCL and the PNS. Isolated phagosomes incubated or not in the presence of pronase for 30 min at 37⁰C were also analyzed. After a second isolation procedure to separate phagosomes from the digested materials, antibodies against the cytoplasmic domain of calnexin failed to reveal the presence of this protein on treated organelles, indicating that calnexin is present on phagosomes in its native form. In contrast, the luminal ER protein calreticulin was not affected by the treatment, indicating its presence in the lumen of phagosomes. **B)** Localization of calnexin was performed on isolated phagosomes by immunofluorescence or by a preembedding immunogold approach, using the antibody against the cytoplasmic domain. Insert (immunofluorescence) shows that calnexin is present around latex beads on the phagosome membrane. Observation at the EM level confirmed that calnexin is present around the phagosome membrane (88% of the gold particles were on the phagosome membrane) and not on other unidentified membrane components (asterisk). Calnexin is also present on rat liver microsomes (arrow) added to our preparations (positive control), but not revealed when antibodies against the luminal part of calnexin are used since this portion of the molecule is not reachable by antibodies in intact phagosomes (negative control). Arrow shows a negative phagosome. **C)** In some cases, two types of membranes, a thin (indicated with large arrows) and a thicker one (indicated with small arrows), are observed on phagosomes. Preembedding immunolabeling revealed that calnexin is preferentially detected in thin membranes (94%) whereas LAMP1 is clearly present on thicker membranes (92%). Note that microsomes were also added as a positive control in D (left panel).

Fig. 2. Calnexin is degraded during phagolysosome biogenesis. A) The biochemical nature of the phagocytic structures studied at each time point was revealed by comparing their 2-D gel patterns. The earliest time point (15'/0) was identified as a pre-phagosome structure (phagocytic cups) by the presence of high amounts of undegraded antichymotrypsin (large empty arrowhead), a serum protein bound to beads, and the absence of hydrolases like cathepsin D (small black arrowheads). In contrast, maturing phagosomes (1h/3h and 1h/6h) accumulated hydrolases (small black arrowheads) enabling the efficient degradation of antichymotrypsin (large empty arrowhead). Modulation in the amount of ER proteins also occurred during phagolysosome biogenesis, with higher amounts observed at the earliest time point (arrows, clockwise: GRP94, BiP, PDI and calreticulin). The small white arrowhead indicates actin. Densitometric analyses of spot intensity confirmed these observations (panel A, lower right). B) Phagosome maturation was confirmed by showing the accumulation of LAMP1 with time. When calnexin was revealed with an anti-cytoplasmic tail antibody (doublet around 90 kDa), a strong signal was observed on phagocytic cups (15 min) and early phagosomes (30 min). The signal decreased on 1h to 4h old phagosomes, indicating that calnexin was degraded during phagolysosome biogenesis. Several peptides of smaller molecular weight, all susceptible to pronase degradation, were also recognized by the antibody. Intact calnexin was observed on phagolysosomes (15h chase), while the signal for LAMP1 decreased, suggesting that a second wave of ER membrane was recruited to mature phagosomes. C) The occurrence of successive waves of ER recruitment was confirmed using a polyclonal antibody raised against purified rat liver microsomes.

Fig. 3. ER-mediated phagocytosis involves PI3K. Cells were treated or not with the PI3K inhibitors 3-methyladenine (1mM) or wortmannin (100nM) for 60 min prior to bead internalization. Cells were then fed latex beads (LB) for 60 min and chased for 30 min in the presence of the inhibitors and prepared for EM. A) Untreated cells internalized a large

number of beads, while only few beads were observed at the cell surface. In contrast, most of the beads remained within pseudopodia at the cell surface in 3-MA treated cells. **B)** Quantitative analyses confirmed that 3-MA strongly inhibits phagocytosis without affecting the formation of pseudopodia, suggesting that this drug slows down phagocytosis. **C, D)** Observation of 3-MA and **E)** wortmannin-treated cells at the EM level, revealed the occurrence of direct contact between ER and the plasma membrane underneath phagocytic cups. Insert shows a higher magnification of the region with an apparent continuity between the ER and the cell surface membrane (arrow). The latex bead (0.8 μm) indicates the relative magnification. **F)** To demonstrate that the 3-MA treatment was not triggering a form of phagocytosis different than the one used by normal cells, 2-D gel analysis of phagosomes were performed. The overall similar 2-D gel protein patterns obtained for both samples indicated that similar mechanisms of internalization are likely to be involved (arrows clockwise show the ER proteins GRP94, BiP, PDI and calreticulin).

Fig. 4. ER-phagosome interaction is regulated in part by the vacuolar proton pump ATPase. **A)** Latex beads were internalized for 30 min and then chased for 60 min in the presence of bafilomycin A1. After this treatment, glucose-6-phosphatase cytochemistry was used to reveal ER. In bafilomycin-treated cells contacts between ER (G-6-Pase positive) and phagosomes (LB) were readily observed. Insert shows a focal point of interaction and apparent membrane continuity between the two organelles. **B)** To determine if the lumen of these organelles is continuous, latex beads were internalized for 30 min and chased for 30 min to form phagosomes. BSA-gold was then added to the cell culture for 15 min, allowing its internalization by endocytosis, followed by a 30 min chase to allow its transfer to phagosomes. Cells were then incubated with bafilomycin for 60 min and processed for EM. BSA-gold particles were observed in the lumen of ER structures similar to those observed in **A)** clearly connected to phagosomes, indicating that direct fusion events occurred between the two organelles.

Figure 5. ER elements are present in pseudopodia during phagocytosis. **A)** Phagocytic cups were formed by centrifuging latex beads (3 μ m) at the surface of cells, followed by a 10 min incubation in culture medium at 37°C. Observation of serial optical slices at the confocal microscope (1 to 3 from bottom to top) shows that ER elements (calnexin in red) are present in growing pseudopodia (white arrows), while LAMP1 (green) is not yet recruited. The bottom panels show the superimposed visible merge with the latex beads. **B)** Diagram shows a reproduction of the three different scans seen in A with the spatial arrangements of the latex beads. **C)** EM image of a 3 μ m partially engulfed latex bead (LB) shows the presence of G-6-Pase activity associated to the membrane forming the phagocytic cup, indicating their ER nature (insert shows a higher magnification; arrows indicate the G-6-Pase product). The nuclear envelope (NE) and endoplasmic reticulum (ER) display strong G-6-Pase labeling, while mitochondria (M) are not labeled. **D)** Latex bead-containing phagosomes (0.8 μ m latex bead internalized through the complement receptor is shown here) display strong labeling for G-6-Pase activity.

Figure 6. ER-mediated phagocytosis is a general mode of entry into macrophages. Phagosomes were formed in J774 macrophages by the internalization of *L. donovani* (L) for 30 min, *Salmonella typhimurium* (S) for 5 min or IgG-opsonized red blood cells (RBC) for 30 min. Cells were then treated to reveal G-6-Pase activity and prepared for EM. **A)** In several cases, partially engulfed *Leishmania* parasites (L) were observed. In these cases, the foremost internalized part of the parasite was already present in ER-derived elements displaying strong G-6-Pase activity (arrows indicate the end of labeling), while the distal end of the parasite was still outside the cell (asterisk), in contact with membranes (PM?) devoid of G-6-Pase labeling. **B)** At sites of internalization, ER recruitment to *Leishmania*-containing phagosomes was observed. Insert shows high magnification of direct ER-phagosome connections (arrows) **C)** After internalization, *Leishmania* (L) were clearly present in compartments originating from the ER, displaying strong G-6-Pase activity. The nuclear envelope (NE) and ER were specifically and strongly labeled. Insert shows that the

phagosome membrane (right arrow) is tightly apposed to the surface of the parasite (left arrow) with the G-6-Pase product clearly present in the phagosome lumen. **D)** The intracellular pathogen *Salmonella typhimurium* (S) and **E)** red blood cells, internalized specifically through Fc receptors, were also present in phagosomes displaying G-6-Pase activity.

Figure 7. ER-mediated phagocytosis is not used for the internalization of latex beads and *Leishmania* parasites in neutrophils . **A)** A *Leishmania* parasite (L) is internalized by a macrophage. Although the body of the parasite is present in a G-6-Pase-containing vacuole, the flagellum (F) is still outside the cell, locked between short pseudopodia (arrows). G-6-Pase is specifically present in the nuclear envelope (NE) and the endoplasmic reticulum (ER). Over 70% of the phagosomes containing *Leishmania* parasites are positive for G-6-Pase activity in macrophages. **B)** In contrast, in neutrophils, phagosomes containing *Leishmania* parasites do not display G-6-Pase activity (less than 2% of the phagosomes are weakly labeled), despite the strong signal detected in the nuclear envelop (NE) and ER, which appears as small vesicles. **C)** Phagocytosis of *Leishmania* in neutrophils involved large pseudopodia (arrows) compared to the short ones observed in macrophages. **D)** Our current model for ER-mediated phagocytosis in macrophages proposes that the binding of a particle to the cell surface initiates the formation and elongation of pseudopodia firmly attaching the particle to the plasma membrane. During this process, the ER is recruited close to the surface where it fuses with the plasma membrane and opens at the site of particle contact. The particle then slides into the open ER and the plasma membrane is resealed. This leads to the formation of phagosomes made largely of ER.

<i>Particles</i>	Macrophages		Neutrophils	
	G-6-Pase compartment (%)	positive	G-6-Pase compartment (%)	positive
Nuclear envelope	100		100	
3 μ m LB	46 +/- 3		<2	
3 μ m LB-C3	57 +/- 2		ND	
3 μ m LB-IgG	54 +/- 2		ND	
RBC-IgG	49 +/- 1		ND	
<i>S. typhimurium</i>	43 +/- 2		ND	
<i>L. donovani</i> WT	72 +/- 4		<2	
<i>L. donovani</i> lpg-	75 +/- 3		<2	

Table 1. ER-mediated phagocytosis is a widely used mechanism of entry in macrophages.

Phagosomes containing various particles were analyzed for the presence of G-6-Pase activity at the EM level. Only cells displaying strong labeling of the nuclear envelope were analyzed. For all experiments, n=3 (at least 100 phagosomes were counted). LB, latex bead; RBC-IgG, IgG-opsonized sheep red blood cells.

Supplemental data

Substrates of calnexin are present in phagosomes. A) Latex beads were internalized for 30 min and 500 μ Ci of 35 S methionine were added to 5 ml of culture medium during the last 5 min of internalization. The total labeled proteins present in macrophage cell lysate (M) or in phagosomes (P) were analyzed (Total). The protein patterns differ significantly between the two samples, as expected from the enrichment obtained by isolating organelles. Immunoprecipitation with anti-calnexin antibodies (IP cnx) performed from the cell lysate

or phagosome preparation revealed that similar radiolabeled proteins are present in macrophages (M) and phagosomes (P), indicating that the substrates associated to calnexin in the macrophage ER are also present in phagosomes. Comparable amounts of radioactivity were applied to each lane. Asterisk shows the mobility of calnexin. **B)** Demonstration of the specificity of the calnexin antibody. With the pre-immune serum (pre-imm.), no major bands were detected after immunoprecipitation from a total cell lysate of HepG2 cells or J774 macrophages. In contrast, several substrates of calnexin were detected by immunoprecipitation with the anti-calnexin or the anti-calnexin after treatment of the cells with DMSO or not (Control). These associated proteins were shown to be glycoproteins since most of them were not co-precipitated from cell treated with the inhibitor of glycosylation tunicamycin (Tunica.) (tunicamycin is diluted in DMSO). Asterisk shows calnexin. **C)** Phosphocalnexin is present in phagosomes. Immunoprecipitation from a total cell lysate (TCL) or phagosomes (Phago) isolated at two different time points (pulse/chase, latex bead dilution 1:50) from cells labeled continuously with ^{32}P -orthophosphate (0.5 mCi per ml) indicated that phosphocalnexin is present in both samples (P-Calnexin, exposure = 60h). Western blot after immunoprecipitation is also shown (\square -Calnexin).

Chapitre II : Résultats article 2

Etienne Gagnon*, Isabel Catherine Morrow*, Sophie Duclos, John J.M. Bergeron and Michel Desjardins. (2006). Contribution of a sub-region of the endoplasmic reticulum in ER-mediated phagocytosis. *Article soumis à Cell.*

Contribution of a sub-region of the endoplasmic reticulum in ER-mediated phagocytosis

Isabel Catherine Morrow^{1*}, Etienne Gagnon^{1*}, Sophie Duclos¹, John Bergeron² and Michel Desjardins^{1,3}

*These authors contributed equally to this work

1, Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Canada

2, Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Canada

3, Caprion Pharmaceuticals Inc., Montreal, Canada

Corresponding author: 

The phagosome acquires its unique collection of functions through fusion events with different subcellular compartments. While the plasma membrane (PM) is thought to be the predominant source of membrane for the forming phagosome, it is agreed that intracellular membranes must also contribute. The origin of these membranes has been the subject of recent controversy. We have provided biochemical and morphological evidence showing that the endoplasmic reticulum (ER) contributes membranes to the forming phagosome (Gagnon et al., 2002). Additional evidence of ER-phagosome interaction has been reported by others, such as: the presence of transporters associated with the antigen presentation (TAP) machinery for the cross presentation of exogenous peptides onto MHC class I, on phagosomes (Guermónprez et al., 2003); the observation that viral particles are processed and loaded onto MHC class I molecules in organelles positive for both phagosomal and ER markers (Wan et al., 2005); the involvement of the ER SNARE protein ERS24/Sec22b in phagocytosis (Becker et al., 2005); and the involvement of the ER resident protein UNC-93B in the innate responses to nucleic acids and exogenous antigen presentation, a process initiated in endosomes and phagosomes (Tabeta et al., 2006).

Despite the mounting evidence for the involvement of ER in phagocytosis, Touret et al. (2005) raised concerns about the validity of our findings in a “matters arising communication” published in a recent issue of *Cell*. This article conveyed a series of negative results giving rise to the conclusion that ER does not contribute to the phagosome membrane. Here, we have performed a series of experiments using some of the tools developed and used by Touret et al. to demonstrate that these tools are not suited to the study of ER recruitment during phagocytosis. Paradoxically, these tools have allowed us to further demonstrate the validity of our model.

Touret and coworkers argue that if ER participates in phagosome formation, it should be possible to visualize this process. To address this issue they performed immunoelectron microscopy (EM) on thin frozen sections using antibodies directed against both the cytoplasmic and luminal domains of calnexin. We have originally reported that a strong labeling for

calnexin was observed on isolated phagosomes by using a pre-embedding method with an antibody against the cytoplasmic domain (Gagnon et al., 2002). In the study of Touret et al., (2005), the cytoplasmic antibody yielded very low overall labeling, thereby limiting the conclusions that may be drawn from this experiment (the labelling on ER membrane was lower than the labelling they observed for another ER protein, PDI, on mitochondria). In contrast, using the luminal domain antibody, they were able to show that calnexin is abundant in the ER but not in phagosomal membranes. This result was to be expected considering that we have previously demonstrated a selective degradation of the luminal domain of calnexin within phagosomes (Gagnon et al., 2002). Here, we are able to confirm the degradation of calnexin within phagosomes by using our cytoplasmic antibody and the luminal domain antibody used by Touret and coworkers (kindly provided by Dr. David Williams) (Fig. 1A). Using the cytoplasmic antibody, full-length calnexin was observed on very early phagosomes, while truncated forms of the protein (probably the protected transmembrane and cytoplasmic domains) were detected at all time points and accumulated on more mature phagosomes. In contrast, the luminal antibody only detected the full-length form of calnexin at the earliest time point studied. The truncated forms were not detected at any time points, indicating the complete degradation of calnexin's luminal epitopes within the hydrolytic environment of the phagosome. These results indicate that the antibody against the luminal domain is unsuited to the study of ER association with phagosomes. Furthermore, the intraluminal cleavage of calnexin observed during phagosome maturation argues against the suggestion that isolated phagosomes are simply contaminated by ER membranes. In such a case, only the full-length calnexin present in ER would be observed at all time points.

Touret and coworkers also attempted to visualize ER recruitment during phagosome formation by live microscopy in RAW264.7 cells expressing GFP fused to the KDEL ER-retention signal (GFP-KDEL). As no GFP could be detected on latex bead-containing phagosomes, it was concluded that ER was not contributing membrane to this compartment (Touret et al., 2005). To explore this result further we performed biochemical analyses.

We isolated phagosomes from the RAW264.7 cells expressing GFP-KDEL (kindly provided by Dr. Sergio Grinstein), and measured the enrichment of GFP-KDEL in phagosome preparations relative to the total cell lysate. Our results demonstrate that a large amount of GFP-KDEL is present in the total cell lysate (TCL), indicating that these cells efficiently express this marker (Fig. 1B). However, GFPKDEL is barely detectable in purified phagosomes (>20 fold decrease compared to the TCL) (Fig. 1C). Our results are in agreement with those of Touret and coworkers obtained using video-microscopy indicating that GFP-KDEL is not recruited to phagosomes. However, when we looked at other ER markers, we observed a significant enrichment on phagosomal membranes (e.g. >2.5 fold increase for calnexin, thus a 50- fold enrichment of calnexin over GFP-KDEL) within the same fractions, indicating that ER components are indeed recruited to phagosomes. It is interesting to note that the use of RAW264.7 cells expressing GFP-KDEL, has also allowed us to further confirm that ER elements on phagosomes are not the result of contamination. In such a case, the GFPKDEL present in the ER would have been co-isolated with phagosomes and detected by Western blotting.

It is surprising to observe that two ER markers, endogenous calnexin and overexpressed GFP-KDEL, are differentially recruited to phagosomes. In order to understand this apparent discrepancy, we performed double-labelling experiments using antibodies against GFP and endogenous calnexin. Our results clearly indicate that these two “so-called” ER markers fail to co-localize in certain areas of the ER. Specifically, GFP-KDEL was shown to be absent from some of the peripheral ER and from the nuclear envelope (Fig. 1E-G and I, see also Figs. 1 and 5 from Touret et al., 2005). Clearly, overexpressed GFP-KDEL distributes only to a sub-region of the ER, and as such does not constitute an appropriate marker to follow ER recruitment during phagocytosis. It may have been advantageous to utilize cells that had phagocytosed *Brucella* or *Leigonella* (organisms known to reside in ER derived phagocytic compartments) as a positive control to test whether the GFP-KDEL overexpression system was capable of showing ER involvement in phagocytosis. Although Touret and coworkers did not perform experiments

to show that GFP-KDEL was colocalizing with an ER marker, they did show that overexpressed avidin-KDEL colocalized completely with endogenous PDI, including at the nuclear envelope. However, examination of their experimental methods (Touret et al., 2005) suggests that antibody cross-reactivity was highly probable in this experiment as an anti-goat secondary antibody was used to localize the avidin-KDEL despite the fact that the secondary antibody detecting PDI was raised in goat.

Touret and coworkers also suggested that if the ER fuses with the plasma membrane (PM) during phagocytosis, it should be possible to observe the release of soluble GFP-KDEL at the cell surface. As our Western blot data indicates that ER can be transferred to phagosomes while GFP-KDEL is not, it is not surprising that they were unable to observe the release of this tracer during frustrated phagocytosis experiments monitored by video microscopy. Here it must be noted that very little is known about the nature of the fusion process that may occur between ER and the PM during phagocytosis. It is not clear whether a luminal ER protein would be transferred to the extracellular environment and if so whether such an event could be captured by video-microscopy. In an accompanying manuscript, evidence is provided showing that in the absence of serum, the parasite *Leishmania donovani* is able to exploit ER mediated phagocytosis in neutrophils to evade killing in ER-derived phagocytic compartments and allow the dissemination of parasites to other cell types (Gueirard et al., submitted). Of particular note in this study is the observation that *Leishmania* is recruited into two types of phagosome, one that is degradative and forms a very loose parasitophorous vacuole and another that is very tight and has membrane in very close apposition to a non-degraded parasite. ER markers are found on the membrane of the tight non-degradative parasitophorous vacuole but never on the membrane of the loose degradative phagosome. If similar processes are occurring during the phagocytosis of latex beads then it is quite possible that in the event of membrane in close apposition to the bead there may be little loss of luminal contents to the extracellular environment. In the present study, in order to better understand what is happening at the cell surface in early phagocytic events, we fed cells with large latex beads

(60m) for a short period of time (15 min) and subsequently isolated the forming phagocytic structures to analyze their contents. Our results indicate that at this early point during phagocytosis, elements from the PM (Na⁺/K⁺ATPase), early endosomes (EEA1) and the ER (calnexin and calreticulin) are observed, confirming the contribution of many types of organelles to phagosome formation (Fig. 1D). However, while the overexpressed soluble GFP-KDEL was again barely detectable, another endogenous soluble ER marker bearing the KDEL signal, calreticulin, was detected. This indicates that membrane from various sources contribute to early phagosome formation, including ER lacking GFP-KDEL.

The only approach used by Touret et al., that incorporated the use of a positive control to test the efficacy of the method in detecting an ER-phagosome interaction was that of glucose-6-phosphatase (G-6-P) staining to label ER elements. Indeed, Touret and coworkers reported that while *Brucella*-containing phagosomes were strongly labeled, only 13% of the latex bead-containing phagosomes displayed G-6-P labeling. While this value was low in comparison to the 46% that we have previously reported (Gagnon et al., 2002), it was indeed positive and provided direct evidence for an ER-phagosome interaction. Since the G-6-P approach is an enzymatic method, several parameters might have influenced this apparent discrepancy, including the sources of the reagents used, the type of beads used, and the methodology used for the quantitative analyses. To clarify this issue, we repeated the G-6-P experiments and generated a set of samples that we reexamined and another set for an independent colleague. In this new set of experiments, we observed G-6-P labeling on more than 40 % (40.2%) of the latex bead phagosomes (Fig. 1H). Independent quantitation (R.G. Parton, University of Queensland, personal communication) reported labeling on 39% of latex bead phagosomes. Regardless of the phosphatase activity detected by our approach (although we have no reason to believe that it is any other than G-6-P), all the micrographs that we have analyzed show labeling of the ER, phagosome and nuclear envelope only. All other membranes (including endosomes and the

PM) were not labeled. Accordingly, it is reasonable to conclude, that ER is the only donor compartment of active phosphatase for the glucose-6-phosphate assay.

Concluding remarks

By looking at endogenous markers and cells in their native state, we have provided evidence showing the association of ER to phagosomes (Gagnon et al., 2002). This conclusion was challenged by Touret and coworkers using a complementary approach based on the overexpression of different constructs targeted to the ER by the KDEL signal (Touret et al., 2005). While the use of overexpression systems is one of the corner stones of modern molecular cell biology, the specialized functions carried out by the ER (involvement in quality control and stress response) may limit the extent to which this organelle can be manipulated without distortion. The observation that GFP-KDEL does not distribute to the entire ER would support this hypothesis and limit the use of this tracer. Taken together, our results obtained with the tools developed by Touret and coworkers support a model of ER-mediated phagocytosis in which only a sub-region of the ER is involved. Further study will be required in order to understand the mechanisms directing this process.

Acknowledgements

The authors wish to thank Robert Parton and Charles Ferguson for the electron microscopic analysis of our G-6-P experiments, and Peter McPherson for a critical reading of the manuscript.

References

Becker, T., Volchuk, A., and Rothman, J. E. (2005). Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4022-4026.

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

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

Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., *et al.* (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7, 156- 164.

Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., *et al.* (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157-170.

Wan, Y., Wu, Y., Zhou, J., Zou, L., Liang, Y., Zhao, J., Jia, Z., Engberg, J., Bian, J., and Zhou, W. (2005). Cross-presentation of phage particle antigen in MHC class II and endoplasmic reticulum marker-positive compartments. *Eur J Immunol* 35, 2041-2050.

Figure 1. Calnexin luminal domain antibody and KDEL-GFP are inappropriate tools for the study of ER mediated phagosomal biogenesis.

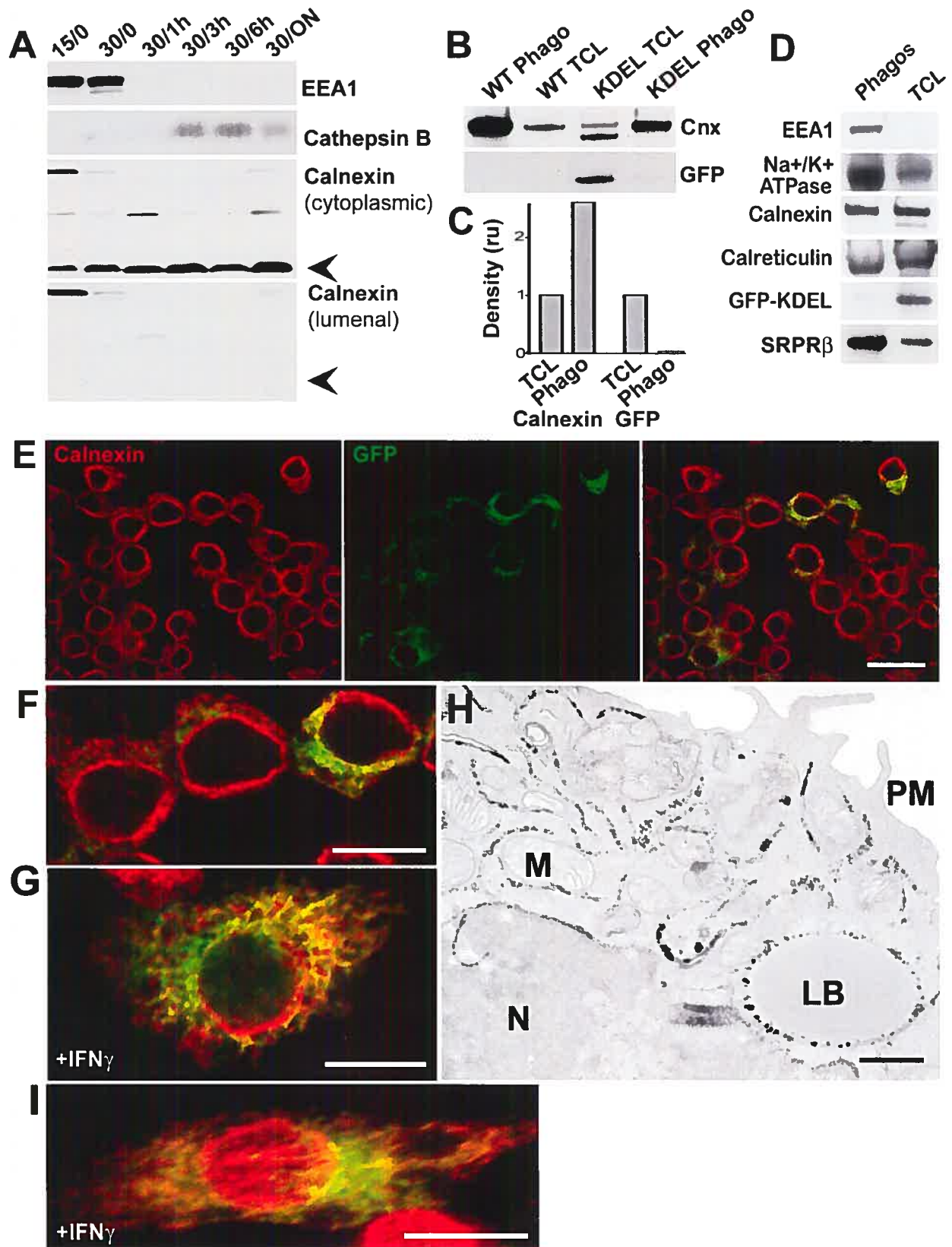


Figure Legend

Figure 1. Calnexin luminal domain antibody and KDEL-GFP are inappropriate tools for the study of ER mediated phagosomal biogenesis. (A) Phagosomes were isolated from J774 cells after incubation with latex beads for 15 min (lane 1) or 30 min (lanes 2 to 6) followed by various chase times (0h, 1h, 3h, 6h or overnight) in order to observe calnexin's association with phagosomes relative to phagosome maturity. Western blot shows that full-length calnexin is present at the early time points (15/0 and 30/0) and to a small extent on the mature phagosome (30/ON) as determined using an antibody directed towards calnexin's cytoplasmic domain. As the phagosome matures, the luminal domain of calnexin becomes cleaved leaving a lower molecular weight fragment that is not detected by the antibody towards calnexin's luminal domain (arrowheads) suggesting that calnexin is in its native conformation and that luminal domain is cleaved within the degradative environment of the phagosome. (B) Phagosomes isolated from RAW264.7 cells expressing KDEL-GFP or WT RAW 264.7 cells. Western blot (B) and subsequent quantitation (C) shows that calnexin is enriched in the phagosomes of both WT and KDEL-GFP expressing cells relative to the total cell lysate (TCL) (2.5 fold enrichment) whereas KDEL-GFP is absent from the phagosome (ru-relative units). (D) Phagosomes isolated from RAW 264.7 cells that had internalized 6 μ m latex beads for 15 min. Western blot shows that early endosomal autoantigen-1 (EEA1), Na⁺/K⁺ ATPase, Calnexin, Calreticulin and signal recognition particle receptor β (SRPR β) are well represented in purified phagosome samples relative to KDEL-GFP. (E, F and G) Confocal microscopy of KDEL-GFP expressing cells in the presence (G and I) or absence (E and F) of 100U/ml interferon γ and double labeled with anti-GFP and anti-calnexin (cytoplasmic domain) antibodies. Incomplete co-localisation is observed particularly at the nuclear envelope. Note, panel I shows a flattened 3D image rendered from multiple confocal sections obtained through the depth of the cell. (H) Glucose 6-phosphatase staining of J774 cells that had internalized 3.0 μ m latex beads for 30 min. Note, an electron dense precipitate is observed associated with

the nuclear envelope (N), ER and latex bead (LB) but not with the plasma membrane (PM) or mitochondrial membranes (M). Bars 10 μm (E), 5 μm (F, G and I) and 1 μm (H).

Chapitre II : Résultats article 3

Etienne Gagnon, Simon Letarte and Michel Desjardins. (2006). Specific mRNA targeting to the phagosome allows for temporal and spatial translation. *Article en préparation.*

Specific mRNA targeting to the phagosome allows for temporal and spatial translation.

Etienne Gagnon¹, Simon Letarte¹ and Michel Desjardins^{1*}

1) Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

* Corresponding author

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. Centre ville tel: 514 343-7250

Montréal, Québec

fax: 514 343-2459

Canada, H3C 3J7

email: [REDACTED]

Running title: mRNA targeting to phagosomes

Key words: Phagocytosis, Membrane fusion, Endoplasmic reticulum, RNA granule, translation.

Abstract

Phagocytosis is a process that allows cells of the immune system to internalize large particles like invading microorganisms in order to kill and degrade them. It represents the first line of defense against infections and plays a pivotal role in linking innate and adaptive immunity. In order to acquire its microbicidal properties, phagosomes quickly engage in a maturation process involving sequential fusion events with organelles from the endocytic pathway. It has been shown that newly-translated proteins associate rapidly to phagosomes (Gagnon et al., 2002). However the mechanisms underlying such observations have not yet been addressed. Here we show that newly-synthesized proteins specific to the phagosome are rapidly targeted via an ER/Golgi biosynthetic-independent route. Through proteomics analyses using Stable Isotope Labeling in Cell culture (SILAC), we have been able to identify some of these proteins. Furthermore, *in vitro* translation assays performed with freshly isolated phagosomes have shown the presence of a specific subset of phagosomal-targeted mRNAs. Proteins encoded by these mRNAs have been shown to play a role in phagosome formation and maturation, as well as antigen presentation. This is the first time that mRNA targeting has been observed in macrophages and could help us better understand the mechanisms governing phagosomal maturation and host-pathogen interactions.

Introduction

Phagocytosis is a mechanism by which cells internalize large particulate matter. In mammalian organisms, it plays a crucial role in the host's innate ability to defend itself against invaders by allowing the capture and degradation of these microorganisms (Aderem and Underhill, 1999). Also, phagocytosis is a central step in the ability to generate peptides from the degradative process of internalized pathogens and to eventually load these antigens onto MHC molecules in order to elicit an adaptive immune response (Jutras and Desjardins, 2005). The phagosome's capacity to rapidly interact with other cellular organelles is at the center of its ability to mature and acquire degradative properties (Scott et al., 2003; Aderem and Underhill, 1999). In order to allow for this, some of the proteins involved in promoting such interactions have to be present in the earliest onset of phagocytosis. Also, proteomics analyses of purified phagosomal preparations have revealed the presence of several proteins involved in protein synthesis (Garin et al., 2001; Brunet et al., manuscript in preparation). Such findings have required us to rethink the way we look at protein targeting.

In the neuron, it has been well established that in some cases it is not the proteins that are targeted to specific regions of the cell, but rather the coding mRNAs (Kindler et al., 2005). In the 1980's and early 1990's, it became clear that biosynthetic machinery and specific RNAs could be targeted to different cellular sites, sometimes at considerable distances. Work done in many types of cells, ranging from *Xenopus* oocytes to mammalian neurons, has shown that a common principle might be at work, and that it appeared to be a conserved mechanism throughout eukaryotic evolution. Today, our understanding of such mechanisms depict that mRNAs are transported, and locally translated in many eukaryotic cell types (St-Johnston, 2005; Kindler et al., 2005). These mechanisms are of fundamental importance in the control of gene expression as they allow cells to delegate autonomous regulation of translation to certain regions of themselves. The complexities of the mechanisms that control targeting and translational regulation have been well characterized

in the working model of the neuron. Such studies have shown that mRNA targeting was dependent on two sets of factors. Specific coding regions, termed *cis*-acting elements, are able to specify targeting through their three dimensional conformation (Mohr et al., 2002). Such regions are recognized by *trans*-acting elements that assemble in multi-component machineries that allow the transport and the regulated translation of such RNAs to predetermined cellular sites.

Interestingly, many components of the molecular machinery implicated in this process have been identified through extensive proteomics analyses of purified phagosome preparation (Brunet et al., manuscript in preparation). Also, earlier results had shown the rapid association of newly synthesized proteins to phagosomes at a time point where nascent proteins would not have enough time to transit through the ER-Golgi biosynthetic pathway (Gagnon et al., 2002). Here we show that a specific subset of mRNAs are targeted to the phagosome, are translated locally, and the resulting newly-synthesized proteins interact with this organelle. Specific targeting of mRNAs does not implicate the endoplasmic reticulum or the Golgi, but follows the same principles as the ones described for mRNA transport in the neuron. This previously undescribed mechanism in the macrophage helps us redefine protein acquisition during phagosome maturation and may provide new explanations in the mechanisms underlying the survival of type IV-secretion apparatus-containing pathogens like *Legionella* and *Brucella*, a bacterial secretion apparatus normally involved in DNA transfer.

Materials and methods

Cell culture and chemical reagents. The mouse macrophage cell line J774.1 was grown in DMEM high glucose (Sigma) supplemented with 1% glutamine (Gibco), 1% pen/strep (Gibco) and 10% fetal bovine serum « FBS » (Gibco) at 37⁰C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were grown at a confluence of about 70-80% every 48 hours, and were used for various experiments after roughly 36 hours of passage. Puromycine (Sigma) was

resuspended in water as a stock solution at 100mg/ml, and was used at various concentrations depending on the experiment. Tunicamycin (Sigma) was resuspended in DMSO as a stock solution at 20mg/ml, and was used at 5µg/ml to inhibit glycosylation. Brefeldin A (Sigma) was resuspended in 100% ethanol as a stock solution at 5mg/ml, and was used at 5µg/ml to inhibit ER-to-Golgi transport.

Phagosome formation and isolation. Phagosomes were formed by incubating cells with latex beads « LB » (1µm beads diluted 1:50; 3µm beads diluted 1:200) in nude DMEM at 37⁰C for 30 minutes to one hour. After which, LB-containing medium was removed and washed with ice-cold PBS. For the chase, after the wash, cells were incubated in complete DMEM for varying periods of time. After the chase, cells were washed with ice-cold PBS and harvested using a Teflon cell scraper, and then spun at 715g (1500rpm) for 5minutes in a cooled table-top centrifuge. Cells were washed once in the same manner in homogenization buffer « HB » (0,250M sucrose, 3 mM Immidazole, and 1X protease inhibitor mix). The pellet was resuspended again in 1ml of HB using a pipette. Cells were lysed mechanically using a stainless steel putter, and the integrity of the nuclei was assessed using light microscopy during cell lysis. Lysed cells were spun at 1200g (2000rpm) for 5 minutes and the resulting post-nuclear supernatant « PNS » was removed and mixed with 1ml of 62% sucrose buffer (3 mM Immidazole, and 1X protease inhibitor mix) until homogeneous. The mix was added on top of 1ml 62% sucrose cushion previously added at the bottom of an ultracentrifuge tube (Beckman). A step gradient was formed by the sequential addition of 2ml of 35%, 25%, and 10% sucrose buffers (3 mM Immidazole, and 1X protease inhibitor mix). Isolation was performed by spinning the phagosome-containing PNS at 100 000g for one hour in a Beckman ultracentrifuge SW41Ti rotor at 4⁰C. Phagosomes were retrieved at the 10%-25% interphase using a fine-tipped disposable pipette, and washed in either 10ml of PBS in a new ultracentrifuge tube by spinning them at 15000rpm for 15 minutes, or in 1,5ml PBS in biopure Eppendorf tube. Pelleted phagosomes were resuspended in appropriate buffer depending of the following

experiment. Isolation of phagosomes for *in vitro translation* was performed with DEPC-treated solutions (sucrose buffers, PBS).

Topology of nascent proteins. In order to determine the topology of nascent proteins, freshly isolated radiolabeled phagosomes were retrieved from the 10-25% sucrose gradient interphase. This gave us around 500 μ l of phagosomes in a buffer containing roughly 17,5% sucrose. Cold PBS was added in a ratio of 1:1 to achieve a final concentration of 8,5% sucrose. Proteinase K was prepared as a stock solution of 100 μ g/ml and was used at a final concentration of 0,1 μ g/ml during experiments. Treatment was performed at 30⁰C for 30 minutes and proteolytic cleavage of cytosolic components was followed using Western blot analysis (see figure legends for antibodies used).

Immunofluorescence. After phagocytosis and chase times, cells were fixed with 4% PFA in PBS for 10 minutes at room temperature (RT⁰), or fixed with 80% Methanol/20% Acetone at -20⁰ for 20 minutes. After fixation, cells were washed 3 X 5 minutes in RT⁰-PBS. Cells fixed with PFA were later permeabilized with 0,2% Triton X-100 for 2 minutes at RT⁰, and then washed 3 X 5 minutes in RT⁰-PBS. Blocking of non-specific interaction was performed by incubating fixed cells in PBS containing 2% BSA, 0,1% gelatin. Rabbit anti-calnexin (C-term specific epitope) was used at 1:500 dilutions, monoclonal anti-puromycin at 1:1000, rabbit anti-RpS6 (Ribosomal phospho-S6 protein) at 1:500. Specific secondary antibodies were purchased from Molecular Probes and contained various ALEXA fluorochromes. Images were captured on a Leica confocal microscopy and used as sections or 3-D reconstitutions.

Metabolic cell labeling and SILAC. In order to visualize newly-synthesized proteins associated to phagosomes, metabolic radiolabeling was performed during phagocytosis or shortly thereafter. Briefly, cells were starved in methionine-free nude DMEM (Met-free nDMEM) 30 minutes prior to LB addition. LBs (1:50) were added to the medium for a period of time indicated in the figure legends. After which, cells were washed three times in warm PBS and a short chase (10 or 20 minutes) or a long chase (3

hours) in Met-free nDMEM followed. After that chase, ^{35}S -Methionine (Redivue Pro-Mix cell-labeling grade, GE-Healthcare) was added to the culture medium for 10 minutes at a final concentration of $60\mu\text{Ci/ml}$. After labeling, cells were washed rapidly with ice-cold PBS to block further radioactive incorporation, and the resulting phagosomes were either isolated at that time or allowed to continue to mature by incubating the cells in complete DMEM at 37°C for one hour, and then isolated. In the experiments where the contribution of ER and Golgi was studied, cells were incubated in the presence of Tunicamycin or Brefeldin A throughout the experiment at concentrations described above. In the experiments where SILAC was involved, Met-free nude DMEM was replaced with leucine-free nude DMEM (Leu-free nDMEM), and ^{35}S -Methionine was replaced with deuteriated leucine (Leu-D3) at a final concentration of 315mg/ml (three times the amount of leucine normally found in regular DMEM). Also, you are referred to Supplementat Figure 1 for an overall view of the experimental design.

In vitro translation assay. In order to assess the presence of mRNAs recruited to phagosomes, an *in vitro* translation assay was performed. Isolated phagosomes from 6 petris dish were resuspended in $50\mu\text{l}$ of rabbit reticulocytes (Promega), $38\mu\text{l}$ DEPC water, RNase inhibitor (1X), and $2\mu\text{l}$ amino acid mixture. After a pulse spin to remove droplets present on the side of the tube caused by phagosome resuspension, $33\mu\text{Ci}$ of ^{35}S -methionine (Redivue *in vitro* grade, GE-Healthcare) was added, and the reaction was carried out for 90 minutes at 30°C in a block heater. Reaction was stopped by adding Puromycin ($2\mu\text{l}$ of the 100mg/ml stock) for 5 minutes followed by 5 minute incubation on ice. Organelles were pelleted at $9000g$ for 7 minutes in a cooled table-top microcentrifuge, and washed three times with ice-cold PBS using the same pelleting protocol. Resulting pellet containing organelles was resuspended in appropriate buffer depending on the following experiment. Controls used to validate certain experiments were either purified microsomes (Promega), PNS obtained from non-phagocytosing J774.1 cells, or total

membrane preparation (TM). TM preparation was obtained by a 25000g spin for 15 minutes of the previously prepared PNS.

Western blot analysis. Proteins were resuspended in Laemmli buffer and quantified using the EZQ protocol (Molecular probes) prior to gel migration, and the same amount of proteins were added in each lane. The gels used were either poured in the lab or purchased from Invitrogen (pre-cast gels 4-12%). After electrophoretic migration, proteins were either transferred for 90 minutes at 250mA onto nitrocellulose or PVDF membranes. Transferred proteins were either left to dry prior to film exposure or blocked for one hour in PBS containing 5% milk and 0,15% TWEEN20. Primary antibodies used were diluted in the blocking solution at concentrations indicated in the figure legends. Corresponding secondary antibodies conjugated to HRP were used at a dilution of 1:3000 in blocking solution and were revealed using an enhanced chemiluminescence assay (Perkin Elmer). Luminescence was capture onto Kodak X-Omat films.

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Proteins were solubilized in IPG-lysis buffer complemented with ampholytes according to the desired iso-electric focusing ladder in order to perform 2-DE. IPG dried strips (pH 3-10 or 4-7) were rehydrated overnight with 125 μ l of the protein/IPG-lysis mixture. The first dimension was performed on the multiphor (GE-Healthcare) at a series of increasing voltage. Briefly: 300V/10minutes, 700V/10mins, 1500V/20mins, and 3500V/150mins. After iso-electric focusing, strips were equilibrated following a previously described protocol (Garin et al., 2001). Second dimension was performed using Bio-Rad pre-cast gels (12% acrylamide). Migration was performed at 150V, and gels were left to migrate an additional 2 minutes after migration front had left the gel. Gels were either transferred onto nitrocellulose membrane, as described above and left to dry prior to film exposure, or stained using two different protocols. Gels that were meant for image analysis were stained using a high sensitivity silver-staining protocol as described previously (Garin et al., 2001). Gels that were used

for Mass-Spectrometry analysis were stained using an MS-compatible protocol (Dermine et al., 2005).

Nascent protein identification. After film exposure, 2-DE radioactive protein pattern was analyzed using Image Master 2-D Elite (GE-Healthcare) and spots were aligned with corresponding silver-stained spots of the same gel. After which, that silver-stained protein pattern was aligned with the silver-stained 2-D gel containing Leu-D3-labeled proteins. Spots from the Leu-D3 gel showing significant alignment with the ^{35}S gel were excised and processed for Mass-Spec analysis following previously described protocols (Garin et al., 2001; Dermine et al., 2005). The Mascott search engine was modified in order to be able to identify the presence of the heavy leucine incorporated in the nascent proteins. An algorithm containing a +3 size shift for leucine or isoleucine was added to the previously developed PTM database (Post-Translation Modification). Peptides containing this modification were considered to be newly-synthesized since labeling can only occur during proteins synthesis.

Results and discussion

Newly-synthesized are rapidly recruited to the phagosome. In order to determine whether newly-translated proteins were recruited to phagosomes, we performed a radiolabeled pulse-chase experiment shortly after phagosome formation (see materials and methods, also Sup.1). Beads were internalized for 30 minutes and phagosomes were left to mature for an additional 20 minutes. Radiolabeling was performed for 5 or 10 minutes, and phagosomes were immediately isolated. Proteins were resolved by 1-D SDS-PAGE or 2-D electrophoresis. Radiolabeled protein patterns were visualized by film exposure. Results show that newly-synthesized proteins are rapidly recruited to phagosomes. Indeed, after only five minutes of pulse-labeling, radiolabeled proteins are found associated to isolated phagosomes (Fig. 1A). This short time of pulse-labeling should not allow proteins from the

ER/Golgi pathway to be recruited to the phagosomes, since it takes roughly 15-20 minutes for that transit to occur (Pimental et al., 1996). We also performed a 10 minute pulse-labeling experiment to see if this time frame could also be used to study the same process, allowing us to shorten our time of film exposure due to increased radioactive labeling. Results show that newly-synthesized proteins recruited to the phagosomes after a 5 or 10 minute pulse-labeling are the same, indicating that a 10 minute pulse is short enough to study ER/Golgi independent protein synthesis and targeting (Fig. 1A and B).

In order to determine the topology of the newly-translated proteins, we treated freshly isolated radiolabeled phagosomes with proteinase K (prot-K). This technique has previously been shown to degrade cytosolic proteins or domains while their luminal counterparts remained unaffected (Garin et al., 2001; Gagnon et al., 2002). The effectiveness of the treatment was followed by western blot analysis using antibodies specific to either cytosolic or luminal proteins (Rab5a and calreticulin respectively). Results show that the prot-K treatment was not too harsh as it did not affect luminal calreticulin, but degraded cytosolic Rab5a (Fig.1A). Also, prot-K treatment clearly indicates that most nascent proteins associated to phagosomes are of cytoplasmic nature due to their sensitivity to the treatment, although some proteins seem to be (Fig.1A). In order to get a better understanding of the effects of prot-K on nascent proteins recruited to the phagosome, a 2-DE gel analysis was performed. Results clearly show that most proteins appear to be sensitive to treatment, although a small population of proteins appears to be resistant (Fig.1B). The modifications of protein pattern caused by the proteinase treatment is identical in both pulse-labeling experiment indicating similarities in the nature of nascent proteins recruited to phagosomes at these time points.

To better visualize this phenomenon, protein patterns from the 5' pulse-labeling experiment were given pseudo colors to allow overlay. Control proteins were given the color green, while prot-K-treated proteins were given the color red. The resulting image shows that most proteins are sensitive to proteinase K indicating their cytosolic nature

(green spots), while other proteins appear to be resistant (yellow spots). The observed resistance from proteolysis can arise from two phenomena. The first one is that the protein is luminal and cannot be reached by the non membrane-permeable proteinase. Second, it has also been documented that tightly folded proteins are resistant to proteinase K treatment (Tirosh et al., 2003). It is therefore possible that the prot-K resistant proteins are also of cytosolic nature, but remain resistant to proteolysis due to their folding state. In addition, results show that some proteins are partially resistant to prot-K treatment which causes an incomplete degradation and results in a difference in migration location in the gel (red spots indicated by arrowhead). The partial resistance to such treatment can also be explained by two hypotheses. The first one is that these proteins are found tightly complexed to other proteins which can partially protect them from protease activity (Tirosh et al., 2003). The other is that they are of transmembrane nature and that the treatment causes the degradation of their cytosolic domain while their transmembrane and luminal domains stay intact (Garin et al., 2001). This last hypothesis is somewhat unlikely since it is well documented that transmembrane protein fail to load in the IPG dry strip during rehydration. Therefore, partial resistance to proteinase is more likely to arise from tightly complexed proteins.

Proteomic SILAC analysis reveals the identity of the nascent proteins recruited to phagosomes. In order to get a better understanding of the nature of these phagosome-targeted nascent proteins, we performed a Stable Isotope Labeling in Cell culture experiment (Leu-D3 gel) in parallel with radiolabeling experiment (^{35}S gel) (see Sup.1). Radiolabeling served as a reference to determine the location of newly-synthesized proteins in regards to the silver-stained protein pattern. Briefly, the radiolabeled protein pattern was aligned with the silver-stained protein pattern from the ^{35}S gel. Silver-stained protein pattern from the ^{35}S gel was then aligned with the silver-stained Leu-D3 gel using Image Master 2D-ELite (GE Healthcare, results not shown). Spots that showed significant alignment were excised and processed for Mass-Spec (MS) analysis. This allowed us to positively identify nascent proteins with the identification of heavy leucine (leu-d3) in the peptide sequence analyzed. Although not all identified proteins yielded leu-d3 positive

peptides, due to the fact that not all peptides identified contained leucines and that most likely not all unlabeled leucine had been removed during starving of the cells, we have included them in our list since alignment of the excised spots with the ^{35}S gel, using software designed for such alignments, was significant enough to include them. All the proteins identified with this method are known to be cytosolic and some of them have been reported to interact directly with membranous organelles (Fig. 2A, Table I). To confirm the identity of some of the proteins identified through SILAC analyses, we performed western blot analysis on transferred 2-D gels containing ^{35}S -labeled phagosomal proteins. Overlaying of the ^{35}S signal with the luminescent signal from western blotting was used to confirm identity. With this method, we confirm the presence of newly-translated EEA1, G-proteins α and β , and also GAPDH (Fig. 2B, right panels). These proteins were found to be at different levels of neo-synthesis, while relative antibody signal were similar.

Although GAPDH had not been identified through SILAC analyses, because iso-electric focusing used to separate proteins sent MS analysis was performed in a pH4-7 IPG strip to allow better resolution of the spots (not shown), Image Master 2D Elite analysis using our own 2-DE gel database suggested that this protein might be newly-synthesized when analysis was performed with pH3-10 gel (Fig. 2B, left panel). Some of the proteins identified through SILAC or WB analyses have been linked to protein synthesis and mRNA transport, while others have been shown to be involved in phagocytosis (Garin et al., 2001). For instance, EEA1 has been shown to be recruited to early phagosomes and is thought to be acquired through fusion events with endosomes. The presence of newly-synthesized EEA1 suggests that a portion could be directly sent to phagosomes after synthesis. This may require us to rethink the way we interpret the acquisition of proteins during phagosome formation and maturation (Figure 2B right panels). This is supported by the fact that pulse-labeling was performed in a time frame which normally does not allow the acquisition of nascent protein coming out of the ER/Golgi biosynthetic pathway, but we could not exclude an accelerated version of this route.

Recruitment of nascent proteins to phagosomes is an ER/Golgi independent mechanism. In order to verify that nascent proteins recruited to the phagosomes were indeed not coming from a rapid recruitment from the ER/Golgi biosynthetic pathway, we performed a short pulse-labeling experiment on phagosomes followed, or not, by a 1 hour chase in complete medium (Fig.3A 10S-0= no chase and 10S-1h= 1h chase) to allow nascent proteins to transit through the ER/Golgi biosynthetic pathway and to be targeted to phagosomes. During these experiments, cells were treated or not with the glycosylation inhibitor Tunicamycin (TUN) or an inhibitor of ER-to-Golgi transport, Brefeldin-A (BFA) (Fig.3 and results not shown). Both of these inhibitors block the exit of nascent proteins from the ER through different modes of action. Tunicamycin inhibits N-glycosylation of proteins in the ER and causes their accumulation in that organelle. Eventually these aberrant proteins are recognized by the quality control machinery and degraded by an ER-associated degradation (ERAD) mechanism involving the proteasome (deVergilio et al., 1999). The effectiveness of the TUN treatment has previously been established in J774.1 macrophages (Gagnon et al., 2002). BFA is a specific inhibitor of ARF1 and blocks cargo-containing vesicle transport from the ER to the Golgi apparatus (Lee et al., 2002). Eventually, the Golgi apparatus collapses into the ER due to a lack of anterograde transport leaving the retrograde transport unaffected, promoting this collapse. We followed the effects of BFA through immunofluorescence microscopy using anti-GM130, a specific Golgi marker. After the treatment, over 90% of the cells displayed a punctate labeling of GM130 throughout the cell, while control cells, treated with the BFA solubilization buffer EtOH, retained a Golgi apparatus identical to that of untreated cells (results not shown).

The effects of the drugs on newly-synthesized protein recruitment to phagosomes were assessed using 2-DE. In control cells, the acquisition ewly synthesized proteins from the ER/Golgi biosynthetic route is evident at 1 hour of chase after radiolabeling. The 2-DE pattern that these proteins give suggests their glycosylated state. Indeed, glycosylated proteins give a very distinct “bead necklace-like” pattern (Fig. 3, red spots bottom left panel

indicated by white arrowheads). The presence of glycosylated proteins clearly indicates a transit through the ER/Golgi biosynthetic route. Tunicamycin treatment completely abolished the acquisition of these glycosylated proteins signifying that the treatment was effective in blocking the ER-to-Golgi route (Fig.3 CTL/TUN OVR panels: 10S1h green spots indicated by white arrowheads). This treatment also abolished acquisition of non glycosylated proteins (indicated by blue arrowhead). However, the TUN treatment did not alter the early recruitment of nascent proteins to phagosomes, indicating that they did not come from the ER/Golgi pathway (Fig.3 top right OVR panel: 10S-0, mostly yellow spots observable). Colocalization of over 90% of the spots from both gels clearly indicates this. This indicated that proteins synthesized during radiolabeling were not produced in the ER, but were effectively targeted to phagosomes

Although Tunicamycin blocked the recruitment of nascent proteins coming from the ER/Golgi route, it failed to completely inhibit nascent protein dynamics during phagosome maturation. In control cells, many nascent proteins are lost along phagolysosome biogenesis. Interestingly, the same proteins are also modulated during phagosome maturation in the presence of TUN (Fig.3 bottom left panels green spots indicated by asterisk). The loss of nascent proteins, observed through 2-DE, could be due to the completion of protein synthesis resulting in a change of migration location in the gel. However, these observations could also be explained by the loss of proteins due to the changing nature of the maturing phagosomes. It has been shown that many proteins found on early phagosomes were no longer observed on this organelle at later stages of maturation (Garin et al., 2001). This suggests that targeting of nascent proteins to phagosomes is temporary and could be modulated with time.

Also, TUN treatment did not inhibit the acquisition ER/Golgi route-independent proteins. Unglycosylated proteins found acquired during phagosome maturation in control cells were also present in TUN-treated cells (Fig.3. OVR panels, spots indicated by arrow). It is important to point out that these proteins were labeled one hour prior to phagosome

isolation and did not interact with that organelle at the time of synthesis since they are absent in the short pulse-labeled gels. Also, they were not synthesized just prior to phagosome isolation since radiolabeled media had been removed and replaced with « cold » complete medium during the chase, which inhibits additional radiolabeling of proteins. These proteins were probably synthesized in the cytosol somewhere in the cell far from the phagosome and acquired with time, or synthesized nearby but only interacted with the phagosome at that specific time. Finally, TUN treatment only seemed to inhibit the recruitment of newly synthesized ER/Golgi-dependant proteins as it did not seem to interfere with overall phagosomal protein composition. Overlay of silver-stained gels from TUN treated and control cells clearly shows that treatment did not alter the bulk of the phagosome proteome (Fig.3A far right 'Silver' panels). This also indicates that recruitment of nascent-protein acquisition is a very subtle and specific mechanism.

The same results were obtained when BFA was used as an inhibitor of the ER/Golgi biosynthetic pathway, although the effects were more pronounced on overall protein synthesis and phagocytosis was greatly reduced (results not shown). Although indirect, this suggests that ER integrity, greatly altered by the collapse of the Golgi apparatus through BFA treatment, could be essential for phagocytosis. This could also suggest a possible role for ARF-1 in phagocytosis. Further studies would be needed to confirm either of these hypotheses however.

Exclusive targeting of newly-synthesized proteins to phagosomes is modulated during phagolysosome biogenesis. In order to determine the specificity of nascent protein recruitment to phagosomes, Post-Nuclear Supernatant (PNS), containing all cytosolic and membrane proteins, was prepared in the same conditions as the former (see Sup. 1 for details). Briefly, pulse-labeling was performed during (During), or shortly after (After), phagocytosis and resulting phagosomes and PNS were prepared (Fig. 4). The nascent proteins recruited to forming or early phagosomes seem to be very similar in nature (Fig. 4A, bottom left panel, mostly yellow spots) confirmed by over 90% overlay of protein

patterns when analyzed by scatter plot (results not shown), although minor differences can be observed (green or red spots). These mis-colocalizations, though, have more to do with differences in gel migration than actual protein identity, as indicated by Image Master 2-D Elite analysis. Similar results were observed when analyzing the same time points in both PNS preparations (Fig. 4A bottom right overlay panel). These results indicated that little to no changes in nascent protein recruitment occurred over a 20 minute time frame.

Interestingly, when comparing nascent proteins recruited to phagosomes to those found in the PNS, minimal overlay could be observed, as most of the spots appear green or red (Fig.4A right overlay panels). This strongly suggests differential recruitment of nascent proteins to either cellular compartment. Indeed, nascent proteins can be found exclusively in the PNS (red spots indicated by arrows) or in the phagosomes (green spots indicated by arrowheads). Although newly-synthesized proteins could be found in both PNS and phagosomes, some of these are largely over expressed in phagosomes (asterisk), another direct indication of specific targeting (Fig.4A right overlay panels). Also, the differences observed in nascent protein patterns from the phagosome and the PNS clearly show that the presence of radiolabeled proteins present in phagosome preparations is not due to non-specific 'sticking' to this organelle or latex beads during the isolation procedure, but that in fact we are looking at a process that specifically directs nascent proteins differentially to phagosomes. In the time-frame utilized during these experiments, post-Golgi sorting cannot explain these differences because of time constraints. Direct ER delivery of nascent proteins, which can be observed during peroxisome biogenesis (Geuze et al., 2003), is also not in play since abrogation of N-glycosylation by TUN does not alter nascent protein recruitment to the phagosome (Fig. 2). Since these two protein sorting/targeting machinery do not seem to be involved in this model, some other mechanism must be in play to explain such observations.

It is reasonable to think that such a mechanism would not only allow spatial targeting of nascent proteins according, but also temporal. To test this hypothesis, we

utilized our ability to isolate phagosomes at several time points, each displaying different levels of maturity. We therefore performed a pulse-labeling during early (Early) or late (Late) phagocytic events, and phagosomes were isolated (see Sup. 1 for details), and proteins were resolved using 2-DE. The gels were silver-stained and the maturation state of each population of phagosomes was assessed by comparing the gels with our database containing protein pattern kinetics during phagolysosome biogenesis (Garin et al., 2001, Brunet et al., manuscript in preparation). Proteins that had previously been shown to decrease during phagolysosome biogenesis are found in red insets and the ones previously shown to be acquired are found in blue insets (Fig.4B 'Silver' panels). These results confirmed the differential state of maturation of the phagosomal populations used.

Although different populations of early phagosomes display a striking similarity in regards to the recruitment of nascent proteins (Fig. 4A bottom left overlays), this is not the case when we analyzed the recruitment of newly-synthesized between early phagosomes and phagolysosomes (Fig. 4B overlay panels). When comparing nascent protein recruitment to these phagosomes, it was clear that protein patterns differed greatly from one maturation state to the next (Fig. 4B ³⁵S' panel). Indeed, subsets of nascent proteins were specifically found on early phagosomes (Fig.4B green spots, right overlay panels) while some nascent proteins were specifically synthesized and recruited to phagolysosomes (Fig. 4B red spots, right overlay panels). Some of these proteins were found exclusively on phagosomes when compared to either PNS or TM nascent proteins (Fig. 4A and B, and results not shown). No differences between protein patterns from PNS prepared at these same time points were observed (results not shown), clearly indicating a temporal difference in nascent protein recruitment to phagosomes. These observations also reinforce the hypothesis that specific mechanisms govern neo-synthesis at the phagosome level.

One of the nascent proteins identified as being modulated during phagolysosome biogenesis, actin (identified using Image Master 2D Elite software and SILAC proteomics analysis, see table I), seemed to be specifically found in one form in early phagosomes and

another form in phagolysosomes. Both β and γ -actin isoforms migrate in the same region of the gel and the difference in iso-electric focusing is very small: γ -actin migrating to a slightly more basic pH than its counterpart. Nevertheless, in these gels, results suggest that newly-synthesized β -actin is associated with early phagosomes, while nascent γ -actin is predominantly found on phagolysosomes (Fig.4B arrow points to β -actin while arrowhead points to γ -actin). It has previously been shown that mRNAs coding for each protein are specifically targeted to different regions of the cell. Indeed, experiments using fluorescent probes to localize both mRNAs have shown that β -actin mRNA is predominantly targeted to the leading edge of migrating cells, while γ -actin mRNA is mostly found in the perinuclear region (Medrano and Steward, 2001). This difference in specific mRNA targeting could explain why we observe this shift in protein synthesis from β to γ actin during phagolysosome biogenesis since it has been shown that early phagosomes are mostly found in the periphery of the cell, while phagolysosomes are predominantly found in the perinuclear region (Blocker et al., 1998). These results also suggest that different populations of mRNAs could be targeted to phagosomes and locally translated at different stages of phagosome maturation, explaining why different sets of nascent proteins are so rapidly recruited to phagosomes in an ER/Golgi independent pathway.

Active mRNA translation machinery is found on the phagosome. In order to test this hypothesis, we performed western blot analysis and immunofluorescence on newly formed phagosomes. To show enrichment of phagosomal proteins compared to total cell proteins, the same amount of proteins of each sample was loaded in the gel (lanes TCL and Phago, Fig.5A). Purified rough-microsomal proteins were also loaded onto gel to act as positive control to illustrate active translation (RM lanes, Fig 5A). Results clearly show enrichment of EEA1, Flotillin-1 and Cathepsin B, all specific markers previously shown to be present in higher relative amounts in endocytic organelles than the rest of the cell (Garin et al., 2001; Dermine et al., 2001). In addition, calnexin, an ER marker shown to be present in phagosomes, was also enriched in phagosomes when compared to TCL, but not

compared to RM even though fewer proteins were loaded in this lane. This is to be expected since calnexin is a specific marker of the ER and only portions of the phagosome's membrane is made up of ER (Gagnon et al., 2002). Results also show the presence of SRP54 in phagosomes and, in higher amounts, in the TCL. However, little is observed in microsomes. This is to be expected since SRP54 directs newly synthesized signal peptides, linked to ribosomes, to the translocon via the SRP β receptor, and that when translation is reinitiated; it separates from the complex (Wild et al., 2004). This also explains why enrichment of SRP54 is observed in TCL, where heterogeneous populations of active and dormant ribosome/mRNA complexes are found.

On the other hand, another marker for active translation, RpS6 (Ribosomal phosphor-S6), is found in comparable amounts in all three samples. The ratio of RpS6 over SRP54 is a direct indicator of the proportion of mRNAs being actively translated. If we were to set the TCL RpS6/SRP54 ratio at 1, representing equal amounts of active and dormant ribosome/mRNA complexes, overall translation activity is increased in phagosomes and much more increased in RM. This is to be expected since by nature, rough microsomes represent ER membranes containing actively translating ribosomes attached to the translocon (Roy et al., 2001). It has previously been shown that ER membranes were used to form the phagosome during the internalization process (Gagnon et al., 2002). It could be possible that active translation observed on phagosomes is due to neo-synthesis linked to the ER machinery being transferred onto phagosomes through membrane recruitment. Indeed, SRP β is present in the phagosomal membrane and may direct mRNA/ribosome complexes to this site (Morrow et al., 2006). However, the presence of ER-machinery does not seem to play a part in determining which mRNAs are targeted since newly-translated proteins pattern associated to phagosomes differed greatly from protein patterns associated to total membrane preparation, a membrane preparation mostly made of ER (results not shown). This suggested further that mRNAs were differentially targeted to phagosomes through a very specific mechanism.

Immunofluorescence analysis showed close vicinity of RpS6 to phagosomes in the perinuclear region (Fig.5B left panel). In some instances, where phagosomes were observed far from the cell body, RpS6 labeling was also present and seemed to be associated to the phagosomal membrane (Fig.5B right panel). Labeling of nascent proteins with a low concentration of puromycin (Puro) was also used to determine the presence of active translation near or on the phagosome. It has been shown that incubating cells with a low concentration of puromycin caused a specific C-terminus labeling of nascent proteins. Puromycin is incorporated into nascent protein when the ribosome is at the stop codon. During this stage, the ribosomal A site remains opened for a brief period of time allowing puromycin, an aminoacyl-tRNA-like molecule, to be incorporated (Miyamoto-Sato et al., 2000). Results clearly show ER recruitment during phagocytosis as calnexin can readily be seen on the phagosome (Fig.5C zoom panel). Results also show the presence of puromycin-tagged proteins on the phagosome membrane and colocalize with calnexin. However, colocalisation of puromycin and calnexin was not complete throughout the cell. Indeed, the nuclear envelope never showed puromycin labeling. This is consistent with previous observations stating that little to no protein synthesis occurred in the internal nuclear envelope (Fig.5C, arrowhead). These observations confirmed that active translation was taking place near the phagosome.

Specific mRNAs are targeted to newly formed phagosomes. In order to determine if specific recruitment of nascent proteins was due to mRNA targeting, we performed an *in vitro* translation assay on freshly isolated phagosomes. As control, we compared the pattern of proteins encoded in phagosome-associated mRNAs to those found in a total membrane preparation (TM), which reflects mRNAs associated to the ER, and PNS, which reflect global mRNA population. After organelle isolation, *in vitro* translation assay was performed using rabbit reticulocyte lysate following protocols elaborated by the supplier (Promega). After the translation assay, organelles were re-isolated by centrifugation and then processed for electrophoresis. Results clearly show the presence of newly-synthesized

proteins associated to phagosomes after *in vitro* translation assay (Fig. 6A). The populations of mRNAs associated to phagosomes seem to differ greatly from those associated to other membranes (TM) or the rest of the cell (PNS), indicating that targeting to the phagosome was specific (Fig.6A). Also, the addition of total cell mRNA, prepared from J77.1 cells, minimally altered the protein pattern of newly-translated proteins associated to phagosomes, although more intense bands were observed (Fig. 6A “+RNA”). This indicated that the populations of mRNAs targeted to phagosomes were sufficient, at this stage of maturation, for the organelle’s function or environment and that non-specific binding of radiolabeled proteins did not occur. Furthermore, the association of mRNAs to phagosomes seemed to depend on cytosolic protein interactions with the organelle. Indeed degradation of proteins on the cytosolic side of the phagosome with pronase or proteinase K prior to *in vitro* translation assay completely abolished translation. The efficiency of proteinase K treatment was monitored, and results show that it was efficient in degrading cytosolic components of the phagosome, with the loss of the cytoplasmic domain of calnexin, G proteins α i-2 and β 2 subunits, while luminal proteins like calreticulin and LAMP1 were unaffected by the treatment (Fig. 6B). These results strongly suggest that the molecular machinery needed to link mRNAs to phagosome is protein based and present on the cytosolic side of the phagosome.

Comparing 2-D protein patterns of phagosome-associated mRNA-translated proteins to SILAC-identified protein patterns from *in vivo* labeling, we identified the presence of newly-translated β -actin, vimentin, HSP70, HSP60, tubulin, and G protein subunit alpha (Fig.6C) from targeted mRNAs. How these mRNAs are targeted to phagosomes is still unknown. Conversely, in depth proteomics analyses of highly enriched phagosome preparations have revealed the presence of many components of the mRNA targeting machinery. Among these proteins, ZBP1 and ZBP2 have been identified in isolated phagosomes from *Drosophila* S2 cells (Stuart et al., manuscript in preparation). Interestingly, these trans-acting factors (TAFs) have been shown to play a direct role in the

targeting of β -actin mRNA in neurons (Huttelmaier et al., 2005). It is possible that these proteins play a similar role in the macrophage. Indeed it has also been shown that β -actin mRNA was targeted to the leading edge of migrating cells and pseudopodia (Rafelski and Theriot, 2004). How the targeting of β -actin plays a role in phagocytosis is still unclear although work from several groups shows a direct correlation with β -actin mRNA degradation and inhibition of phagocytosis (Plaeger-Marshall et al., 1983; Greco et al., 1997). This was shown by studying HSV-infected macrophages and their capacity to internalize latex beads. Two independent groups have observed that a protein encoded in HSV genome, UL41 caused the selective degradation of a subset of mRNAs, including β -actin, leaving others unscathed (Esclatine et al., 2004; Barzilai et al., 2006). Also, work previously done by Plaeger-Marshall and colleagues had shown that HSV infected macrophages had a significantly reduced phagocytic index (Plaeger-Marshall et al., 1983). The correlation between selective degradation of β -actin mRNA and reduced phagocytosis suggests that local β -actin translation could be crucial for phagocytosis. Other viruses, like Rubella (RBV), may also use this mechanism during infection. Indeed, it has been shown that RBV-infected macrophages showed an aberrant actin cytoskeleton and were poor phagocytes (Bowden et al., 1987; Williams et al., 1993). However, the specific mechanism underlying this process is not well understood, but could imply the need for local accumulation of β -actin, achieved through neo-synthesis, in the vicinity of the phagocytic event. A shift in newly-synthesized actin isoforms from β to γ also suggests that one isoform could be needed for phagosomal formation and the other may play a more important role in the maturation process.

Other work done using rapamycin-treated macrophage showed a distinct decrease in the phagocytic index in these conditions (Ganesan et al., 2004). Interestingly, rapamycin is a specific inhibitor of mTOR, a regulator of mRNA translation and upstream activator of elongation factor 2 (Dufour et al., 2003; Wu et al., 2006). These two proteins have also been shown to play a crucial role in autophagy, a cellular process that leads to the

degradation of cellular components when the cell is under starvation or stress. The endoplasmic reticulum, which is recruited during phagocytosis, also plays a central role in the autophagic process (Gagnon et al., 2002; Mizushima et al., 2002; Noda et al., 2002). It is quite possible that proteins involved in mRNA targeting, and translation in autophagy are also involved in phagocytosis. This would not be surprising since many similarities exist between these two degradative mechanisms. Indeed, several proteins are shared between the two organelles with some of them found to be newly-synthesized on the phagosome (Table I). This is the case for HSC70 and HSP60, two proteins crucial in autophagy and antigen presentation. The presence of these newly-synthesized proteins, in conjunction with the phagosomal transmembrane protein LAMP2a, could allow the retranslocation of cytosolic peptide across the membrane to be loaded onto MHC class II molecules as it has been described in chaperone-mediated autophagy and antigen presentation (Majeski et al., 2004, Zhou et al., 2005).

In conclusion, the targeting of mRNAs to phagosomes had never been described previously. Nonetheless, the mechanisms governing this process are beginning to emerge in other cell types. It is not clear how such events play a role during phagosome formation or phagolysosome biogenesis, but they seem to be important due to the fact that inhibition of mRNA transport or degradation of some of these mRNAs directly affect the phagocytic process (Plaeger-Marshall et al., 1983; Greco et al., 1997; Ganesan et al., 2004). It is also possible that certain pathogens have evolved ways to use the phagosomal translation machinery in order to promote survival. Intracellular pathogens like *Brucella* and *Legionella* possess a type IV secretion apparatus normally used for the transfer of conjugal DNA (Molmeret et al., 2004; Roop et al 2004). It has been shown that effector proteins from both pathogens are found in the host's cytoplasm, but the route they take to get there is still the subject of debates. It could be possible that these pathogens use their secretion system to inject not the effectors, but mRNAs coding for these proteins, and that the phagosome's translation machinery is used to produce them. Evidence that *Brucella* and

Legionella virulence depends on the presence of enzymes linked to protein synthesis is consistent this hypothesis (Kohler et al., 2002).

Bibliography

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

Barzilai, A., Zivony-Elbom, I., Sarid, R., Noah, E., et Frenkel, N. (2006). The herpes simplex virus type 1 vhs-UL41 gene secures viral replication by temporarily evading apoptotic cellular response to infection: Vhs-UL41 activity might require interactions with elements of cellular mRNA degradation machinery. *J Virol* *80*, 505-513.

Blocker, A., Griffiths, G., Olivo, J. C., Hyman, A. A., et Severin, F. F. (1998). A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *J Cell Sci* *111 (Pt 3)*, 303-312.

Bowden, D. S., Pedersen, J. S., Toh, B. H., et Westaway, E. G. (1987). Distribution by immunofluorescence of viral products and actin-containing cytoskeletal filaments in rubella virus-infected cells. *Arch Virol* *92*, 211-219.

de Virgilio, M., Kitzmuller, C., Schwaiger, E., Klein, M., Kreibich, G., et Ivesa, N. E. (1999). Degradation of a short-lived glycoprotein from the lumen of the endoplasmic reticulum: the role of N-linked glycans and the unfolded protein response. *Mol Biol Cell* *10*, 4059-4073.

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

Dufour, E. M., Nandrot, E., Marchant, D., Van Den Berghe, L., Gadin, S., Issilame, M., Dufier, J. L., Marsac, C., Carper, D., Menasche, M., et Abitbol, M. (2003). Identification of

novel genes and altered signaling pathways in the retinal pigment epithelium during the Royal College of Surgeons rat retinal degeneration. *Neurobiol Dis* 14, 166-180.

Esclatine, A., Taddeo, B., et Roizman, B. (2004). The UL41 protein of herpes simplex virus mediates selective stabilization or degradation of cellular mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18165-18170.

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

Ganesan, L. P., Wei, G., Pengal, R. A., Moldovan, L., Moldovan, N., Ostrowski, M. C., et Tridandapani, S. (2004). The serine/threonine kinase Akt Promotes Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages through the activation of p70S6 kinase. *J Biol Chem* 279, 54416-54425.

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

Greco, A., Laurent, A. M., et Madjar, J. J. (1997). Repression of beta-actin synthesis and persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1 infection are under translational control. *Mol Gen Genet* 256, 320-327.

Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J., et Singer, R. H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438, 512-515.

- Jutras, I., et Desjardins, M. (2005). Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 511-527.
- Kindler, S., Wang, H., Richter, D., et Tiedge, H. (2005). RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 223-245.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., et Liautard, J. P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15711-15716.
- Lee, M. H., Min, M. K., Lee, Y. J., Jin, J. B., Shin, D. H., Kim, D. H., Lee, K. H., et Hwang, I. (2002). ADP-ribosylation factor 1 of *Arabidopsis* plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129, 1507-1520.
- Majeski, A. E., et Dice, J. F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2435-2444.
- Medrano, S., et Steward, O. (2001). Differential mRNA localization in astroglial cells in culture. *J Comp Neurol* 430, 56-71.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., et Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27, 421-429.
- Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L., et Kwaik, Y. A. (2004). Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* 6, 129-139.

- Noda, T., Suzuki, K., et Ohsumi, Y. (2002). Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol* 12, 231-235.
- Pimental, R. A., Julian, J., Gendler, S. J., et Carson, D. D. (1996). Synthesis and intracellular trafficking of Muc-1 and mucins by polarized mouse uterine epithelial cells. *J Biol Chem* 271, 28128-28137.
- Plaeger-Marshall, S., Wilson, L. A., et Smith, J. W. (1983). Alteration of rabbit alveolar and peritoneal macrophage function by herpes simplex virus. *Infect Immun* 41, 1376-1379.
- Rafelski, S. M., et Theriot, J. A. (2004). Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem* 73, 209-239.
- Roop, R. M., 2nd, Bellaire, B. H., Valderas, M. W., et Cardelli, J. A. (2004). Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. *Mol Microbiol* 52, 621-630.
- Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J. F., Meresse, S., Descoteaux, A., et Desjardins, M. (1999). Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* 1, 19-32.
- Scott, C. C., Botelho, R. J., et Grinstein, S. (2003). Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol* 193, 137-152.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 363-375.

Tirosh B, Furman MH, Tortorella D, Ploegh HL. (2003) Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J Biol Chem.* Feb 28;278(9):6664-72.

Wild K, Halic M, Sinning I, Beckmann R. (2004) SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol.* Nov;11(11):1049-53. Review.

Williams, L. L., Lew, H. M., Shannon, B. T., Singley, C. T., Davidorf, F. H., Jin, R., et Wolinsky, J. S. (1993). Phagocytosis of latex beads is defective in cultured human retinal pigment epithelial cells with persistent rubella virus infection. *Am J Pathol* 142, 451-461.

Wu, H., Yang, J. M., Jin, S., Zhang, H., et Hait, W. N. (2006). Elongation factor-2 kinase regulates autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 66, 3015-3023.

Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J. M., Hislop, A. D., Canaday, D. H., Brutkiewicz, R. R., et Blum, J. S. (2005). Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22, 571-581.

Figure 1. Newly-synthesized proteins are rapidly recruited to phagosomes

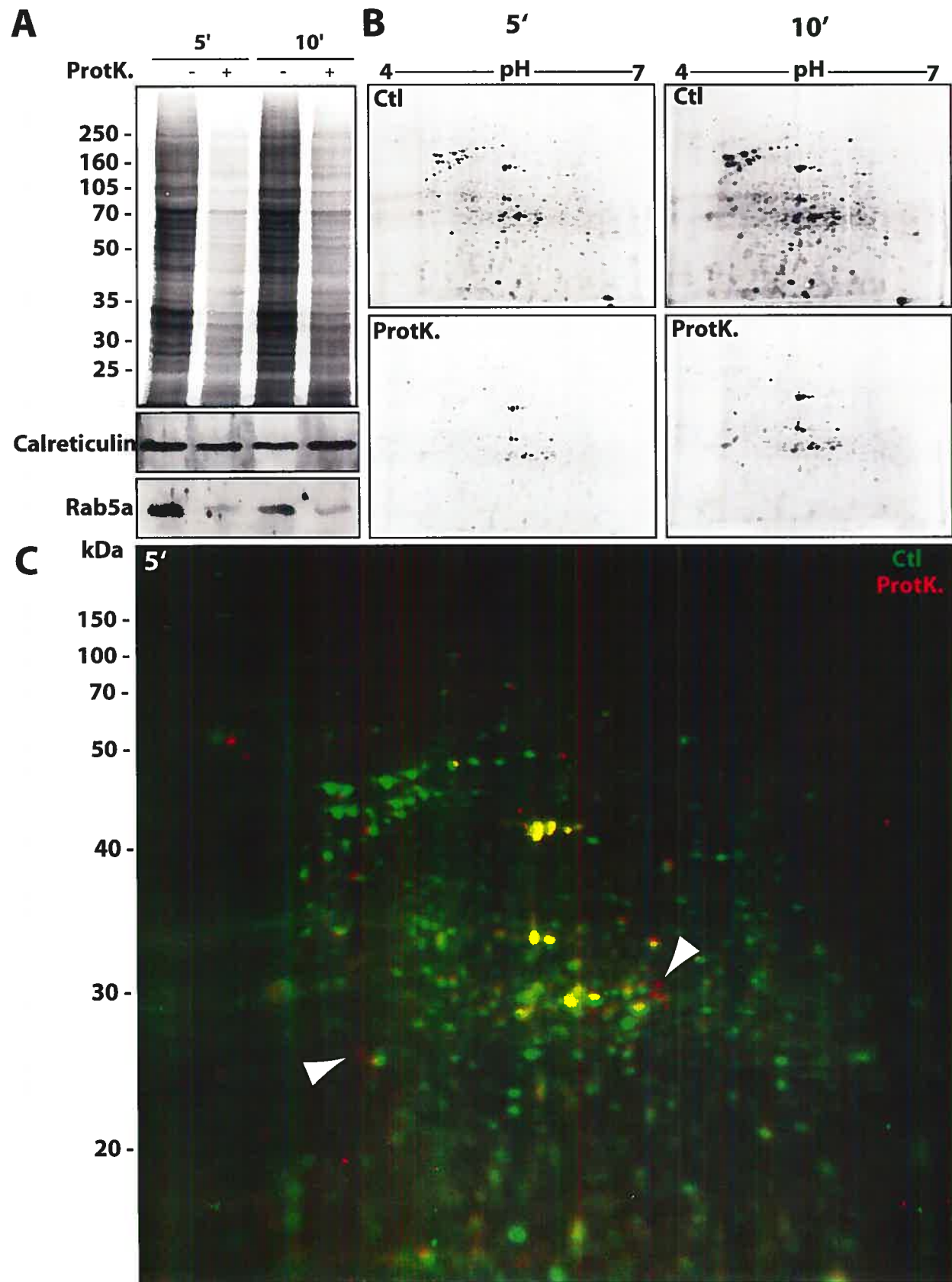


Figure 2. SILAC analysis reveals the identity of nascent proteins recruited to phagosomes**A** **Table I.** Newly synthesized proteins identified using SILAC.

Uniprot ID	Prot. name	Function	Leu-D3
P60710	Actin beta	Component of the cytoskeleton	yes
P63260	Actin gamma	Component of the cytoskeleton	yes
O70251	Ef- 1 beta	Exchange of GDP bound to EF-1-a to GTP	
Q7TN89	E-Ras	Unknown, cytosolic membrane-associated	yes
P08752	G alpha(i)2	Cytosolic, signal transduction	
P62880	G beta 2	Cytosolic, signal transduction	
P97855	G3BP-1	Effector of stress granule assembly	
Q8BG05	hnRpA3	mRNA transport, binds to A2RE	
P63017	HSC70	Cytosolic chaperone	yes
P63038	HSP60	Cytosolic chaperone	
Q62137	Jak-3	Non-receptor type tyrosine kinase	yes
Q80X36	Myosin IE	Molecular motor involved in phagocytosis	yes
P35278	Rab5a	GTPase, involved in membrane fusion	
Q8K2K6	Rip	Role in vesicle docking and mRNA trafficking	
Q8BL96	Synaptogamin	Unknown, may be involved in exocytosis	yes
Q58L65	Synembrin	Heterotrimeric G protein GEF	
Q9ERD7	Tubulin	The major constituent of microtubules.	
Q60992	Vav2	Signaling, downstream of G proteins	yes
Q5FWJ3	Vimentin	Intermediate filament	yes
O13872	VPS28	Unknown, vesicle protein sorting	yes

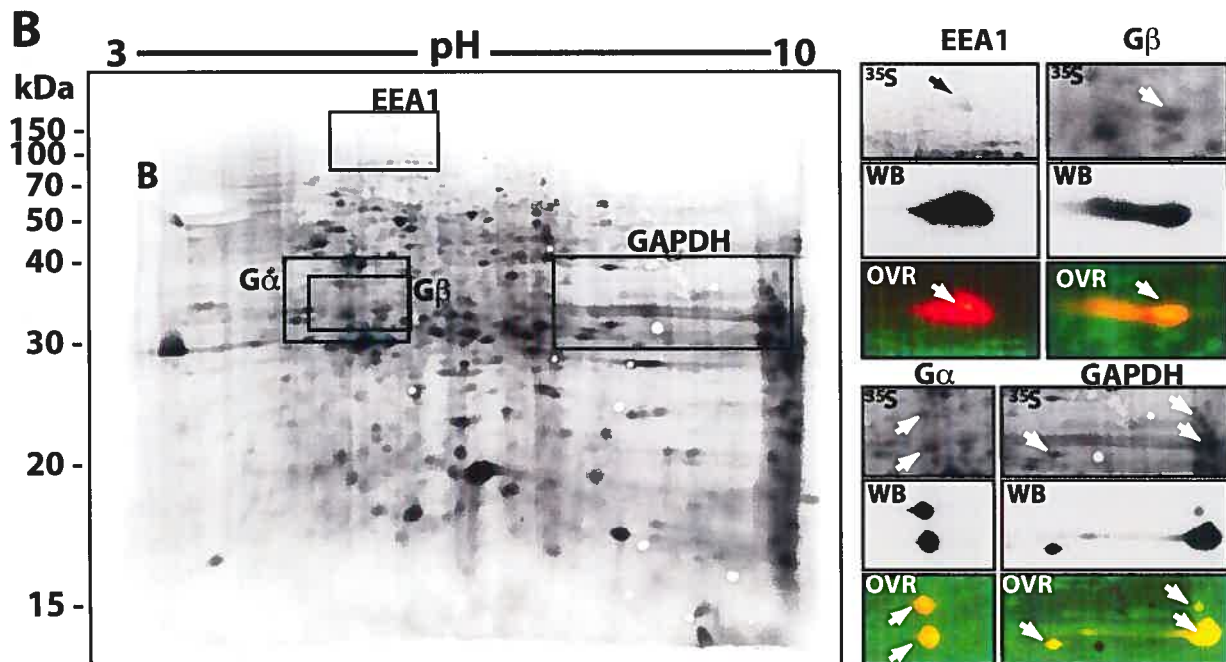


Figure 3. Recruitment of nascent proteins to phagosomes is an ER/Golgi independent mechanism

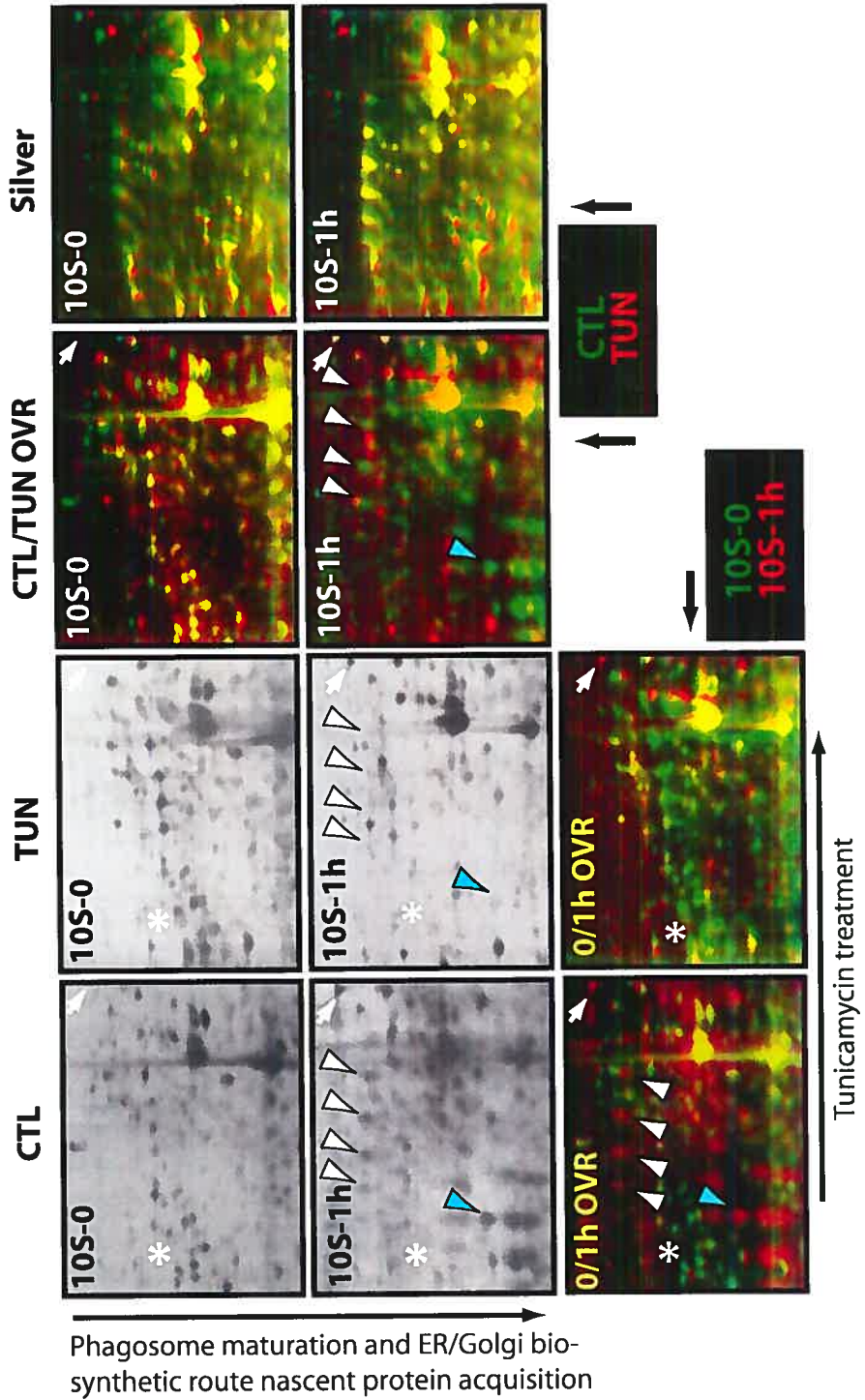


Figure 4. Exclusive targeting of newly-synthesized proteins to phagosomes is modulated during phagolysosome biogenesis

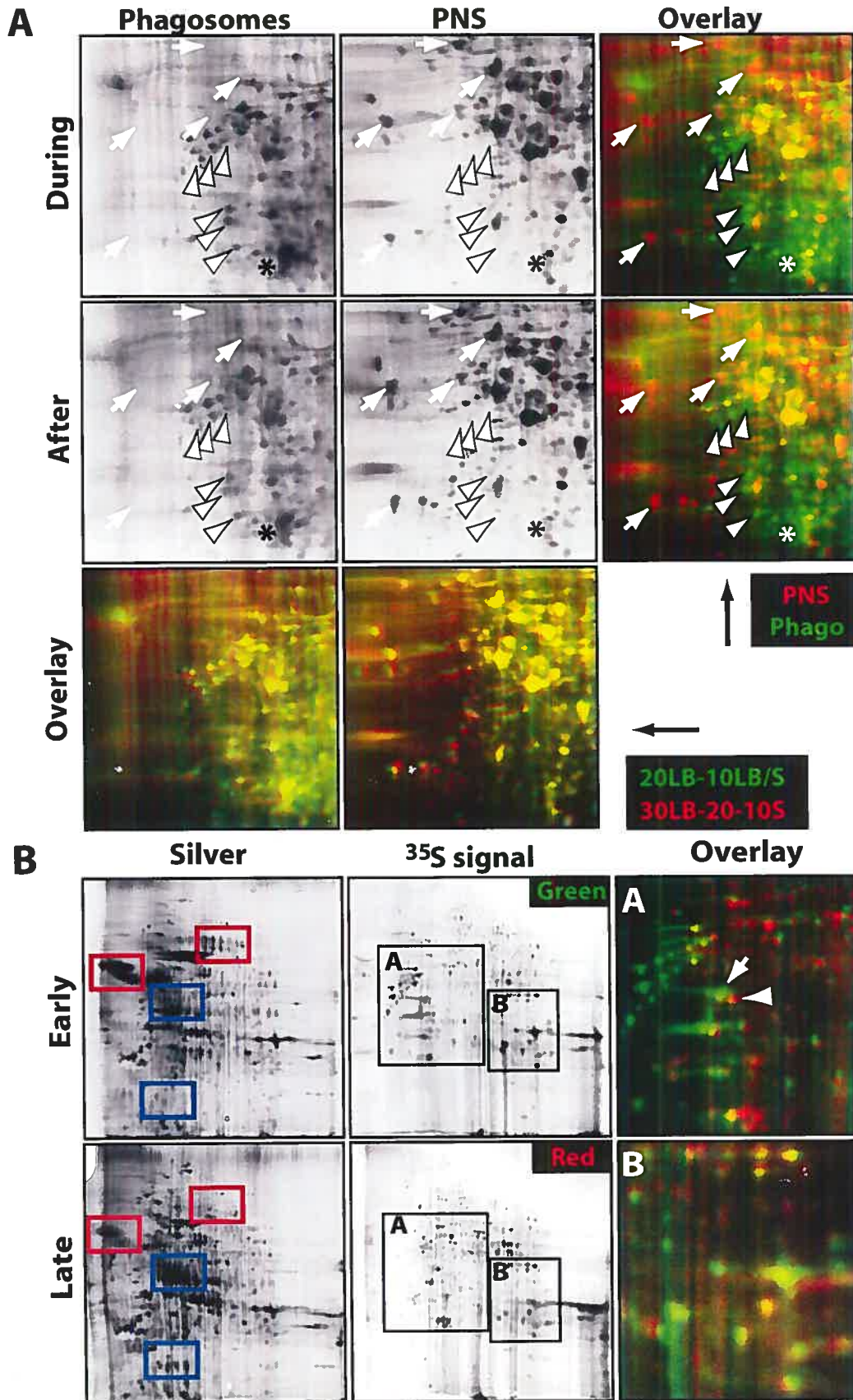


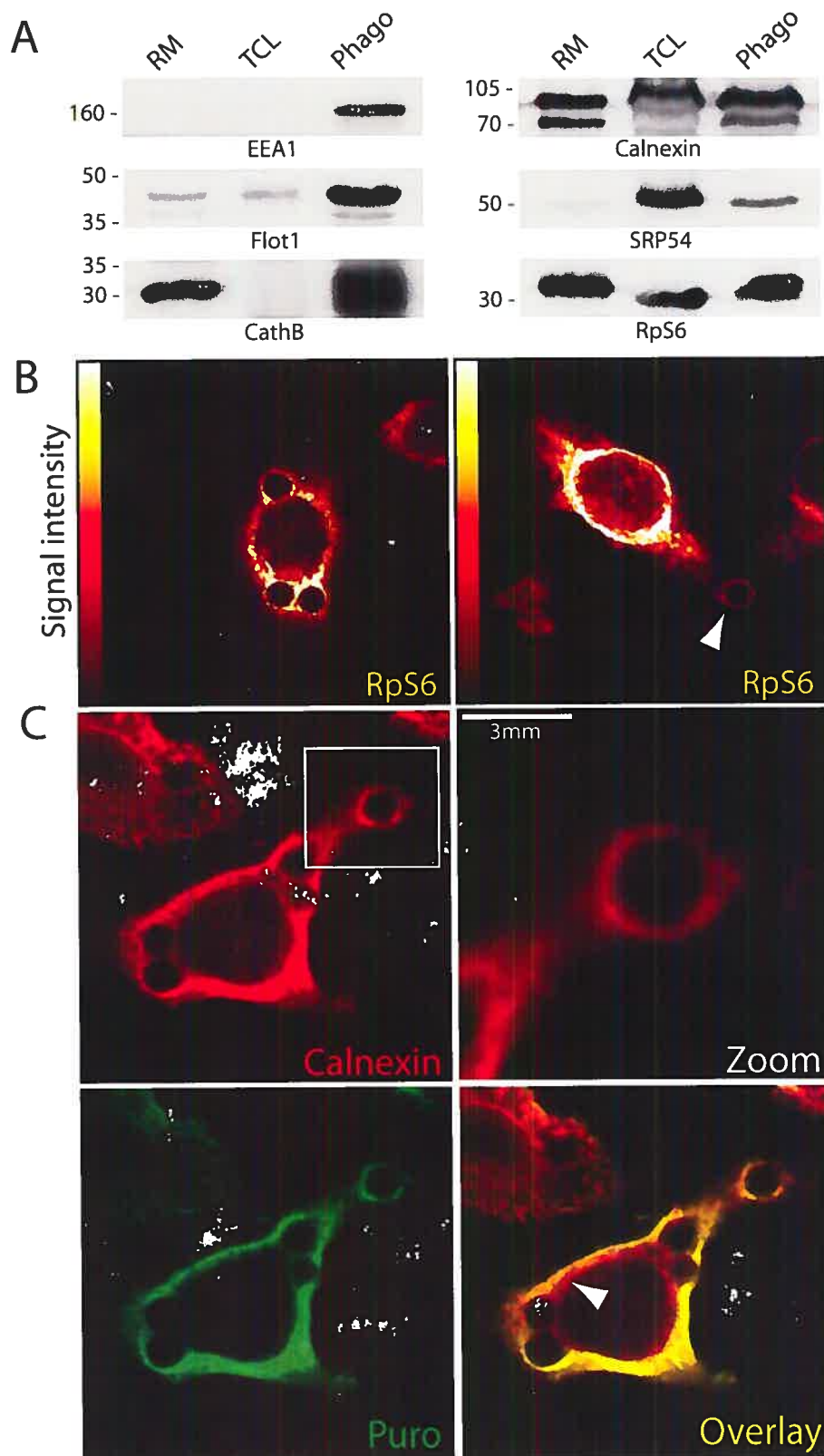
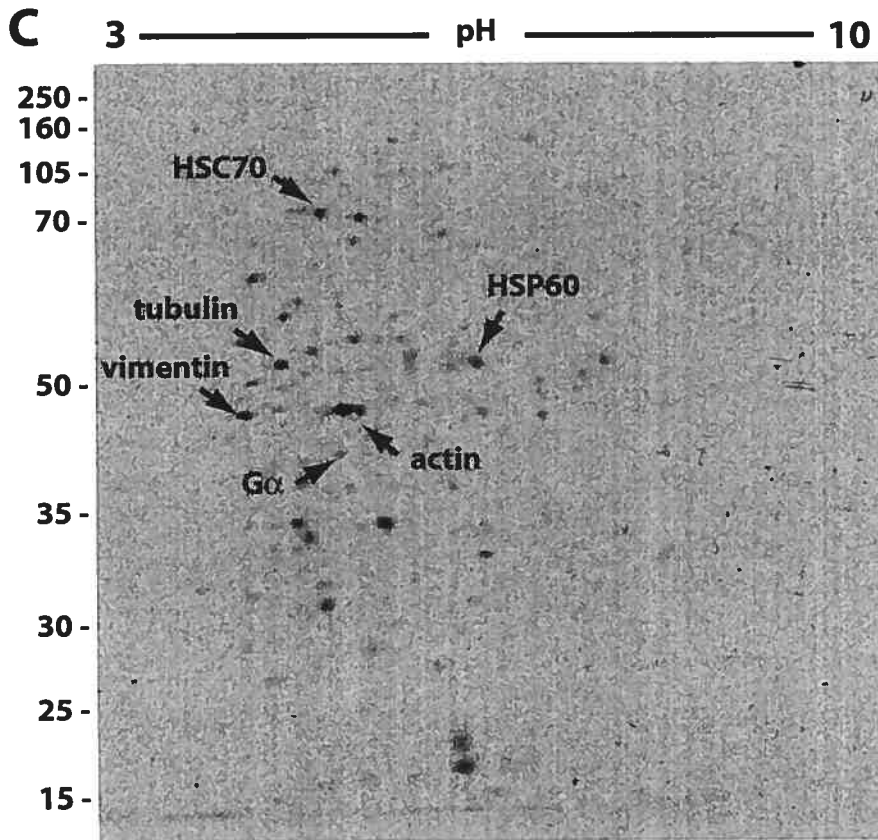
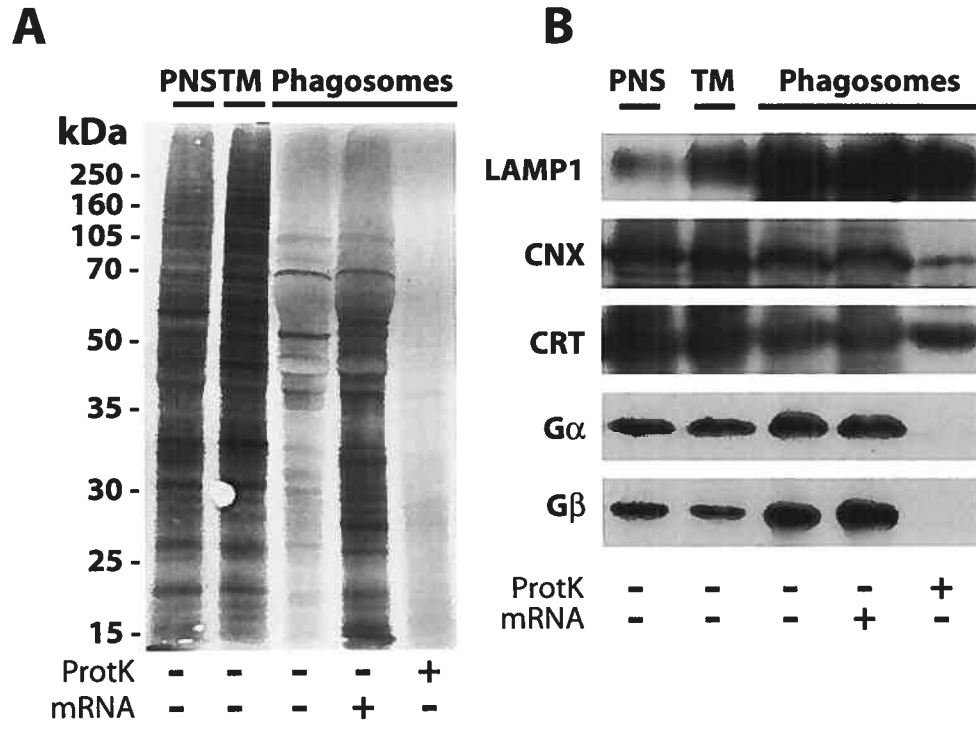
Figure 5. Active mRNA translation machinery is found on the phagosome

Figure 6. Specific mRNAs are targeted to newly formed phagosomes.



Supplemental figure 1. Experimental design

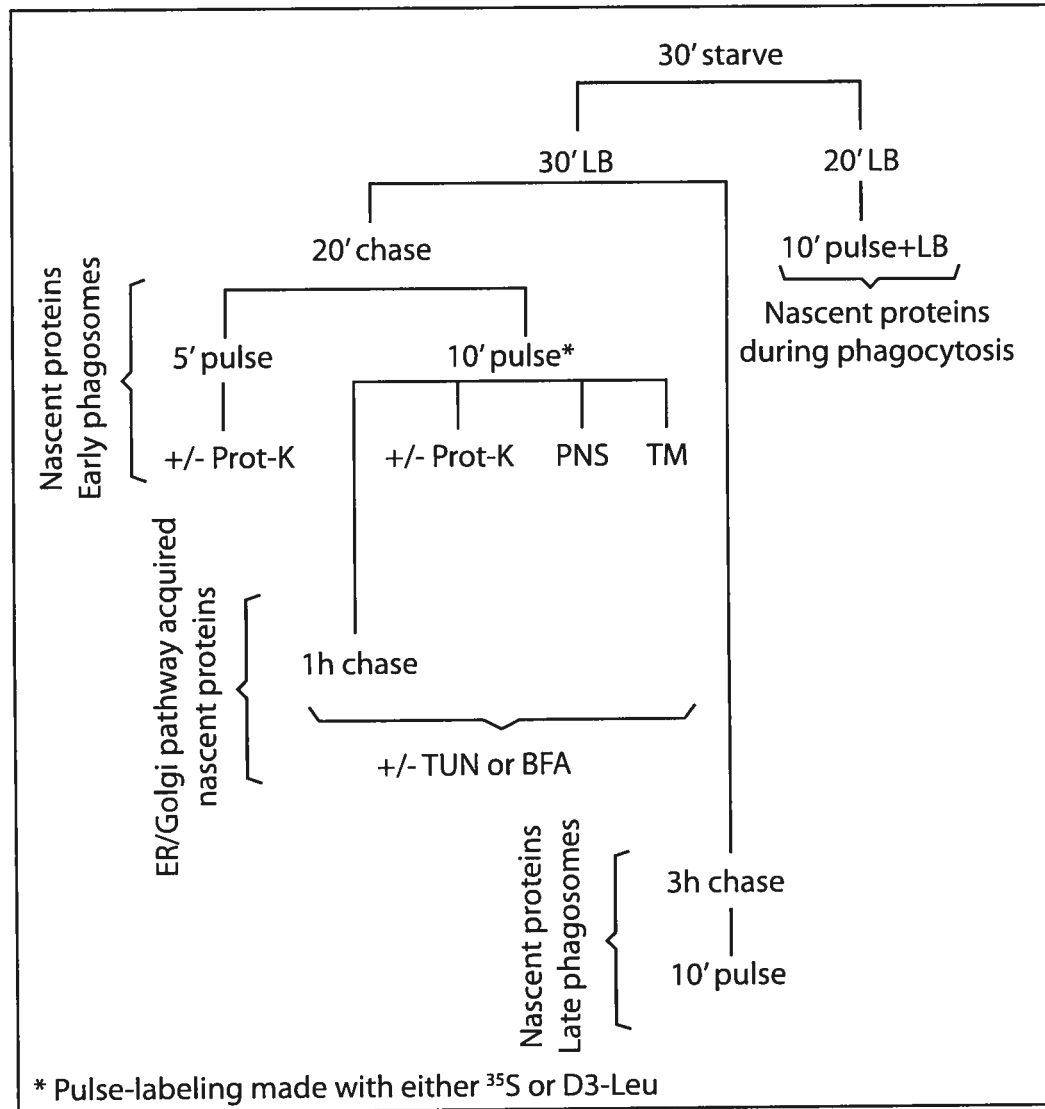


Figure 1. Newly synthesized proteins are rapidly recruited to the phagosome. Two pulse labeling experiments (5' and 10') were developed to analyze the presence of nascent proteins on early phagosome (see materials and methods and Sup.1). After pulse-labeling, cells were washed and processed for phagosome isolation. Isolated organelles were treated, or not, with proteinase K in order to assess the topology of the newly synthesized proteins. Finally, proteins were prepared for electrophoresis. (A) Proteins were separated using SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel. After transfer, the nitrocellulose membrane containing the radioactive proteins was left to dry, and then exposed onto radiographic film at -80°C . After appropriate exposure, membranes were blotted with α -calreticulin (1:500 rabbit), α -Rab5a (1:500 rabbit) and appropriate secondary antibody coupled to HRP used in conjuncture with chemiluminescence protocol to visualize the proteins. (B) Proteins were prepared as in A, but separated by 2-DE. They were first separated according to they charge onto immobiline dry-strips (pH4-7), and then according to their molecular weight in a precast 12% polyacrylamide gel. Gels were then silver-stained using the highly sensitive protocol and dried for radiographic film exposure. (C) Pseudocolor overlay of gels in B showing newly synthesized proteins sensitive (Green), resistant (Yellow) or partially resistant (Red indicated by arrowheads) to proteinase K treatment.

Figure 2. SILAC analysis reveals the identity of nascent proteins recruited to phagosomes. (A) Parallel pulse-labeling experiments were performed with either ^{35}S -met or D3-leu (see materials and methods and Sup.1). After which, gels were resolved by 2-D and a pick list of radiolabeled spots were determined by gel alignment using Image Master 2-D Elite. Mass-Spec analysis was performed with an added modification the PTM database in order to identify the presence of heavy leucine. A list of proteins identified with SILAC analysis is shown. (B) Phagosomal pulse-labeling was performed as in A. After 2-D gel electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane, dried and processed for radiographic film exposure to reveal radiolabeled proteins. This pattern was analyzed using Image Master 2-D Elite and compared with our database in

order to confirm the identity of the newly-synthesized proteins identified by SILAC. Western blot analysis was performed on the same membrane to validate the identity. Antibodies were used at the following concentration: α -EEA1 (1:500, mouse), α -G protein β (1:750, rabbit), α -G protein α (1:750, mouse), and α -GAPDH (1:750, mouse). Appropriate HRP-conjugated secondary antibodies were used to visualize the bands (1:3000).

Figure 3. Recruitment of newly-synthesized proteins to phagosome is an ER/Golgi independent mechanism. To determine the source of nascent proteins recruited to the phagosome, we performed a short pulse-labeling shortly after latex bead intake and we either isolated the phagosomes immediately (10S-0), or allowed them to mature for an additional 1 hour to allow targeting of newly-translated proteins coming from the ER/Golgi biosynthetic route (10S-1h) (also, see Sup.1). Pulse-labeling was performed in the presence or the absence of the glycosylation inhibitor Tunicamycin (5 μ g/ml) throughout the experiment to inhibit the ER/Golgi route (TUN). Proteins from isolated phagosomes were resolved by 2-DE and the resulting gels were silver-stained, dried and were then prepared for radiographic film exposure. Pseudocolor overlay was performed in order to help determine the similarities and differences between conditions. Each gel was attributed a color (Red or Green) depending on the axis of analysis (see black boxes). The inhibition of the acquisition of newly-translated proteins by TUN treatment is indicated by arrowheads (white and blue). Proteins dynamics of newly-translated proteins during phagosome maturation was not altered by TUN treatment, and proteins that are lost during phagolysosome biogenesis are indicated by asterisk while proteins that are acquired are indicated by arrow.

Figure 4. Exclusive targeting of newly-synthesized proteins to phagosomes is modulated during phagolysosome biogenesis. (A) Phagosomal pulse labeling experiment was performed to allow discrimination of nascent protein recruitment during

(During) or shortly after phagocytosis (After) (also see Sup.1). Post-nuclear supernatant were prepared in the same conditions as the phagosomes for comparative analyses. Proteins were resolved by 2-DE and gels were processed as described earlier. Pseudocolor overlay was performed in order to visualize the similarities and differences between the conditions of analysis. Each condition was attributed a color (Red or Green) depending on the axis of analysis (see black boxes). Nascent proteins only found in the PNS are indicated by arrows, while proteins exclusively targeted to phagosomes are indicated by arrowheads. Some proteins were found in both compartments but were present in higher amounts in phagosomes. One example is indicated by asterisk. **(B)** Phagosomal pulse-labeling was performed on early phagosomes (Early) or phagolysosomes (Late) (also see Sup.1). Proteins from isolated phagosomes were processed as in A. Silver-stained gels were compared to our database to determine proper maturation of the phagosomes during the experiment. Proteins previously shown to be lost during phagolysosome biogenesis are found in red inset, and the ones previously shown to be acquired are seen in the blue inset. Overlaid insets were performed as in A and show distinct proteins synthesized on young or late phagosomes (Insets and Overlay panels A and B). β -actin is indicated by arrow and γ -actin by arrowhead.

Figure 5. Active mRNA translation machinery is found on the phagosome. **(A)** Cells were incubated in the presence of latex beads (3 μ m) for 40 minutes and resulting phagosomes were isolated following previously described protocol. Phagosomal proteins and similar amounts of total cell lysate (TCL) and rough microsomal proteins (RM) were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Western blot analysis was performed using antibodies labeling for endocytic organelles (EEA1, Flot-1 and Cathepsin B), endoplasmic reticulum (Calnexin), and mRNA translation machinery (SRP54, RpS6). **(B)** Phagocytosis assay was performed as in A. After which, cells were fixed with PFA% and processed for immunofluorescence using α -RpS6 (1:200, rabbit) to determine the presence of active translation. Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit was

used to visualize the presence of RpS6. Signal intensity is visualized using a black-red-white gradient. Arrowhead points to a phagosome far from the cell body distinctively labeled with RpS6. (C) Phagocytosis assay was performed as in A except that Puromycin (1 μ g/ml) was added to the medium during the last 20 minutes of internalization in order to label newly-translated proteins. After which, cells were fixed with PFA% and processed for immunofluorescence using a specific monoclonal antibody that recognizes puromycin, and α -calnexin (1:500, rabbit). Alexa-568-conjugated goat anti-rabbit and Alexa-488-conjugated goat anti-mouse were used to visualize the presence of calnexin and RpS6 respectively. A phagosome displaying strong labeling for calnexin was enlarged (Zoom inset and panel). Arrowhead is pointing to the nuclear envelope where calnexin labeling, but not puromycin, can be observed.

Figure 6. Specific mRNAs are targeted to newly formed phagosomes. Phagosomes were formed by the internalization of latex beads (1 μ m) for thirty minutes then isolated using a previously described protocol, but all solutions were DEPC-treated. Isolated phagosomes were treated or not with proteinase-K prior to translation assay. *In vitro* protein translation was carried out using rabbit reticulocyte lysate with or without additional mRNA isolated from J774 macrophages. Reaction was performed at 30⁰C or on ice as negative control (not shown). A PNS and total membrane preparation (TM) were prepared fresh from the same cells just prior to *in vitro* translation and act as positive controls and as a reference for either total cellular or total membrane associated mRNAs respectively. After translation assay, organelles were re-isolated and washed by centrifugation. Proteins were prepared for electrophoresis. (A) Proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and processed for film exposure. (B) After film exposure, membranes prepared in A were blotted using various antibodies: LAMP1 (1:1000, rat mAb), Calnexin (1:500, rabbit), Calreticulin (1:500), G α (1:750) and G β (1:500). Appropriate HRP-conjugated secondary antibodies were used visualize the bands. (C) Phagosome isolation and *in vitro* translation were performed as in A. Proteins

were resolved by 2-DE and radiolabeled proteins were exposed to film. After exposure, radiolabeled protein pattern was analyzed and compared to *in vivo* radiolabeled protein pattern with Image Master 2-D Elite, and positive matches were identified. Names of the proteins identified by gel alignment are indicated on gel.

Supplemental figure 1. Experimental design. Overall experimental scheme is shown. See materials and methods for complete methodology.

Chapitre III : Discussion

La phagocytose, processus clé dans l'élaboration d'une réponse immunitaire innée, est un mécanisme permettant à certaines cellules d'internaliser des particules de grosses tailles. Son rôle dans l'immunité englobe l'élimination de pathogènes présents chez l'hôte ainsi que l'apprêtement d'antigènes qui seront présentés aux cellules effectrices de la réponse immunitaire acquise. L'organelle issue de ce processus cellulaire, le phagosome, accomplit ces tâches à l'aide de machineries moléculaires qu'il acquiert lors de son processus de maturation. Cependant, certains parasites ont évolué et ont développé des mécanismes menant à la subversion de la voie normale de maturation du phagosome, leur permettant ainsi de survivre et de se répliquer. Toutefois, les mécanismes employés par ces parasites ainsi que les cibles affectées par ces derniers demeurent en grande partie inconnus. Afin d'avoir une vue plus compréhensive de la complexité protéique constituant le phagosome, une analyse systématique de cet organelle par protéomique a été effectuée et a permis l'élaboration de plusieurs nouveaux concepts concernant la phagocytose. Notamment, la présence de protéines associées au reticulum endoplasmique et à la traduction d'ARN messagers ont permis d'émettre l'hypothèse que le phagosome était une organelle beaucoup plus complexe que ce qu'il avait été démontré dans des travaux antérieurs (Desjardins et al., 1994; Garin et al., 2001).

La protéomique des organelles : une boule de cristal à petite échelle.

La protéomique est un outil de recherche qui est apparu dans les laboratoires il y a de ça plusieurs années. Cependant, la technologie ne s'est véritablement développée que vers la fin des années 90. Elle se veut comme la suite logique de la génomique, science qui se résume à la recherche visant à cartographier le code génétique retrouvé chez divers organismes. Elle permet l'analyse, la caractérisation et l'identification du patrimoine génétique d'un individu. Une analyse génomique de grande envergure sur le génome humain a permis à un groupe de chercheurs de cartographier la totalité des gènes qui le

composent (IHGSC, 2001). Ces résultats ont permis d'établir, à l'aide de logiciels pouvant reconnaître le patron génétique des cadres de lectures ouverts « open reading frame » (ORF), que le génome humain comportait près de 40 000 gènes. Cependant, il a été estimé que la diversité protéique dénombrait plus de 100 000 membres (Dhingra et al., 2005). Une telle différence pourrait être expliquée par les réarrangements génétiques lors de la transcription ou bien à l'épissage alternatif de différents exons pour une même molécule d'ARN messenger (Dhingra et al., 2005). Toutefois, aucune donnée tangible de corrélation ne peut expliquer avec certitude l'énorme différence que l'on retrouve entre le nombre de gènes et le nombre de protéines.

De plus, les différences physiologiques que l'on retrouve entre différents types cellulaires ne résident pas au niveau de leur patrimoine génétique, mais plutôt au niveau des protéines qui sont produites. Un sous-domaine de la génomique a vu jour afin de pouvoir répondre à cette réalité. La transcriptomique permet l'analyse et l'identification du patrimoine d'ARN messagers présents à un moment donné chez un type de cellule. Ceci a permis l'étude de la régulation transcriptionnelle et l'élaboration du patrimoine génétique exprimé de manière exclusive par une grande variété de cellules. Cependant, ce type d'analyse ne permet pas l'étude des modifications post-traductionnelles que subissent les protéines naissantes, ni du contrôle de la traduction des ARN messagers par la cellule. Il a d'ailleurs été démontré que le nombre de copies d'un ARN messenger donné n'était pas nécessairement représentatif de la quantité de protéines produites par ce dernier (Dhingra et al., 2005). De ce côté, la protéomique offre une fenêtre privilégiée pour l'observation de cette finalité transcriptionnelle. C'est dans cette optique que la protéomique a pris de l'ampleur au sein des unités de recherches à travers le monde.

Les premières études faisant appel à des analyses à grandes échelles par protéomique de cellules entières ou même de tissus n'ont pas connu beaucoup de succès. Les outils disponibles n'avaient pas la capacité d'entreprendre une telle analyse. Ceci est largement dû au fait qu'une cellule typique possède à tout moment une diversité moyenne

de 10000 à 15000 protéines. Aussi, la représentation relative de chacune d'elles peut varier d'un facteur de 1000, voire 10000 (Dhingra et al., 2005). Cette réalité rendait peu probable la tâche d'identifier les protéines retrouvées en faible quantité. Ce sont d'ailleurs ce type de protéines qui ont le plus de chances de différer d'un type cellulaire à l'autre vu que la majorité de protéines retrouvées en grande quantité sont celles qui permettent le maintien de la morphologie cellulaire et des fonctions retrouvées chez toutes les cellules. On peut nommer parmi ces représentants les protéines du cytosquelette, de la mitochondrie et du noyau.

C'est grâce à la rencontre entre la protéomique et la biologie cellulaire que cette technologie a pu prendre toute son importance (Patterson et al., 2003; Brunet et al., 2003; Taylor 2003). Le fait de simplifier l'échantillonnage de départ a permis d'aller chercher une sensibilité accrue quant au pouvoir de résolution et de détection de la diversité protéique. Ce type de méthode a été utilisée pour la première fois afin d'analyser un échantillon contenant une préparation hautement enrichie de protéines phagosomales (Garin et al., 2001). Cette analyse a d'ailleurs permis aux chercheurs d'établir de nouvelles pistes quant à la nature du phagosome et a servi de pierre angulaire pour l'élaboration d'une méthodologie éprouvée. Depuis cet ouvrage, plusieurs unités de recherche ont entrepris et complété la caractérisation protéomique de plusieurs organelles cellulaires, ce qui a permis à plusieurs d'avoir une compréhension plus détaillée des relations pouvant exister entre ces différents compartiments cellulaires (Brunet et al., 2003, Yates et al., 2005). D'ailleurs, plusieurs concepts de la biologie cellulaire ont été revus depuis que ces analyses ont vu le jour.

De l'identification par protéomique de composantes du RE à la démonstration d'un nouveau concept pour la phagocytose.

Le RE : une composante intégrale du phagosome.

L'identification de protéines appartenant au RE dans les préparations hautement enrichies de phagosomes fut surprenante, mais non sans antécédent. Des travaux menés par l'équipe de Gerisch ont permis de démontrer un recrutement du RE au niveau de la coupe phagocytaire chez *Dictyostelium* à l'aide de chimères fluorescentes de deux marqueurs du RE, calnexine et de calréticuline (Muller-Taubenberger et al., 2001). Ces deux protéines figuraient d'ailleurs parmi celles identifiées par protéomique comme appartenant au RE (Garin et al., 2001). Les auteurs ont de plus obtenu une diminution marquée de l'index de phagocytose lors d'expériences impliquant des mutants négatifs de calnexine et/ou de calréticuline, ce qui suggérait que ces chaperonnes étaient impliquées dans ce processus. Cependant, les auteurs n'ont pu démontrer une interaction directe entre le RE et le phagosome pouvant expliquer la présence de ces protéines dans les préparations de phagosomes (Muller-Taubenberger et al., 2001; Garin et al., 2001). Des travaux effectués dans les années 70 ont démontré la présence de membranes, où se produisait un niveau appréciable de néosynthèse, impliquées dans la formation du phagosome (Vicker et al., 1977). Ceci a permis auteurs de suggérer la participation d'une organelle de néosynthèse lors de la phagocytose, mais n'ont jamais formellement identifié le RE comme étant la source de cette membrane.

Afin de démontrer que le RE faisait partie intégrale du phagosome, une série d'expériences a été effectuée. La première avait pour but de démontrer l'enrichissement des marqueurs du RE dans le phagosome lorsque comparés au reste de la cellule. Les résultats démontrent clairement que les marqueurs de RE calnexine, calréticuline et sec61 α sont enrichis dans les phagosomes lorsque comparés aux quantités relatives retrouvées dans un lysat cellulaire total ou dans un surnageant post-nucléaire (Gagnon et al., 2002, Figure

la gauche). Un contaminant n'aurait pas pu se retrouver de manière enrichie par rapport à sa concentration initiale dans la cellule. De plus, l'isolation de phagosomes par ultracentrifugation différentielle sur gradient discontinu de sucrose permet se fait à l'interface retrouvé entre les coussins de 10% et 25% de sucrose. L'isolation de microsomes, vésicules issues de la fragmentation du RE, sont normalement recueillis à d'autres interfaces (Lavoie et al., 1996). Aussi, des observations faites en microscopie électronique semblaient démontrer que les préparations enrichies en phagosomes étaient absentes de membranes ressemblant à des microsomes (Desjardins et al., 1994). Un marquage à la « horse radish peroxydase » (HRP) a clairement établi que les membranes « contaminantes » provenaient soit d'organelles endocytaires co-purifiées avec le phagosome due à une forte interaction, soit de membranes phagosomales fragmentées lors des différentes étapes de manipulation (Desjardins et al., 1994). Un essai de digestion protéolytique des domaines cytoplasmiques des protéines du phagosome a démontré que la topologie des protéines calnexine et calréticuline suivent celle normalement retrouvée dans le RE (Gagnon et al., 2002, Figure 1a droite). Si des membranes du RE avaient contaminé les préparations de phagosomes via des interactions avec le cytosquelette ou bien se soient retrouvées à l'intérieur de la lumière du phagosome par un processus de dégradation, les résultats de l'expérience à la pronase auraient été entièrement différents. Le traitement à la pronase aurait causé la disparition complète des protéines dans le cas d'interactions non-spécifiques et aucun effet observable si les protéines avaient été dans la lumière du phagosome, protégées de la dégradation cytosolique.

Des expériences d'immunomarquage en microscopie électronique, suivant une technique bien établie de pré-enrobage (Roy et al., 2000), ont permis de situer calnexine sur les membranes phagosomales tout en étant absente sur des membranes de nature inconnue aussi présentes dans l'échantillon (Gagnon et al., Figure 1b). Des travaux effectués par d'autres groupes ont aussi permis de localiser d'autres composantes du RE sur le phagosome de cette même manière (Guermonprez et al., 2003). Ce type d'expérience a aussi permis de mettre en évidence la présence de membranes de différentes épaisseurs

constituant les phagosomes, chacune étant exclusivement marquée d'anticorps différents (Gagnon et al., 2002, Figure 1c). Les membranes marquées par les anticorps dirigés contre le domaine cytoplasmique de calnexine avaient une morphologie plus mince et suivaient les observations relevées dans la littérature décrivant les membranes du RE connues comme étant dépourvues de cholestérol. Par contre, les membranes marquées de l'anticorps dirigé contre la partie cytoplasmique de LAMP1 étaient plus épaisses et suivaient aussi les descriptions faites sur ce type de membranes riches en cholestérol. Cette disparité dans la morphologie des membranes constituant le phagosome n'avait jusque-là jamais été relevée et nous amène à nous questionner davantage sur le modèle de la mosaïque fluide décrivant la libre diffusion des protéines et lipides. Cependant, ces expériences ne représentent qu'un moment précoce lors de la maturation phagosomale et il serait possible qu'un mélange plus homogène des lipides constituant la membrane du phagosome soit observé à des temps plus tardifs.

Outre le fait que les marqueurs du RE se retrouvent de manière enrichie dans le phagosome, leur présence est modulée lors de la maturation phagosomale. Or si leur présence avait été le résultat d'une contamination on devrait s'attendre à retrouver cette même contamination à n'importe quel temps d'isolation. Mais ceci n'est pas le cas et des analyses biochimiques et protéomiques effectuées sur des phagosomes isolés à différents degrés de maturité démontrent clairement que non seulement une modulation de la présence de ces marqueurs (Gagnon et al., 2002, Figure 2a), mais aussi la dégradation du domaine luminal de calnexine lors de la biogenèse du phagolysosome (Gagnon et al., 2002, Figure 2b et c). Il a de plus été rapporté que d'autres protéines du RE connaissent de pareilles modulations lors de la maturation de phagosomes de cellules dendritiques (Guermonprez et al., 2003; Ackerman et al., 2003). Ces résultats réaffirment que la présence des marqueurs du RE n'est pas issue d'une contamination d'échantillons, mais qu'ils sont plutôt des composantes intégrales du phagosome.

Le recrutement du RE dans la phagocytose : un mécanisme régulé et spécifique.

Les cascades de signalisation régulant la phagocytose sont hautement complexes et font appel à plusieurs intermédiaires. Parmi ces régulateurs, on retrouve la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Elle permet le contrôle des phosphoinositides lors de la modulation des réarrangements cytosquelettiques. L'activation de la PI3K se fait dans les étapes précoces de la phagocytose (Aderem et Underhill, 1999; Scott et al., 2003). On peut d'ailleurs la retrouver associée à la coupe phagocytaire lors de l'engouffrement de la particule. L'inhibition de la PI3K diminue grandement l'index phagocytaire de particules environnant le un micron, mais bloque entièrement l'entrée de particules ayant une taille supérieure (Gagnon et al., 2002, Figure 3B). Il se pourrait que l'inhibition de la PI3K cause un retard dans le processus de phagocytose, car elle ne semble pas intervenir au niveau de l'initiation du remodelage du cytosquelette d'actine. En effet, des pseudopodes sont présents à la surface de cellules ayant été traitées avec divers inhibiteurs de la PI3K (Gagnon et al., 2002, Figure 3A). Ceci a mené à l'analyse des particules prisonnières de l'emprise de ces pseudopodes et a permis de démontrer la présence de membranes du RE directement recrutées sous la coupe phagocytaire. Certaines images semblent même démontrer une fusion entre le RE et la membrane plasmique sous la particule (Gagnon et al., 2002, Figure 3C, C, E). Ces observations ressemblent fortement à celles décrites par l'équipe de Gerish, où l'observation du recrutement du RE à la coupe phagocytaire a été réalisée à l'aide de chimères fluorescentes (Muller-Taubenberger, 2001). De plus, l'analyse de phagosomes précoces isolés à partir de cellules traitées à la 3-Méthyladénine (3-MA), un inhibiteur de la PI3K, ne présente aucune différences évidentes lorsque comparé aux phagosomes isolés à partir de cellules contrôles (Gagnon et al., 2002, Figure 3F).

Cependant, des analyses effectuées sur des populations de phagosomes isolés à divers degrés de maturité révèlent un effet remarquable de la PI3K. En effet, les phagosomes isolés de cellules traitées à la 3-MA sont demeurés au stade précoce de maturité, n'acquérant point les caractéristiques de phagolysosomes. On peut observer un

manque flagrant de cathepsines lorsque l'analyse se fait par gel 2-D (Gagnon et al., résultats non publiés). L'inhibition de la maturation phagosomale causée par l'abolition de l'activité de la PI3K pourrait faire intervenir la petite GTPase Rab5. Tel que mentionné dans l'introduction, la PI3K sert à la génération de PI₃P à la membrane du phagosome. Ceci permet le recrutement d'EEA1, une SNARE, qui recrute alors Rab5. La présence de Rab5 à la membrane phagosomale engendre subséquemment des événements de fusion avec les organelles de la voie endocytaire, les endosomes précoces (Lawe et al., 2002; Duclos et al., 2003). La PI3K semble donc agir comme catalyseur, permettant la phagocytose de particule à une vitesse accélérée et une maturation adéquate du phagosome. L'inhibition de la PI3K semble causer un ralentissement des événements permettant l'acquisition de Rab5, ce qui a permis de maintenir les phagosomes au stade précoce de maturation. La PI3K semble aussi agir au niveau de la fusion du RE avec la membrane plasmique. Elle pourrait venir en ligne de compte à ce niveau en permettant au RE de modifier son environnement phospholipidique afin de pouvoir fusionner avec la membrane plasmique. Des interactions entre le RE et la membrane plasmique ont déjà été rapportées par un groupe étudiant le dynamisme des phosphoinositides suite à l'activation de la phospholipase C. Ces chercheurs ont remarqué une « resynthèse » des phosphoinositols suite à l'activation de la phospholipase suivant une voie n'impliquant pas la diffusion cytosolique ni le transport vésiculaire. Ils ont plutôt proposé une voie où des contacts directs entre le RE et la membrane plasmique, suite à des interactions spécifiques entre des protéines de chaque organelle, comme cause du renouvellement de phosphoinositides (Whatmore et al., 1999).

Des analyses protéomiques approfondies sur le phagosome ont permis d'identifier Sec22, une SNARE spécifique du RE (Brunet et al., en préparation). La présence de cette protéine n'a pu qu'être observée chez des phagosomes précoces, ce qui suppose un rôle potentiel dans les événements précoces de formation ou de maturation du phagosome. De manière non reliée aux travaux mentionnés jusqu'à présent, une analyse compréhensive des interactions spécifiques entre v-SNAREs et t-SNAREs a été menée par l'équipe de

Rothman (McNew et al., 2000). Les résultats se basaient sur un système de fusion *in vitro* où des liposomes incorporaient une variété de v-SNARE et étaient incubés en présence de liposomes ayant incorporés Sso1/Sec9, une t-SNARE spécifique de la membrane plasmique. Les auteurs ont remarqué, hors de leurs attentes, qu'il existait une forte interaction entre Sec22 et Sso1/Sec9, ce qui promouvait la coalescence des membranes liposomiques des deux compartiments (McNew et al., 2000). Le rôle de Sec22, dont l'homologue mammifère est l'ERS24, a été mis en évidence à l'aide de molécules capables d'interférer avec les fonctions de cette protéine. Lors de ces expériences les auteurs ont remarqué une faible diminution de l'index de phagocytose lorsque celle-ci impliquait des particules inférieures ou égales à 1 micron, tandis que l'abolition des fonctions d'ERS24 bloquait la totalité de l'internalisation de particules de plus grosses tailles (Becker et al 2005). Ceci pourrait laisser sous-entendre un lien entre la PI3K et Sec22/ERS24, vu de la similarité des effets apportés sur la phagocytose lors de leur inhibition. En effet, des événements de fusion impliquant la PI3K, des protéines Rabs et des SNAREs ont largement été observés (Lawe et al., 2002). Cependant, les GTPases ou les GEF permettant la fusion entre le RE et la membrane plasmique restent à déterminer. Il existe toutefois plusieurs candidats potentiels. Une grande quantité de protéines de type Rab identifiées par protéomique sont associées aux phagosomes, dont plusieurs d'entre elles sont normalement retrouvées dans le RE (Garin et al., 2001; Brunet et al., résultats non publiés). De plus, l'identification par protéomique d'un nouveau facteur d'ADP ribosylation, ARF6-like, laisse la possibilité qu'il pourrait être impliquée dans ce processus (Duclos et al., résultats non-publiés). Plusieurs membres de cette famille de protéines sont connus d'être impliqués au niveau du transport et de la fusion membranaire de vésicules sécrétoires et endocytaires (Kawasaki et al., 2005).

Les résultats publiés par deux études indépendantes démontrent que l'interaction entre le phagosome, suite à sa formation, et le RE n'est pas continue. L'observation d'une diminution de certains marqueurs de RE dans les préparations de phagosomes isolés renforce cette idée (Gagnon et al., 2002; Guermonprez et al., 2003). La modification de

fusogénicité entre ces deux organelles pourrait impliquer l'acidification du phagosome. Il a longtemps été démontré que le niveau du pH luminal d'une organelle pouvait influencer ces capacités fusogéniques. Ceci a été particulièrement étudié chez l'appareil de Golgi où on retrouve un gradient de pH diminuant le long des citernes allant du *cis* au *trans*. De plus, l'abolition de la fonction des pompes à protons V-ATPasiques retrouvées aux phagosomes, à l'aide de la Bafilomycine A1, a permis de maintenir une association avec le RE (Gagnon et al., 2002, Figure 4A et B). Le mécanisme d'action engendré par la Bafilomycine A1 n'est pas très bien compris. La littérature stipule que cette drogue se lie à la composante de 100kDa de la sous-unité V_0 , ce qui cause la dissociation de la sous-unité V_1 (Yokoyama, 1994; Zhang et al., 1994). Le phagosome resterait alors à un niveau d'acidité similaire à celui de la membrane plasmique, ou du RE, et pourrait permettre de maintenir la machinerie moléculaire promouvant ce type de fusion. Cependant, avec les progrès faits dans la compréhension des événements de fusion, un autre rôle potentiel pour la pompe à proton émerge. Mis à part la possibilité que l'acidification engendrée par les pompes V-ATPasiques contrôle la fusogénicité entre phagosomes et RE, les propriétés intrinsèques de la sous-unité V_0 pourraient à elles seules permettre le contrôle de la fusion. Il a été proposé que cette sous-unité puisse initier la fusion entre deux organelles en formant un pore précurseur à l'aide de ses segments transmembranaires (Peters et al., 2001). Elle pourrait donc réguler la capacité fusogénique du phagosome en acquérant la sous-unité V_1 qui aurait pour effet d'inhiber la formation du pore précurseur, causant un blocage au niveau de l'interaction avec le RE. L'addition de la Bafilomycine, qui cause la dissociation de la sous-unité V_1 pourrait avoir comme effet de maintenir sous forme active le pore de fusion formé par V_0 ou pourrait inciter la formation de nouveaux pores de fusion.

Le recrutement du RE lors de la formation du phagosome : un phénomène répandu.

La démonstration du recrutement du RE à la membrane plasmique lors de l'internalisation de billes de latex pourrait-être perçue comme artéfactuel en soit, dû au fait qu'il soit non représentatif. Dans un contexte physiologique, l'internalisation de particules

inertes comme des billes de latex est peu probable et pourrait engendrer un processus unique en son genre. Afin de démontrer le recrutement du RE lors de la phagocytose dans un contexte physiologique, les particules internalisées furent remplacées par des globules rouges, des bactéries (*Salmonella typhimurium*) ou des parasites protozoaires (*Leishmania donovani*). Cependant, l'isolation de phagosomes contenant ces particules, afin de procéder à des analyses biochimiques ou protéomiques pour démontrer la présence du RE, s'avère ardue et donc d'autres moyens ont dû être employés. D'abord, un marquage cytochimique de la glucose-6-phosphatase (G6P) de cellules ayant internalisées des billes de latex a permis de démontrer la validité de cette technique pour révéler la présence du RE. Ces expériences ont démontré la présence de cette enzyme chez le phagosome alors que le compartiment était en formation et que sa membrane était en continuité avec la membrane plasmique (Gagnon et al., Figure 5C). Jusque là, des expériences faites en immunofluorescence n'avaient permis que d'émettre des hypothèses sur un tel phénomène due à la piètre résolution des membranes au microscope photonique (Gagnon et al., 2002, Figure 4A). Les observations faites en cytochimie ont permis de démontrer la présence de la G6P dans la lumière du phagosomes alors même que ce dernier ne soit pas entièrement formé (Gagnon et al., 2002, Figure 5C). Ces observations ont aussi confirmé la nature des membranes qui semblaient fusionner avec la membrane plasmique sous la coupe phagocytaire lors de l'inhibition de la PI3K (Gagnon et al., 2002, Figure 3C,D,E) et fourni des explications quant à la présence de calnexine et d'autres marqueurs du RE dans le phagosome à des temps très courts (Gagnon et al., 2002, Figure 2B). Ensembles, ces résultats présentent hors de tout doute le recrutement du RE à la coupe phagocytaire afin de participer à la formation du phagosome.

Une analyse détaillée de l'infection du macrophage par le parasite intracellulaire *Leishmania donovani* a permis de révéler plusieurs aspects de la phagocytose de ce microbe. Tel que décrit dans la littérature, le parasite entre dans la cellule par le corps en premier et ce, même s'il se déplace grâce à l'effet de traction de son flagelle. Par la suite, le parasite débute son entrée dans la cellule par un mécanisme qui n'implique pas la

croissance des pseudopodes pour l'englober (Gagnon et al., 2002, Figure 7A). Les résultats présentent plutôt que le parasite entre dans la cellule par glissement (Gagnon et al., 2002, Figure 7D). Un marquage par la G6P révèle que le RE fusionne avec la membrane plasmique sous la coupe phagocytaire (Gagnon et al., 2002, Figure 6B) et que le parasite pénètre dans une membrane formée de RE (Gagnon et al., 2002, Figure 6A). Le phagosome, complètement formé, est composé de membranes du RE et possède des marqueurs de cette organelle. Le marquage évident de la G6P dans la lumière du phagosome témoigne de ce fait. La spécificité de ce type de marquage est très discriminatoire. On peut d'ailleurs observer la présence d'un précipité dense aux électrons, résultat de l'activité enzymatique de la G6P, que dans la membrane nucléaire, le RE et le phagosome. Une absence totale de ce marquage est observé pour les mitochondries, les endosomes et lysosomes (Gagnon et al., 2002, Figure 5, 6, 7). L'utilisation de membranes provenant du RE pour la phagocytose de *Leishmania* n'avait jusqu'alors jamais été démontrée. Par contre, des études ultérieures faites à partir de l'isolation de phagosomes contenant ces parasites ont révélé la présence des mêmes marqueurs du RE (Kima et Dunn, 2005).

La phagocytose médiée par le RE semble être une voie d'entrée privilégiée par le macrophage dû au fait qu'une grande variété de particules d'origine physiologique, telles les globules rouges et les microbes analysés, semblent employer ce mécanisme d'entrée. Il a aussi été observé pour la phagocytose d'une variété de particules chez les DC (Guermonpez et al., 2003; Ackerman et al., 2003). Si ce mécanisme est prévalant chez les macrophages et observé chez les DC, il n'en est pas de même pour les neutrophiles. En effet, lorsque les expériences entreprises chez le macrophage ont été reprises chez le neutrophile, aucun marquage à la G6P a pu être observé dans la lumière des phagosomes (Gagnon et al., 2002, Figure 7B). En fait, le processus entier de phagocytose semblait différer d'un type cellulaire à l'autre. Chez le macrophage, le parasite *Leishmania* semble entrer dans la cellule par glissement dans le RE, laissant initialement des pseudopodes de petites tailles derrière jusqu'à ce que ceux-ci finissent par englober le flagelle d'une

membrane contenant aussi la G-6-Pase (figure 7a et résultats non-publiés). Par contre, chez le neutrophile, le parasite semble se faire englober de pseudopodes géants dès son contact avec le phagocyte (Gagnon et al., 2002, Figure 7C). De plus, la dégradation du parasite semble se faire à un rythme beaucoup plus rapide chez le neutrophile que le macrophage (Gagnon et al., 2002, Figure 7B). Ceci pourrait être expliqué par le fait que le neutrophile possède la capacité de mobiliser plusieurs types de granules de sécrétion vers la coupe phagocytaire afin de tuer le parasite rapidement. Les neutrophiles ont même la capacité de lyser les parasites à l'extérieur, avant son internalisation (Suzaki et al., 1997).

Une autre raison pouvant expliquer l'absence d'un marquage de la G6P au niveau du phagosome viendrait du fait que les neutrophiles possèdent une faible quantité de RE (Gagnon et al., 2002). En effet, des observations faites au ME révèlent un RE fragmentaire et peu présent dans le cytoplasme de ces phagocytes (Gagnon et al., 2002 Figure 7B; Azakami et Eguchi, 1993). Toutefois, de récentes études révèlent que le RE pourrait être recruté lors de la formation de phagosomes contenant ces parasites et qu'il existerait une dichotomie d'entrée médiée par les opsonines présentes dans le sérum et certains facteurs de surface du parasite (Morisse-Gueirard et al., article soumis). Ce type de résultats laisse envisager la présence de récepteurs spécifiques impliqués dans le recrutement du RE lors de la phagocytose chez le neutrophile. L'activation de ces récepteurs à la surface de ces phagocytes par leurs ligands, normalement masqués par la présence d'opsonines sériques, pourrait engendrer une voie de signalisation particulière permettant ainsi le recrutement exclusif du RE pour la phagocytose. Le neutrophile pourrait s'avérer être un modèle très intéressant pour l'étude de ce type de récepteurs à cause de la dichotomie apparente des voies d'entrées et des phagosomes résultants (Morisse-Gueirard et al., article soumis). L'utilisation du neutrophile comme modèle cellulaire afin d'étudier la signalisation menant au recrutement du RE est d'autant plus attirante du fait que chez le macrophage, le recrutement du RE ne semble pas relever d'une signalisation particulière. Les résultats présentés par Gagnon et al., semblent plutôt indiquer un mécanisme où l'internalisation de

particules via les récepteurs Fc γ et CR3 mène au recrutement du RE. Toutefois, plusieurs autres récepteurs impliqués dans l'internalisation de ces parasites n'ont pas été étudiés.

Finalement, la démonstration du recrutement du RE lors de la formation du phagosome pourrait expliquer le phénotype observé chez certains pathogènes intracellulaires. Les parasites *Legionella* et *Brucella* infectent les cellules suite à l'établissement d'une niche répliquative morphologiquement similaire au RE. Selon le modèle établi des mécanismes de survie, celui-ci diverge des mécanismes utilisés par les autres parasites intracellulaires qui semblent plutôt influencer le niveau de maturation du phagosome de résidence (Figure 4). Cependant, avec la démonstration que le RE est recruté lors de la formation du phagosome, le modèle devient linéaire et présente maintenant clairement que les parasites agissent tous sur le niveau de maturation du phagosome résident, où *Legionella* et *Brucella* interviennent aux stades les plus précoces de maturité (Figure 8). Ainsi, ils sont capables de maintenir les propriétés « ER-like » du phago(ER)ome précoce et promouvoir une interaction prolongée avec le RE causant ainsi une accumulation de cette organelle dans l'environnement immédiat du phagosome (Tilney et al., 2001; Pizarro-Cerda et al., 1998). Le fait que des particules inertes telles des billes de latex, des globules rouges, des parasites (*Leishmania* et *S. typhimurium*) se retrouvent tous dans un phagosome précoce constitué de composantes du RE et ce, même si les parasites étudiés n'ont pas de mécanismes de survie impliquant le RE, témoigne de l'étendue de l'utilisation de cette organelle dans la phagocytose chez le macrophage.

Le RE dans la phagocytose : la clé passe-partout?

La démonstration du recrutement du réticulum endoplasmique à la coupe phagocytaire et sa fusion avec la membrane plasmique pour de former le phagosome a permis de revoir plusieurs concepts établis du rôle de la phagocytose dans le maintien de l'homéostasie et du développement d'une réponse immunitaire efficace. L'implication

recrutement du RE dans les différents aspects de la phagocytose sera discutée dans les sections qui suivent,.

Le macrophage, un gros appétit avec un estomac limité.

Le macrophage est un phagocyte capable d'internaliser une quantité impressionnante de matériel. Des recherches entreprises par le groupe de Joel Swanson ont démontré qu'il était capable d'internaliser une particule de latex une fois et demie sa propre taille (Cannon et Swanson, 1992). La phagocytose de particules de cette taille doit nécessairement faire appel à une source alterne de membrane, autre que la membrane plasmique, afin d'assurer l'intégrité de la cellule. Il a d'ailleurs été démontré, à l'aide de la mesure du potentiel électro-physiologique de la surface cellulaire, qu'une insertion de membranes se produisait lors de la phagocytose et que la surface totale de la cellule augmentait suite à l'internalisation de particules (Hackman et al., 1998; Holevinsky et Nelson, 1998). Malgré qu'il ait été démontré que des endosomes de recyclage et des lysosomes pouvaient être recrutés à la membrane plasmique lors de ce processus, l'importance et la quantité de membranes fournies n'ont jamais pu être établies (Cannon et Swanson, 1992; Desjardins et al., 2005; Braun et al., 2006). Le RE représente près de 40% de la totalité des membranes disponibles chez le macrophage et pourrait être un bon candidat comme source de membrane en cas de manque. D'ailleurs, les résultats publiés par l'équipe de Rothman présente que l'utilisation du RE étaient accentuée lors de la phagocytose de particules de grosses tailles lorsque comparée à celle de particules de tailles inférieures à 1 micron (Becker et al., 2005). Ceci reflète aussi les résultats publiés par Cannon et Swanson qui démontrent que la capacité maximale de phagocytose du macrophage ne dépend pas de la quantité de récepteurs à la surface cellulaire, mais plutôt de la disponibilité de sources de membranes alternatives (Cannon et al., 1992). Il serait possible que la cellule ressente le besoin de recruter des endomembranes lors de la phagocytose excessive et que cette banque potentielle soit, elle aussi, limitée à une quantité définie afin d'assurer un bon fonctionnement cellulaire. Étant donné que les conditions

avec lesquelles nous formons les phagosomes impliquent l'internalisation d'une quantité maximale de billes, les résultats générés impliquent à coût sûr le recrutement d'endomembranes afin de satisfaire l'appétit gargantuesque du macrophage.

Cependant, l'utilisation d'endosomes et de lysosomes ne semble pas être fortement impliquée lors de la formation du phagosome chez le macrophage. En effet, des analyses biochimiques d'organelles nouvellement formées ne démontrent pas la présence de marqueurs caractéristiques de ces vésicules (Desjardins et al., 1994; Duclos et al., 2001; Gagnon et al., 2002). On retrouve plutôt des marqueurs de la membrane plasmique et du RE dans les populations de phagosome les plus précoces que nous sommes capables d'isoler. L'isolation de coupes phagocytaires semblait aussi démontrer la présence de marqueurs du RE (Gagnon et Desjardins, résultats non publiés). Le recrutement du RE pour la phagocytose pourrait uniquement relever d'un besoin de membranes afin de former le phagosome et de minimiser l'utilisation de la membrane plasmique à cette fin. D'un point de vue biologique, il serait avantageux pour une cellule de maintenir sa membrane plasmique intacte dû au fait que les récepteurs présents à sa surface lui permettent de communiquer avec son environnement extérieur.

L'Erythrophagocytose : contrôle de la toxicité de l'hème.

L'erythrophagocytose est un processus permettant l'élimination de la circulation de globules rouges sénescents ou endommagés. C'est une étape clé dans le maintien de l'homéostasie et est majoritairement entreprise par les macrophages (Bratosin et al., 1998). Cependant, la phagocytose d'érythrocytes pourrait être dommageable pour le phagocyte à cause de la toxicité de l'hème que contient ce type de cellules. L'hème contenu dans l'hémoglobine est toxique lorsqu'il se trouve lié au fer, une propriété normalement bénéfique chez le globule rouge et qui lui permet de stocker l'oxygène capturé dans les poumons (Bratosin et al., 1998). Afin de contrer les effets toxiques de l'hème, les macrophages possèdent deux enzymes: l'hème oxygénase 1 et 2 (HO-1, HO-2) (Gemsal et al.,

1974; Gemsal et al., 1975). Toutefois, ces enzymes ont été localisées dans le RE par plusieurs groupes (Beaumont et Cannone-Hergaux, 2005). Les modes d'actions, bien que connus au niveau moléculaire, restent à ce jour un mystère quant à la relation de l'hème contenue dans le phagosome lors de l'érythrophagocytose et les enzymes HO-1/2 présentes dans le RE. Or, avec la démonstration du recrutement du RE lors de la formation du phagosome, un mécanisme possible permettant l'acquisition de ces enzymes se dessine. Des travaux entrepris par l'équipe de Cannone-Hergaux tentent justement de mettre en valeur l'utilité du recrutement du RE dans ce phénomène. Il est à mentionner que, comme nous, ils ont démontré l'utilisation du RE lors de la formation de phagosomes contenant des globules rouges à l'aide de plusieurs techniques (Cannone-Hergaux, et al., manuscrit en préparation). Il a par ailleurs été démontré que certains pathogènes, lorsqu'internalisés, modifiaient l'activité de la HO-1 afin de prévenir une flambée oxydative, ce qui leur permet de survivre (Clark et al., 2003; Pham et al., 2005). Comment ces pathogènes réussissent à influencer ces enzymes demeure un mystère, mais leur présence au niveau du phagosome suite à la fusion du RE pourrait rendre ces dernières accessibles aux effecteurs microbiens.

La présentation croisée d'antigènes exogènes.

Depuis les années 70, un nouveau modèle de présentation antigénique tente de percer. Plusieurs études ont démontré la présentation d'antigènes exogènes sur des CMH de classe I, normalement utilisés pour la présentation d'antigènes endogènes. Ce type de présentation croisée a suscité beaucoup d'intérêts dans la communauté scientifique. Trois études menées de manières parallèles ont fait le point sur l'utilité du RE dans ce processus jusqu'à ce jour mal compris. Le nouveau modèle émergent de ces découvertes présente les composantes du RE recrutées au phagosomes comme étant responsables de l'apprêtement des peptides antigéniques (Houde et al., 2003; Guermonprez et al., 2003, Ackerman et al., 2003). Il avait d'ailleurs été démontré que l'inhibition chimique des hydrolases phagosomales interférait peu avec la présentation d'antigènes par le CMH de classe I, mais que des inhibiteurs spécifiques au protéasome et la synthèse protéique

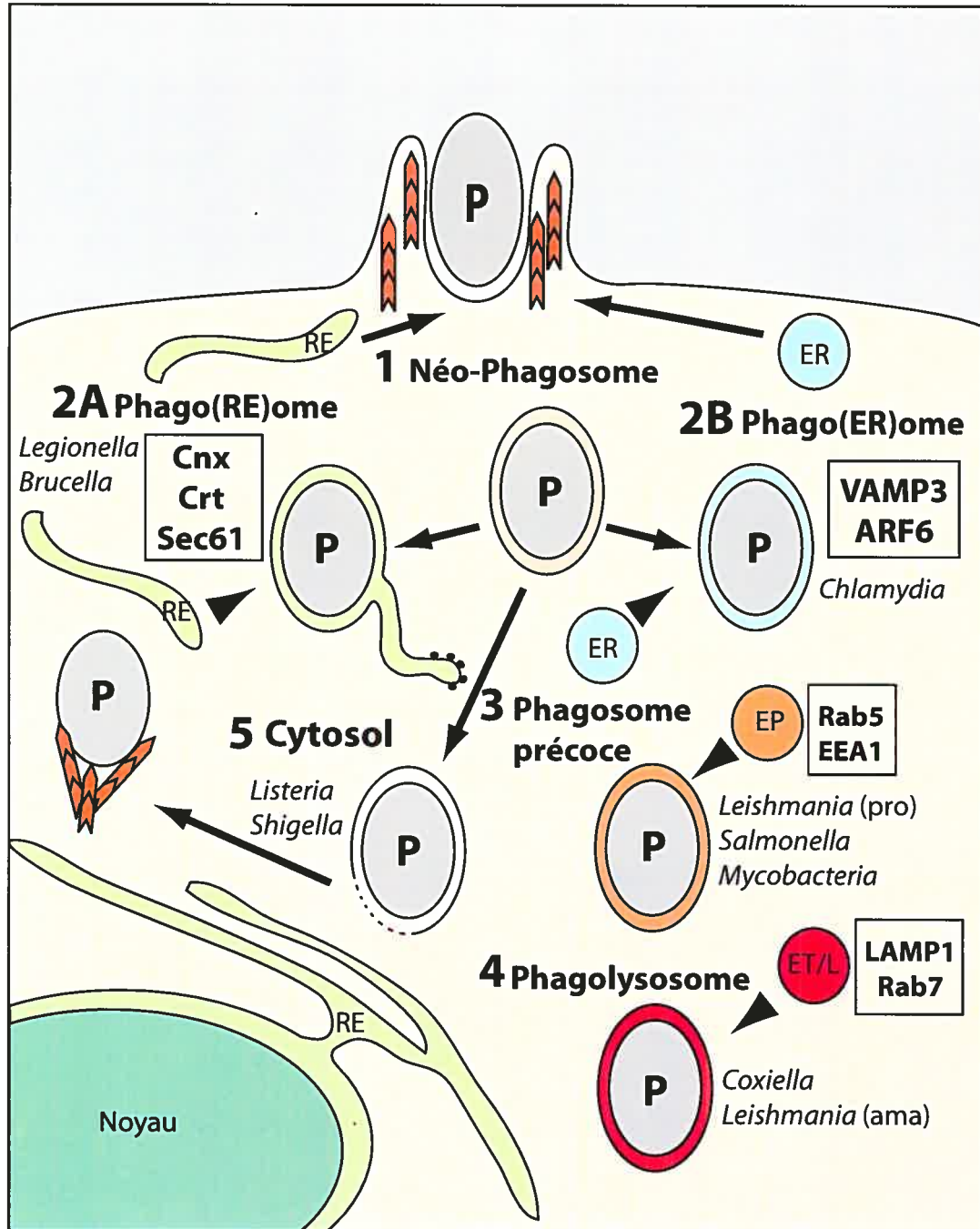
réduisaient de façon marquée ce processus (Kovacsovic-Bankowski et al., 1995; Oh et al., 1997). Ce nouveau modèle explique aussi de manière plus plausible la finalité de la présentation croisée. L'équipe de Ken Rock avait proposé un modèle où les antigènes exogènes, issus de la dégradation phagosomale, étaient transportés vers le cytoplasme selon un mécanisme inconnu et qu'ils diffusaient dans le cytoplasme jusqu'à ce qu'ils atteignent le RE quelque part dans la cellule (Figure 7A). Ce modèle s'avérerait peu probable à cause de la présence d'une myriade d'aminopeptidases présentes dans cet environnement, ce qui aurait eu comme effet de rendre ce mécanisme d'action peu efficace (Houde et al., 2003).

Or, avec l'identification des composantes du RE, les peptides pourraient être rétrotransloqués vers le cytoplasme par le canal Sec61, un complexe protéique du RE identifié chez le phagosome et normalement employé pour la translocation de chaînes naissantes (Figure 9). Malgré que les recherches effectuées n'aient pu formellement identifier ce canal comme responsable de la rétrotranslocation chez le phagosome (Houde et al., 2003), il a été mis en évidence qu'il remplissait cette fonction dans le RE lors du contrôle de qualité de protéines néosynthétisées et qu'il était impliqué dans le ERAD (Fiebigler et al., 2002; Tirosh et al., 2003). Dernièrement, une nouvelle protéine aux fonctions inconnues a été identifiée comme ayant un rôle à jouer au niveau de la présentation croisée d'antigènes exogènes. Unc93b1, une protéine possédant dix domaines transmembranaires et retrouvée principalement dans le RE, semble promouvoir la présentation croisée lorsque la phagocytose était médiée par les TLR (Tabeta et al., 2006). Les auteurs ont d'ailleurs soutenu qu'une interaction directe devait exister entre le RE et les organelles de dégradation afin de permettre la présentation croisée. Cependant, la fonction définitive d'unc93b1 n'a pas encore été déterminée. Malgré qu'elle fasse partie de la famille des protéines Unc93, normalement liées à la signalisation cellulaire et l'échange de molécules pan-membranaires, un rôle potentiel dans la rétrotranslocation n'est pas à mettre de côté, car ses multiples domaines transmembranaires pourraient former un pore potentiel. D'autres résultats impliquant le recrutement de marqueurs du RE vers les organelles de la

voie endocytaire ont été répertoriés lors de l'analyse de la présentation croisée d'antigènes exogènes par les CMH-I (Wan et al., 2005).

De plus, certains travaux ont clairement fait état de l'efficacité du phagosome pour générer et apprêter les antigènes exogènes pour la présentation croisée. En effet, il a été rapporté qu'ils étaient de 1000 à 10000 fois plus efficace que les endosomes pour la présentation croisée (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Harding et Song, 1994; Ackerman et al., 2005). Le fait que la machinerie nécessaire pour ce processus soit présente chez le phagosome pourrait expliquer la grande différence d'efficacité observée entre ces deux organelles, tant au niveau *in vitro* qu'*in vivo* (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Harding et Song, 1994). D'ailleurs, le modèle actuel de chargement de peptides sur les CMH-I propose que l'association d'Erp57 à calnexine et calréticuline se fasse selon une chronologie établie (Meusser et al., 2005). Les peptides semblent d'abord interagir avec l'hétérodimère calnexine/Erp57 afin d'être rétrotransloqués vers le cytoplasme pour ensuite se lier à l'hétérodimère calréticuline/Erp57, lors de la retranslocation via TAP, avant d'être recrutés vers le CMH de classe I. Or, chez le phagosome, il a été démontré que la partie luminale de calnexine était dégradée. Ceci pourrait avoir un effet bénéfique sur l'acheminement des peptides vers les complexes calréticuline/Erp57 en libérant une quantité d'Erp57 préalablement liée à calnexine, ce qui pourrait favoriser la formation du complexe calréticuline/Erp57/peptide (Figure 8). Étrangement, l'arrivée du protéasome au phagosome coïncide avec l'état de dégradation de calnexine (Gagnon et al., 2002; Houde et al., 2003). Calnexine, après avoir accompli l'acheminement des peptides pour la rétrotranslocation, pourrait être dégradée afin de favoriser la formation des complexes calréticuline/Erp57 et leur accumulation au niveau des transporteurs TAP1/2 via une interaction avec tapasine. Ceci aurait aussi l'effet de favoriser le chargement sur les CMH de classe I, une étape nécessitant aussi le complexe calréticuline/Erp57 (Meusser et al., 2005).

Figure 8. Nouveau modèle des mécanismes de subversion de la maturation du phagosome impliquant le RE



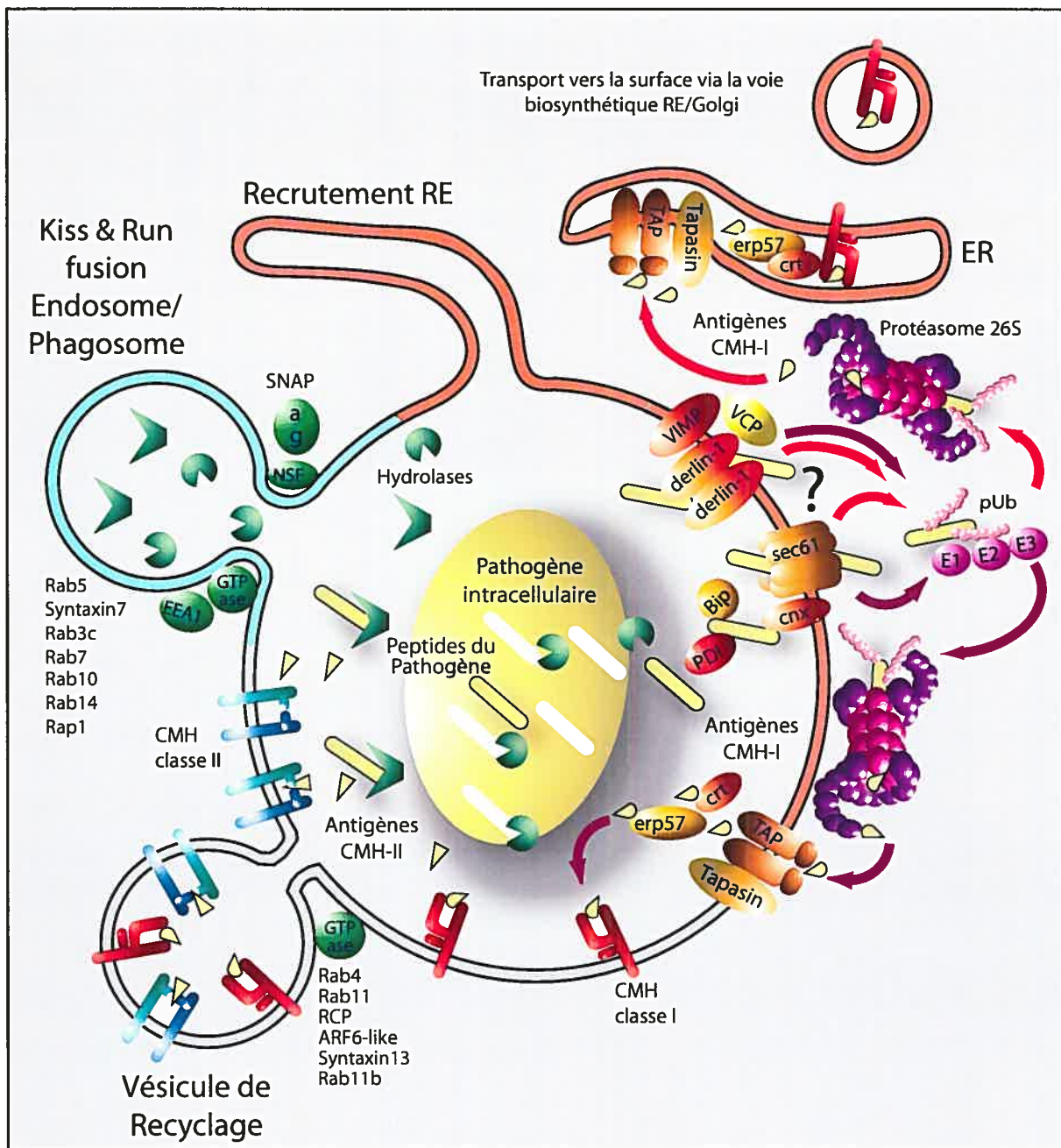
ER= Endosomes de recyclage
 EP= Endosomes précoces
 ET/L= Endosomes tardifs/Lysosomes
 RE= Réticulum endoplasmique
 P= Pathogènes intracellulaires

VAMP3= 'Vesicle-associated membrane protein 3'
 ARF6= 'ADP ribosylation factor 6'
 Cnx= Calnexine
 Crt= Calreticuline
 EEA1= 'Early endosome antigen 1'
 LAMP1= 'Lysosome-associated membrane protein 1'

 = Actine

 = Interaction avec l'organelle de préférence

Figure 9. Modèle des voies de présentation d'antigènes exogènes par le phagosome



Finalement, le transport des complexes CMH-I chargés de peptides pourraient alors atteindre la surface sans avoir à transiter par le Golgi. Il a d'ailleurs été démontré que lorsque les antigènes entraient par phagocytose, la présentation antigénique croisée de peptides immunogéniques était résistante aux traitements à la BFA (Harding et Song, 1994; Houde et al., 2003). Il a aussi été démontré que l'état de glycosylation des CMH-I de surface, chargés de peptides issus de la présentation croisée, était sensible aux traitements à l'EndoH, une caractéristique normalement associée aux protéines n'ayant pas été modifiées par les enzymes résidentes du Golgi (Ackerman et al., 2003). Les CMH-I viendraient donc directement du RE, lors de son recrutement pour la phagocytose, et leur acheminement vers la surface serait effectué par le recyclage d'endosomes (Ackerman et al., 2003; Niedergang et al., 2003; Collins et al., 2002). Le RE confère donc au phagosome une autonomie complète quant à l'apprêtement, le chargement et l'acheminement de peptides exogènes sur des CMH de classe I (Houde et al., 2003, Ackerman et al., 2003, Guermonprez et al., 2003). Cette autonomie, liée à son rôle déjà établi face à l'apprêtement et au chargement de peptides exogènes sur le CMH-II, fait du phagosome une organelle centrale pour l'élaboration d'une réponse immunitaire optimale. Il permet de faire le pont entre immunité innée et adaptée tant sur le plan cellulaire qu'humorale, étant capable de stimuler les cellules T CD4⁺, via la présentation par le CMH-II, les cellules T CD8⁺, via la présentation croisée par le CMH-I (Figure 8).

La phagocytose médiée par le RE : mythe ou réalité?

Depuis la publication des résultats sur la phagocytose médiée par le réticulum endoplasmique, un groupe de chercheurs tente de discréditer ce nouveau concept (Touret et al., 2005a). Un article dernièrement publié dans le journal Cell présente une série de résultats ne démontrant pas l'acquisition de marqueurs du RE lors de la formation du phagosome chez le macrophage (Touret et al., 2005b). Cependant les méthodes employées par les auteurs ne sont pas à la hauteur des conclusions auxquelles ils amènent les lecteurs.

Afin d'éclaircir un peu la situation, nous avons entrepris certaines expériences voulant démontrer l'inexactitude de leur méthodologie ainsi que les erreurs d'interprétations qui ont pu survenir suite à l'analyse de ces résultats.

Tout d'abord, les auteurs ont tenté de localiser calnexine sur la membrane du phagosome à l'aide d'une technique de marquage d'immunocytochimie en post-enrobage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie luminaire de calnexine. Cependant, l'utilisation d'un tel anticorps ne permettrait pas le marquage de calnexine dans les phagosomes dû au fait que le domaine luminaire de cette protéine semble être dégradé durant la maturation phagosomale (Gagnon et al., 2002, Figure 2B). La comparaison de patron des bandes observées suite à une analyse par immunobuvardage révèle fort bien cette dégradation et fournit l'explication de l'absence de signal observée en immunocytochimie (Morrow et al., 2006, Figure 1A; Touret et al., 2005b, Figure 2B). De plus, les résultats présentant les expériences d'immunocytochimie ciblant le domaine luminaire de calnexine ne permettraient pas d'observer la présence de particules d'or aux membranes du phagosome à cause de la présence d'un halo très foncé au pourtour de cette organelle. Il reste aussi que la comparaison de marquages faits avec les deux types d'anticorps n'est pas justifiée, car l'emploi de l'anticorps dirigé contre le domaine cytosolique de calnexine n'est pas adéquat pour l'analyse immunocytochimique en post-enrobage (Gagnon et al., résultats non-publiés). Cependant, son efficacité dans une technique de pré-enrobage, où l'organelle est marquée avant l'osmification et l'enrobage à l'épon, est nettement supérieure (Gagnon et al., 2002; Gagnon et al., résultats non-publiés). Ce type de technique a aussi été utilisé afin de démontrer la présence de TAP1 sur les membranes phagosomales (Guérmonprez et al., 2003). Ceci permet donc de stipuler que la méthodologie employée, lors des études entreprises par Touret et collègues, était mal adaptée aux conditions biologiques trouvées dans le phagosome, ce qui a causé la génération de résultats négatifs et faussé l'interprétation de ceux-ci.

Afin de visualiser le recrutement du RE en temps réel, les auteurs ont opté pour la création d'une chimère fluorescente contenant la séquence de rétention KDEL. Cette séquence permet à certaines protéines du RE de demeurer dans cette organelle grâce au récepteur KDEL qui recycle les protéines contenant cette séquence vers le RE avant qu'elles n'atteignent le Golgi. Avec l'utilisation de ce système, les auteurs n'observent aucun recrutement du RE lors de la phagocytose de billes de latex (Touret et al., 2005). Cependant, la validation du système KDEL-GFP comme technique pouvant marquer le RE dans le macrophage n'a jamais été effectuée. La validation des systèmes employant les chimères KDEL-Avidin ou même Sec61-GFP n'a pas, elle non plus, été démontrée comme étant apte à visualiser le recrutement du RE au phagosome dans un modèle déjà établi. En effet, aucun contrôle positif n'a été effectué validant cette approche. Une expérience d'infection de ces mutants par le parasite *Brucella*, retrouvé dans des vacuoles exhibant des caractéristiques du RE lors de l'infection, aurait bien pu servir de contrôle (Pizarro-Cerda et al., 1998). De plus, ce type de construction peut amener deux éventualités que les auteurs n'ont pas pris en ligne de compte lors de leurs expérimentation. La première est que le GFP est restreint par une signalisation de rétention par KDEL, or d'autres séquences intrinsèques pourraient servir de ciblage lors de la phagocytose et seraient absentes dans cette chimère. La deuxième est qu'il a été démontré que le RE ne formait pas une organelle constituée du repliement d'une seule membrane. Il serait plutôt formé de sous-domaines pouvant avoir des caractéristiques très distinctes (Geuze et al., 2003; Zuber et al., 2004). Certains sous-domaines du RE ont été visualisés en microscope électronique lors d'une étude sur la formation de peroxysomes. Tandis que certaines régions du RE étaient remodelées afin de former les peroxysomes, d'autres parties du RE ne semblaient aucunement impliquées dans ce processus (Geuze et al., 2003). Il a d'ailleurs été démontré que l'entièreté des protéines du RE n'étaient pas recrutées lors de la formation du phagosome (Garin et al., 2001; Gagnon et al., 2002, Figure 2C; Brunet et al., manuscrit en préparation). Des analyses protéomiques et biochimiques semblent indiquer le recrutement d'un sous-domaine du RE lors de l'internalisation de particules de latex (Morrow et al.,

2006). Il se pourrait donc que la signalisation menant au recrutement n'implique pas la séquence KDEL. Cette hypothèse est appuyée du fait que ces analyses n'ont jamais révélé la présence du récepteur KDEL (Garin et al., 2001; Okada et al., 2005; Burlak et al., 2006).

Aussi, une disparité au niveau du ciblage de deux protéines du RE peut être visualisée grâce à la chimère KDEL-GFP. Une analyse en immunofluorescence ciblant cette dernière et calnexine révèle que la colocalisation n'est pas parfaite (Morrow et al., 2006, Figure 1E,F). On peut voir calnexine dans la totalité de la cellule alors que le GFP est plutôt trouvé près du noyau. Ceci devient plus évident lorsque l'on traite les cellules à l'interféron gamma qui a pour effet de les aplatir davantage (Morrow et al., 2006, Figure 1G,I). Cependant, des observations en immunofluorescence faite par les dits auteurs semblent contredire cette disparité par une colocalisation parfaite entre PDI et KDEL-Avidin. Malgré que les résultats publiés semblent clairs, une lecture approfondie de la méthodologie utilisée lors de ce type d'expérience indique la possibilité d'un artéfact. En effet, certains anticorps employés par les auteurs, anti-Avidin et Alexa568-anti-souris, ont été produits chez la chèvre, ce qui aurait pour effet de montrer faussement une colocalisation de Avidin-KDEL et PDI (Touret et al., 2005, Figure 7B,C et *experimental procedures-labeling and immunolabeling*). Aussi, une analyse biochimique de préparation de phagosomes isolés à partir de macrophages transfectés de la chimère KDEL-GFP illustre bien que le RE recruté contient peu, ou pas, cette protéine alors que calnexine, calréticuline et SRPR β sont présentes en grande quantité (Morrow et al., 2006, Figure 1B,C,D). Étrangement, calréticuline contient elle aussi une séquence KDEL. Par quel mécanisme cette protéine est ciblée de manière différentielle au phagosome, lorsque comparée à KDEL-GFP, n'est pas connu. Par contre, ces résultats semblent aussi indiquer l'existence d'un signal requis pour le ciblage de protéines présentes dans des sous-domaines du RE lors de la phagocytose. Une analyse bioinformatique sur la structure des protéines recrutées aux phagosomes pourrait s'avérer efficace pour déterminer la présence d'un tel signal.

La spécificité du marquage cytochimique à la G-6-Pase en microscopie électronique a premièrement été mise en doute lors d'une communication écrite dans « The Journal of Leukocyte Biology » par les mêmes auteurs. Ces derniers ont émis la possibilité que le signal observé pouvait venir d'une réaction croisée avec l'acide ou l'alcaline phosphatase, chacune retrouvée soit dans les organelles de dégradation, tels les endosomes et lysosomes, ou à la surface cellulaire respectivement (Touret et al., 2005a). Cependant, les résultats préalablement publiés faisaient état de la spécificité du marquage en démontrant clairement l'absence de précipités denses aux électrons au niveau de ces organelles (Gagnon et al., 2002). La présence de la G6P, révélée par le marquage cytochimique, est restreinte au RE, à l'enveloppe nucléaire et aux phagosomes (Morrow et al., 2006, Figure 1H). D'autres groupes ont d'ailleurs confirmé la spécificité de cette technique et ont noté la présence d'un marquage au niveau du phagosome (Équipe de Rob Parton en Australie et équipe de François Cannone-Hergaux à l'INSERM en France). Cependant, Touret et collègues notent une absence de marquage au niveau des phagosomes contenant des billes de latex, ce qui vient à l'encontre des résultats précédemment publiés (Touret et al., 2005b; Gagnon et al., 2002).

Par contre, les auteurs ont démontré la validité de la technique à l'aide de l'utilisation du parasite *Brucella*, un parasite intracellulaire capable de s'établir dans une vacuole ayant les caractéristiques du RE. Leurs résultats démontrent clairement un marquage de la G6P au niveau de la membrane phagosomale. Toutefois, ils n'observent ce précipité qu'à des temps tardifs de l'infection. Les raisons expliquant cette discrimination entre les phagosomes contenant les billes de latex et *Brucella* demeurent incertaines, mais plusieurs facteurs reliés à la technique ou aux réactifs utilisés pourraient en être la cause. De notre côté, nous avons noté une nette différence au niveau de l'intensité du marquage lors de l'utilisation de réactifs provenant de deux compagnies différentes dont la composition chimique était minimalement altéré. En effet, le glucose-6-phosphate couplé

au sel di-sodium permet un bien meilleur marquage que le glucose-6-phosphate couplé au sel mono-sodium ou di-potassium (Équipe Desjardins, résultats non-publiés).

Le rôle et l'implication du ciblage d'ARN messagers aux phagosomes.

Suite à des analyses approfondies sur le protéome de phagosomes, isolés à partir de macrophages de souris et d'hémocytes de la *Drosophila*, nous avons identifié la présence de protéines impliquées dans le transport et la traduction d'ARN messagers (Brunet et al., manuscrit en préparation; Stuart et al., article soumis à *Nature*). Des résultats publiés en 2002 avaient démontré la présence de protéines nouvellement synthétisées associées aux phagosomes à des temps si courts qu'un transit par la voie traditionnelle de biosynthèse RE/Golgi ne pouvait expliquer leur présence. L'isolation de phagosomes, suite à des marquages métaboliques courts effectués lors de la phagocytose ou peu après, nous a permis d'élaborer davantage sur ce mécanisme méconnu. Tout d'abord, nous avons démontré que les protéines nouvellement traduites étaient recrutées très rapidement aux phagosomes et que certaines d'entre elles étaient protégées des effets protéolytiques de la protéinase K (Gagnon et al., 2006, Figure 1). Ceci nous a permis de supposer que certaines de ces protéines étaient de nature luminaire ou protégées de la dégradation selon d'autres mécanismes impliquant la formation de complexes protéiques compacts (Garin et al., 2001; Tirosh et al., 2005).

Afin de connaître l'identité des protéines naissantes recrutées au phagosomes, nous avons effectué une analyse protéomique à l'aide d'un marquage employant des isotopes stables (SILAC). Ceci permettait d'identifier les protéines nouvellement synthétisées par spectrométrie de masse grâce à l'incorporation de la leucine lourde (leu-D3) dans les chaînes naissantes qui était repérable dans les peptides analysés. La technique de SILAC, jumelée à d'autres analyses biochimiques, nous a permis d'identifier plus de 15 protéines, dont plusieurs d'entre elles ont été décrites comme ayant un rôle dans la phagocytose

(Gagnon et al., 2006, Figure 2). Des expériences faites en immunobuvardage « western blot », nous a permis de confirmer l'identification de certaines de ces protéines.

Nous nous sommes questionnés sur la provenance de ces protéines néosynthétisées. Avec l'aide d'inhibiteurs agissant sur le transit de protéines issues de la voie biosynthétique RE/Golgi, nous avons démontré que le recrutement de protéines nouvellement synthétisées aux phagosomes n'impliquait cette voie de ciblage (Gagnon et al., 2006, Figure 3). De plus, une analyse comparative des protéines nouvellement synthétisées recrutées aux phagosomes et celles présentes dans le PNS indique la présence d'un mécanisme régulant ce ciblage de façon discriminatoire. En effet, plusieurs protéines néosynthétisées n'étaient présentes que dans le phagosomes, tandis que d'autres protéines étaient préférentiellement produites dans le PNS (Gagnon et al., 2006, Figure 4A). Des différences aussi marquantes ont été observées lors d'analyses comparatives entre la population de protéines néosynthétisées de phagosomes et de préparations de membranes totales, principalement composées de RE, ce qui démontre clairement un ciblage dirigé des protéines identifiées vers les phagosomes et discrédite le concept de contamination par d'autres organelles.

Une analyse du recrutement de protéines néosynthétisées vers des populations de phagosomes à différents stades de maturité a démontré que ce type de ciblage était hautement régulé temporellement. Ces analyses ont permis de démontrer un changement dans les populations de protéines nouvellement traduites associées de manière préférentielle selon l'état de maturité du phagosome (Gagnon et al., 2006, Figure 4B). En effet, la présence des isoforme néosynthétisées de la β et γ -actine était modulée durant la maturation phagosomale, où la forme β était nouvellement synthétisée chez les phagosomes précoces, et la forme γ , chez les phagolysosomes (Gagnon et al., 2006, Figure 4B). La modification des populations de protéines néosynthétisées associées aux phagosomes à différents stades de maturité suggère la présence d'un ciblage d'ARN messagers plutôt que d'un ciblage protéique. Ceci fournit des explications quant à la rapidité avec laquelle les protéines nouvellement synthétisées sont recrutées aux phagosomes et diffèrent avec le temps.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tout d'abord étudié la présence de la machinerie nécessaire pour la traduction d'ARNm. Des résultats en immunobuvardage ont clairement démontré, par la présence de SRP54 et RpS6, que la traduction active d'ARNm était en cours au niveau du phagosome lors de l'isolation (Gagnon et al., 2006, Figure 5A). Des expériences en immunofluorescence ont confirmé davantage cette hypothèse et ont permis de visualiser RpS6 au niveau de la membrane phagosomale ainsi que la présence de protéines néosynthétisées, marquées par la puromycine en C-terminal (Gagnon et al., 2006, Figure 5B et C).

Finalement, des essais de traduction *in vitro* ont permis de démontrer la présence d'une sous-population d'ARNm ciblés aux phagosomes et que ces ARNm étaient différents de ceux associés au RE ou retrouvés à travers la cellule (Gagnon et al., 2006, Figure 6A). Les mécanismes permettant l'association d'ARNm aux phagosomes ne sont pas encore connus. Cependant des composantes protéiques retrouvées du côté cytosolique du phagosomes semblent être nécessaires à cette associations (Gagnon et al., 2006, Figure 5B). Une analyse par électrophorèse en deux dimensions nous a permis d'identifier certains de ces ARNm suite à l'identification de leurs protéines encodées à l'aide de nos bases de données et l'utilisation d'un logiciel permettant l'alignement de gels. De cette manière, nous avons identifié la présence de l'ARNm codant pour la β -actine, ainsi que d'autres protéines associées au phagosome (Garin et al., 2001; Gagnon et al., 2006, Figure 6C). La localisation de l'ARNm de la β -actine a déjà été documentée dans d'autres types cellulaires. Il a été montré que ces ARNm étaient ciblés chez le neurone à l'aide des protéines ZBP1 et ZBP2 (Medrano et Steward, 2001). Ces protéines ont de plus été identifiées par protéomique dans des préparations de phagosomes précoces (Stuart et al., article soumis à Nature). Le rôle du ciblage de l'ARNm de la β -actine lors de la phagocytose est mal connu. Toutefois, des travaux ont indiqué que cet ARNm pouvait être ciblé vers les pseudopodes, sites cellulaires très importants pour la phagocytose (Rafelski et Thériot, 2004). Il serait possible que le recrutement de l'ARNm de la β -actine et sa

traduction locale soit importante pour la phagocytose. Cette hypothèse est appuyée par des observations faites chez des macrophages infectés par le virus de l'herpes (HSV). En effet, l'infection au HSV cause une dégradation des ARNm d'actine par l'entremise de l'activité de la protéine UL41 (Esclatine et al., 2004; Barzilai et al., 2006). D'autres expériences ont démontré que des macrophages infectés par HSV avaient un index phagocytaire amoindri lorsque comparé aux macrophages sauvages (Plaeger-Marshall et al., 1997). Malgré que les effets apportés par une infection au HSV à la cellule hôte sont multiples, il est possible que la phagocytose nécessite la traduction locale de la β actine près de l'événement d'internalisation afin d'accroître la concentration environnante d'actine. De plus, une transition de la forme β à γ laisse aussi supposer que chacune de ces isoformes joue un rôle précis dans la phagocytose. Étant donné qu'elles sont produites à des temps différents durant la maturation du phagosome, la β -actine pourrait être impliquée dans la formation du phagosome et la γ -actine jouerait un rôle au niveau de la maturation. Cependant, ces hypothèses devront être validées.

De plus, des travaux effectués sur l'étude des effets de la rapamycine sur les capacités phagocytaires du macrophage ont mis en évidence un rôle potentiel pour mTOR et le ciblage d'ARNm lors de la phagocytose (Ganesan et al., 2004). Cette protéine permet la régulation de la traduction locale et l'activation de EF-2 (Dufour et al, 2003; Wu et al., 2006). Ces deux protéines jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'autophagie, un processus cellulaire menant à la dégradation d'organelles lorsque la cellule est en situation de stress ou de jeûne (Majeski et al., 2004). Le RE, recruté lors de la formation du phagosome joue aussi un rôle central dans la formation des vacuoles autophagiques (Mizuhima et al., 2002, Noda et al., 2002). Il est fort possible que les protéines reliées au ciblage d'ARNm impliqués dans l'autophagie aient aussi un rôle dans la phagocytose. D'ailleurs, ces deux organelles partagent plusieurs protéines entre elles. Les protéines HSC70 et HSP60, toutes deux impliquées dans la présentation antigénique médiée par les chaperonnes durant l'autophagie, sont d'ailleurs nouvellement synthétisées sur le phagosome (Majeski et al., 2004; Zhou et al., 2006; Gagnon et al., 2006, Fig. 2A).

Aussi, il est possible que certains pathogènes aient pris avantage de la présence de la machinerie de traduction d'ARNm ciblée aux phagosomes. Les pathogènes intracellulaires *Brucella* et *Legionella* possèdent chacun un système de sécrétion de type IV, normalement associé au transfert conjugal d'ADN (Molmeret et al., 2004; Roop et la., 2004). Des protéines effectrices produites par ces pathogènes ont été visualisées dans le cytoplasme de la cellule infectée et permettent l'établissement de la vacuole de réplication. Cependant, le mécanisme par lequel ces effecteurs protéiques traversent la membrane phagosomale demeure méconnu. Il serait possible que ces pathogènes injectent non pas des protéines, mais les ARNm codant pour ces effecteurs et que la machinerie de traduction ciblée au phagosome soit utilisée afin de les produire.

Pour conclure, une meilleure compréhension du de ciblage d'ARNm aux phagosomes pourrait nous aider à mieux comprendre comment ces pathogènes réussissent à subvertir la voie normal de maturation du phagosome. La localisation d'ARNm par la méthode de FISH (fluorescence *in situ* hybridization), pourrait permettre la visualisation de la présence de ces ARNm au niveau du phagosome selon son état de maturité ou d'infection. Une meilleure caractérisation des populations d'ARN messagers ciblés aux phagosomes, à l'aide de techniques d'amplifications par RT-PCR linéaire, pourrait nous fournir une vue plus claire sur le rôle que joue le ciblage d'ARNm dans les fonctions du phagosomes. Suite à l'identification de cibles potentielles, il serait possible d'empêcher la traduction de ces ARNm via l'insertion de microARN spécifique à ces séquences. Ceci pourrait confirmer l'importance d'un tel ciblage advenant un effet adverse sur les fonctions phagosomales. Ces expériences sont maintenant en cours et fourniront de précieux renseignements afin de mieux comprendre ce mécanisme chez le macrophage.

Conclusion

Le phagosome est une organelle très complexe et dynamique, ce qui reflète bien son importance au sein du système immunitaire. Bien qu'il reste plusieurs questions sur la phagocytose, dont les réponses demeurent spéculatives, la protéomique offre une alternative fiable comme outil permettant une étude approfondie de ce processus. Elle permet une analyse multifactorielle sur la composition et la transition du patrimoine protéique du phagosome. Elle permet aussi l'étude des mécanismes de survie qu'emploient les pathogènes intracellulaires afin d'infecter les organismes. Il est possible que chacun d'entre eux modifie le protéome du phagosome de manières différentes afin que celui-ci accommode la physiologie du pathogène en question. L'identification de nouvelles protéines effectrices utilisées par ces pathogènes afin de promouvoir leur survie, ou de quelles protéines phagosomales elles ciblent, pourrait servir de point de départ dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans cette même lignée, la démonstration du recrutement du RE pour la formation du phagosome fournit une nouvelle liste potentielle pour de telles cibles. Aussi, le recrutement du RE lors de la phagocytose nous permet de revoir certains dogmes établis sur ce processus. Il nous permet entre autre de réinterpréter le modèle décrivant les mécanismes de survie employés par les pathogènes intracellulaires. Les pathogènes *Brucella* et *Legionella* ne semblaient pas suivre la tendance générale de subversion phagosomale qui semblait se centrer sur le court-circuitage de la biogénèse du phagolysosome. Plutôt, ils semblaient prendre une voie divergente en modifiant le protéome phagosomal afin que celui-ci apparaisse celui du RE. Le nouveau modèle, présentant le RE comme partie intégrale du phagosome, nous permet de voir que *Brucella* et *Legionella* exercent aussi leur pression de survie sur la voie normale de la biogénèse du phagolysosome, mais aux étapes les plus précoces de maturation, où les composantes du RE sont abondantes. De plus, le ciblage et la traduction d'ARN messagers au phagosomes

nous laisse aussi entrevoir un nouveau mécanisme d'infection potentiellement utilisé par certains pathogènes possédant un système de sécrétion de type IV.

Enfin, la nature de la composition de la membrane phagosomale demeure un sujet très controversé. Le recrutement d'endomembranes est une caractéristique cruciale quant à la fonction de ce processus cellulaire. Cependant, la quantité de membranes fournies ainsi que le rôle exact de ce recrutement n'ont pas encore été identifiés. À ce jour, aucun résultat ne laisse supposer qu'il soit exclusif à un seul type de membrane. Plutôt, l'arrivée de membranes issues du recyclage endosomal, de la voie endocytaire ou du RE constitue une mosaïque de fonctions attribuées aux phagosomes. Ces diverses membranes permettent l'acquisition de machineries moléculaires reliées à la fusion membranaire, à la dégradation protéolytique ainsi qu'à l'apprêtement et le chargement des peptides afin de développer une réponse immunitaire adaptative efficace. D'ailleurs, il a été démontré que le RE fournissait la machinerie moléculaire nécessaire pour la présentation croisée d'antigènes exogènes, plaçant dorénavant le phagosome au centre de la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Malgré que le domaine de recherche centré sur la phagocytose progresse à grands pas, je crois que cette organelle continuera à causer la controverse, car il le fait depuis sa découverte.

Bibliographie

- Abel, G., et Czop, J. K. (1992). Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1 beta. *Int J Immunopharmacol* *14*, 1363-1373.
- Abraham, S. N., et Malaviya, R. (1997). Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun* *65*, 3501-3508.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R., et 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.
- Adachi, Y., Ishii, T., Ikeda, Y., Hoshino, A., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S., et Ohno, N. (2004). Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect Immun* *72*, 4159-4171.
- Aderem, A., et Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* *17*, 593-623.
- Agarwal, S., Piesco, N. P., Johns, L. P., et Riccelli, A. E. (1995). Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J Dent Res* *74*, 1057-1065.
- Ainger, K., D. Avossa, et al. (1997). "Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA." *J Cell Biol* *138*(5): 1077-87.
- Alfonso, C., Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C. D., Peterson, P. A., Fung-Leung, W. P., et Karlsson, L. (1999). The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation. *Immunol Rev* *172*, 255-266.
- Allavena, P., Chieppa, M., Monti, P., et Piemonti, L. (2004). From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit Rev Immunol* *24*, 179-192.
- Alli, O. A., Gao, L. Y., Pedersen, L. L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M., et Abu Kwaik, Y. (2000). Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* *68*, 6431-6440.
- Ambros, V. (2003). "MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing." *Cell* *113*(6): 673-6.

- Anderson, P. and N. Kedersha (2006). "RNA granules." *J Cell Biol* 172(6): 803-8.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., et Bandeira, A. (2001). On the ontogeny and physiology of regulatory T cells. *Immunol Rev* 182, 5-17.
- Antar, L. N., R. Afroz, et al. (2004). "Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses." *J Neurosci* 24(11): 2648-55.
- Apostolopoulos, V., et McKenzie, I. F. (2001). Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med* 1, 469-474.
- Arase, H., et Lanier, L. L. (2004). Specific recognition of virus-infected cells by paired NK receptors. *Rev Med Virol* 14, 83-93.
- Ardavin, C., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., Anjuere, F., Arias, C. F., Marin, A. R., Ruiz, S., Parrillas, V., et Hernandez, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 22, 691-700.
- Arredouani, M. S., Palecanda, A., Koziel, H., Huang, Y. C., Imrich, A., Sulahian, T. H., Ning, Y. Y., Yang, Z., Pikkarainen, T., Sankala, M., et al. (2005). MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. *J Immunol* 175, 6058-6064.
- Aruffo, A., Bowen, M. A., Patel, D. D., Haynes, B. F., Starling, G. C., Gebe, J. A., et Bajorath, J. (1997). CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* 18, 498-504.
- Askew, D., Chu, R. S., Krieg, A. M., et Harding, C. V. (2000). CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. *J Immunol* 165, 6889-6895.
- Astarie-Dequeker, C., Carreno, S., Cougoule, C., et Maridonneau-Parini, I. (2002). The protein tyrosine kinase Hck is located on lysosomal vesicles that are physically and functionally distinct from CD63-positive lysosomes in human macrophages. *J Cell Sci* 115, 81-89.
- Azakami, S., et Eguchi, M. (1993). Ultrastructural and ultracytochemical alteration of rat neutrophils induced by G-CSF. *Eur J Haematol* 51, 166-172.
- Bajno, L., Peng, X. R., Schreiber, A. D., Moore, H. P., Trimble, W. S., et Grinstein, S. (2000). Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* 149, 697-706.

- Banchereau, J., Briere, F., Liu, Y. J., et Rousset, F. (1994). Molecular control of B lymphocyte growth and differentiation. *Stem Cells* 12, 278-288.
- Bancroft, G. J., Kelly, J. P., Kaye, P. M., McDonald, V., et Cross, C. E. (1994). Pathways of macrophage activation and innate immunity. *Immunol Lett* 43, 67-70.
- Banerjee, M., Copp, J., Vuga, D., Marino, M., Chapman, T., van der Geer, P., et Ghosh, P. (2004). GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are required for potentiation of Met activation. *Mol Microbiol* 52, 257-271.
- Bang, R., Marnell, L., Mold, C., Stein, M. P., Clos, K. T., Chivington-Buck, C., et Clos, T. W. (2005). Analysis of binding sites in human C-reactive protein for Fc{gamma}RI, Fc{gamma}RIIA, and C1q by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 280, 25095-25102.
- Bared, S. M., Buechler, C., Boettcher, A., Dayoub, R., Sigrüener, A., Grandl, M., Rudolph, C., Dada, A., et Schmitz, G. (2004). Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells. *Mol Biol Cell* 15, 5399-5407.
- Barnard, D. C., K. Ryan, et al. (2004). "Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation." *Cell* 119(5): 641-51.
- Bassell, G. J. and S. Kelic (2004). "Binding proteins for mRNA localization and local translation, and their dysfunction in genetic neurological disease." *Curr Opin Neurobiol* 14(5): 574-81.
- Barzilai, A., Zivony-Elbom, I., Sarid, R., Noah, E., et Frenkel, N. (2006). The herpes simplex virus type 1 vhs-UL41 gene secures viral replication by temporarily evading apoptotic cellular response to infection: Vhs-UL41 activity might require interactions with elements of cellular mRNA degradation machinery. *J Virol* 80, 505-513.
- Bays, N. W., Wilhovsky, S. K., Goradia, A., Hodgkiss-Harlow, K., et Hampton, R. Y. (2001). HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell* 12, 4114-4128.
- Beaumont, C., et Canonne-Hergaux, F. (2005). [Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]. *Transfus Clin Biol* 12, 123-130.
- Becker, T., Volchuk, A., et Rothman, J. E. (2005). Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4022-4026.
- Belz, G. T., Carbone, F. R., et Heath, W. R. (2002). Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 22, 439-448.

- Beuzon, C. R., Meresse, S., Unsworth, K. E., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S. R., Ryder, T. A., Boucrot, E., et Holden, D. W. (2000). Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *Embo J* 19, 3235-3249.
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., et Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* 272, 13793-13802.
- Bidani, A., et Heming, T. A. (1995). Effects of bafilomycin A1 on functional capabilities of LPS-activated alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 57, 275-281.
- Bierne, H., et Cossart, P. (2002). InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J Cell Sci* 115, 3357-3367.
- Boccaccio, G. L. (2000). "Targeting of mRNAs within the glial cell cytoplasm: how to hide the message along the journey." *J Neurosci Res* 62(4): 473-9.
- Bodian, D. (1965). "A Suggestive Relationship of Nerve Cell Rna with Specific Synaptic Sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 53: 418-25.
- Bohley, P., et Seglen, P. O. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48, 151-157.
- Booth, J. W., Trimble, W. S., et Grinstein, S. (2001). Membrane dynamics in phagocytosis. *Semin Immunol* 13, 357-364.
- Borregaard, N., Theilgaard-Monch, K., Cowland, J. B., Stahle, M., et Sorensen, O. E. (2005). Neutrophils and keratinocytes in innate immunity--cooperative actions to provide antimicrobial defense at the right time and place. *J Leukoc Biol* 77, 439-443.
- Bowden, D. S., Pedersen, J. S., Toh, B. H., et Westaway, E. G. (1987). Distribution by immunofluorescence of viral products and actin-containing cytoskeletal filaments in rubella virus-infected cells. *Arch Virol* 92, 211-219.
- Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J. P., Estaquier, J., Huart, J. J., Ameisen, J. C., Aminoff, D., et Montreuil, J. (1998). Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80, 173-195.
- Braun, L., Ghebrehiwet, B., et Cossart, P. (2000). gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo J* 19, 1458-1466.
- Braun, V., et Niedergang, F. (2006). Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis. *Biol Cell* 98, 195-201.

- Brown, M. G., Driscoll, J., et Monaco, J. J. (1991). Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353, 355-357.
- Brumell, J. H., Goosney, D. L., et Finlay, B. B. (2002). SifA, a type III secreted effector of *Salmonella typhimurium*, directs *Salmonella*-induced filament (Sif) formation along microtubules. *Traffic* 3, 407-415.
- Brumell, J. H., Rosenberger, C. M., Gotto, G. T., Marcus, S. L., et Finlay, B. B. (2001). SifA permits survival and replication of *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Cell Microbiol* 3, 75-84.
- Brunet, S., Thibault, P., Gagnon, E., Kearney, P., Bergeron, J. J., et Desjardins, M. (2003). Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol* 13, 629-638.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., et Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159-166.
- Burchmore, R. J., et Barrett, M. P. (2001). Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. *Int J Parasitol* 31, 1311-1320.
- Burlak, C., Whitney, A. R., Mead, D. J., Hackstadt, T., et Deleo, F. R. (2006). Maturation of Human Neutrophil Phagosomes Includes Incorporation of Molecular Chaperones and Endoplasmic Reticulum Quality Control Machinery. *Mol Cell Proteomics* 5, 620-634.
- Cannon, G. J., et Swanson, J. A. (1992). The macrophage capacity for phagocytosis. *J Cell Sci* 101 (Pt 4), 907-913.
- Capo, C., Lindberg, F. P., Meconi, S., Zaffran, Y., Tardei, G., Brown, E. J., Raoult, D., et Mege, J. L. (1999). Subversion of monocyte functions by *coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between α v β 3 integrin and CR3. *J Immunol* 163, 6078-6085.
- Capo, C., Moynault, A., Collette, Y., Olive, D., Brown, E. J., Raoult, D., et Mege, J. L. (2003). *Coxiella burnetii* avoids macrophage phagocytosis by interfering with spatial distribution of complement receptor 3. *J Immunol* 170, 4217-4225.
- Caproni, M., Rolfo, S., Bernacchi, E., Bianchi, B., Brazzini, B., et Fabbri, P. (1999). The role of lymphocytes, granulocytes, mast cells and their related cytokines in lesional skin of linear IgA bullous dermatosis. *Br J Dermatol* 140, 1072-1078.
- Carroll, M. C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 16, 545-568.

- Carsetti, R., Rosado, M. M., et Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197, 179-191.
- Castellano, F., Chavrier, P., et Caron, E. (2001). Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol* 13, 347-355.
- Castellino, F., Han, R., et Germain, R. N. (2001). The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur J Immunol* 31, 841-850.
- Catron, D. M., Sylvester, M. D., Lange, Y., Kadekoppala, M., Jones, B. D., Monack, D. M., Falkow, S., et Haldar, K. (2002). The Salmonella-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55. *Cell Microbiol* 4, 315-328.
- Celli, J., Salcedo, S. P., et Gorvel, J. P. (2005). Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1673-1678.
- Ceman, S., W. T. O'Donnell, et al. (2003). "Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes." *Hum Mol Genet* 12(24): 3295-305.
- Chakraborty, D., Banerjee, S., Sen, A., Banerjee, K. K., Das, P., et Roy, S. (2005). Leishmania donovani affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *J Immunol* 175, 3214-3224.
- Chakraborty, D., Banerjee, S., Sen, A., Banerjee, K. K., Das, P., et Roy, S. (2005). Leishmania donovani affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *J Immunol* 175, 3214-3224.
- Chiplunkar, S., De Libero, G., et Kaufmann, S. H. (1986). Mycobacterium leprae-specific Lyt-2+ T lymphocytes with cytolytic activity. *Infect Immun* 54, 793-797.
- Christie, P. J., et Vogel, J. P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 8, 354-360.
- Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M., et Falkow, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30, 175-188.
- Cirillo, S. L., Lum, J., et Cirillo, J. D. (2000). Identification of novel loci involved in entry by Legionella pneumophila. *Microbiology* 146 (Pt 6), 1345-1359.
- Clark, H. W., Reid, K. B., et Sim, R. B. (2000). Collectins and innate immunity in the lung. *Microbes Infect* 2, 273-278.

- Clark, I. A., Awburn, M. M., Harper, C. G., Liomba, N. G., et Molyneux, M. E. (2003). Induction of HO-1 in tissue macrophages and monocytes in fatal falciparum malaria and sepsis. *Malar J* 2, 41.
- Clemens, D. L., Lee, B. Y., et Horwitz, M. A. (2002). The Mycobacterium tuberculosis phagosome in human macrophages is isolated from the host cell cytoplasm. *Infect Immun* 70, 5800-5807.
- Coers, J., Monahan, C., et Roy, C. R. (1999). Modulation of phagosome biogenesis by Legionella pneumophila creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol* 1, 451-453.
- Comerci, D. J., Martinez-Lorenzo, M. J., Sieira, R., Gorvel, J. P., et Ugalde, R. A. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. *Cell Microbiol* 3, 159-168.
- Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Hohfeld, J., et Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3, 93-96.
- Cossart, P. (2000). Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell Microbiol* 2, 195-205.
- Cossart, P., et Lecuit, M. (1998). Interactions of Listeria monocytogenes with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J* 17, 3797-3806.
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J., et Lecuit, M. (2003). Invasion of mammalian cells by Listeria monocytogenes: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 13, 23-31.
- Courret, N., Frehel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., et Antoine, J. C. (2002). Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci* 115, 2303-2316.
- Cox, D., et Greenberg, S. (2001). Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol* 13, 339-345.
- Cox, D., Lee, D. J., Dale, B. M., Calafat, J., et Greenberg, S. (2000). A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 680-685.

- Coyle, A. J., et Gutierrez-Ramos, J. C. (2001). The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2, 203-209.
- Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-507.
- Crotty, S., et Ahmed, R. (2004). Immunological memory in humans. *Semin Immunol* 16, 197-203.
- Crouch, E., et Wright, J. R. (2001). Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 63, 521-554.
- Cywes, C., Hoppe, H. C., Daffe, M., et Ehlers, M. R. (1997). Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun* 65, 4258-4266.
- de Almeida, C. J., et Linden, R. (2005). Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cell Mol Life Sci* 62, 1532-1546.
- Defresne, M. P., Humblet, C., Deman, J., Greimers, R., Courtoy, R., Rongy, A. M., Delvenne, P., Martin, M. T., Goffinet, G., et Boniver, J. (1992). Ontogeny of T-cell surface molecules and receptors in the thymus. *Prog Histochem Cytochem* 26, 194-200.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., et Hensel, M. (1999). Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* 31, 1759-1773.
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P., et Letesson, J. J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 3, 487-497.
- DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., *et al.* (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 443-448.
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., et Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* 276, 18507-18512.
- Dermine, J. F., Goyette, G., Houde, M., Turco, S. J., et Desjardins, M. (2005). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol* 7, 1263-1270.

- Dermine, J. F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A., et Desjardins, M. (2000). Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* 2, 115-126.
- Descoteaux, A., et Turco, S. J. (2002). Functional aspects of the Leishmania donovani lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect* 4, 975-981.
- Descoteaux, A., Turco, S. J., Sacks, D. L., et Matlashewski, G. (1991). Leishmania donovani lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol* 146, 2747-2753.
- Desjardins, M., Celis, J. E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., et Huber, L. A. (1994). Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* 269, 32194-32200.
- Desjardins, M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3, 280-291.
- Desjardins, M., Houde, M., et Gagnon, E. (2005). Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev* 207, 158-165.
- Detilleux, P. G., Deyoe, B. L., et Cheville, N. F. (1990). Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro. *Infect Immun* 58, 2320-2328.
- Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., et Fu, Z. F. (2005). New frontiers in proteomics research: a perspective. *Int J Pharm* 299, 1-18.
- Diaz, M., et Flajnik, M. F. (1998). Evolution of somatic hypermutation and gene conversion in adaptive immunity. *Immunol Rev* 162, 13-24.
- Dorn, B. R., Dunn, W. A., Jr., et Progulske-Fox, A. (2002). Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* 4, 1-10.
- Dorshkind, K., Pollack, S. B., Bosma, M. J., et Phillips, R. A. (1985). Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J Immunol* 134, 3798-3801.
- Driessen, C., Bryant, R. A., Lennon-Dumenil, A. M., Villadangos, J. A., Bryant, P. W., Shi, G. P., Chapman, H. A., et Ploegh, H. L. (1999). Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol* 147, 775-790.
- Duclos, S., Corsini, R., et Desjardins, M. (2003). Remodeling of endosomes during lysosome biogenesis involves 'kiss and run' fusion events regulated by rab5. *J Cell Sci* 116, 907-918.

- Duclos, S., et Desjardins, M. (2000). Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 2, 365-377.
- Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H., et Desjardins, M. (2000). Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3531-3541.
- Dufour, E. M., Nandrot, E., Marchant, D., Van Den Berghe, L., Gadin, S., Issilame, M., Dufier, J. L., Marsac, C., Carper, D., Menasche, M., et Abitbol, M. (2003). Identification of novel genes and altered signaling pathways in the retinal pigment epithelium during the Royal College of Surgeons rat retinal degeneration. *Neurobiol Dis* 14, 166-180.
- East, L., et Isacke, C. M. (2002). The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1572, 364-386.
- Edmonds, M. D., Cloeckert, A., Booth, N. J., Fulton, W. T., Hagius, S. D., Walker, J. V., et Elzer, P. H. (2001). Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res* 62, 1461-1466.
- El-Etr, S. H., et Cirillo, J. D. (2001). Entry mechanisms of mycobacteria. *Front Biosci* 6, D737-747.
- Eli Benjamini, G. S., Sidney Leskowitz (1996). *Immunology a short course*, 3rd edn (New York: Wiley-Liss).
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., et Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol* 10, 781-784.
- Engelhard, V. H. (1994). Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 12, 181-207.
- Eom, T., L. N. Antar, et al. (2003). "Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses." *J Neurosci* 23(32): 10433-44.
- Esclatine, A., Taddeo, B., et Roizman, B. (2004). The UL41 protein of herpes simplex virus mediates selective stabilization or degradation of cellular mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18165-18170.

Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P., et Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 172, 1785-1794.

Fairchild, P. J., et Austyn, J. M. (1990). Thymic dendritic cells: phenotype and function. *Int Rev Immunol* 6, 187-196.

Fanger, N. A., Liu, C., Guyre, P. M., Wardwell, K., O'Neil, J., Guo, T. L., Christian, T. P., Mudzinski, S. P., et Gosselin, E. J. (1997). Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood* 89, 4128-4135.

Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., et Pieters, J. (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97, 435-447.

Fiebigler, E., Story, C., Ploegh, H. L., et Tortorella, D. (2002). Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein. *Embo J* 21, 1041-1053.

Fields, B. S. (1996). The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* 4, 286-290.

Flajnik, M. F., et Du Pasquier, L. (2004). Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol* 25, 640-644.

Flandin, J. F., Chano, F., et Descoteaux, A. (2006). RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol* 36, 411-420.

Fliermans, C. B. (1996). Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microb Ecol* 32, 203-228.

Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J., et Ezekowitz, R. A. (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4, 431-443.

Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A., et White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* 284, 1991-1994.

Francis, C. L., Ryan, T. A., Jones, B. D., Smith, S. J., et Falkow, S. (1993). Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 364, 639-642.

- Fratti, R. A., Backer, J. M., Gruenberg, J., Corvera, S., et Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 154, 631-644.
- Freeman, J. A., Rappl, C., Kuhle, V., Hensel, M., et Miller, S. I. (2002). SpiC is required for translocation of Salmonella pathogenicity island 2 effectors and secretion of translocon proteins SseB and SseC. *J Bacteriol* 184, 4971-4980.
- Fu, Y., et Galan, J. E. (1998). The Salmonella typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 27, 359-368.
- Gabel, L. A., S. Won, et al. (2004). "Visual experience regulates transient expression and dendritic localization of fragile X mental retardation protein." *J Neurosci* 24(47): 10579-83.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J., et Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131.
- Gal, P., et Ambrus, G. (2001). Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL-MASPs. *Curr Protein Pept Sci* 2, 43-59.
- Galan, J. E. (1998). Interactions of Salmonella with host cells: encounters of the closest kind. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14006-14008.
- Galligan, C., et Yoshimura, T. (2003). Phenotypic and functional changes of cytokine-activated neutrophils. *Chem Immunol Allergy* 83, 24-44.
- Ganesan, L. P., Wei, G., Pengal, R. A., Moldovan, L., Moldovan, N., Ostrowski, M. C., et Tridandapani, S. (2004). The serine/threonine kinase Akt Promotes Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages through the activation of p70S6 kinase. *J Biol Chem* 279, 54416-54425.
- Gao, L. Y., et Abu Kwaik, Y. (1999). Activation of caspase 3 during Legionella pneumophila-induced apoptosis. *Infect Immun* 67, 4886-4894.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., et Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152, 165-180.
- Garner, M. J., Hayward, R. D., et Koronakis, V. (2002). The Salmonella pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 4, 153-165.

- Gatfield, J., et Pieters, J. (2000). Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288, 1647-1650.
- Gedde, M. M., Higgins, D. E., Tilney, L. G., et Portnoy, D. A. (2000). Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 68, 999-1003.
- Gendelman, H. E. (2002). Neural immunity: Friend or foe? *J Neurovirol* 8, 474-479.
- Gemsa, D., Woo, C. H., Fudenberg, H. H., et Schmid, R. (1974). Stimulation of heme oxygenase in macrophages and liver by endotoxin. *J Clin Invest* 53, 647-651.
- Gemsa, D., Woo, C. H., Webb, D., Fudenberg, H. H., et Schmid, R. (1975). Erythrophagocytosis by macrophages: suppression of heme oxygenase by cyclic AMP. *Cell Immunol* 15, 21-36.
- Geuze, H. J., Murk, J. L., Stroobants, A. K., Griffith, J. M., Kleijmeer, M. J., Koster, A. J., Verkley, A. J., Distel, B., et Tabak, H. F. (2003). Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* 14, 2900-2907.
- Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., et Wiley, D. C. (1995). The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378, 457-462.
- Glickman, M. H., et Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fu, H., Larsen, C. N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., *et al.* (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* 26, 21-28.
- Gold, E. S., Morrissette, N. S., Underhill, D. M., Guo, J., Bassetti, M., et Aderem, A. (2000). Amphiphysin II α , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* 12, 285-292.
- Gold, E. S., Underhill, D. M., Morrissette, N. S., Guo, J., McNiven, M. A., et Aderem, A. (1999). Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 190, 1849-1856.
- Golub, T., et Pico, C. (2005). Spatial control of actin-based motility through plasmalemmal PtdIns(4,5)P₂-rich raft assemblies. *Biochem Soc Symp*, 119-127.
- Gorvel, J. P., et Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90, 281-297.
- Gotthardt, D., Warnatz, H. J., Henschel, O., Bruckert, F., Schleicher, M., et Soldati, T. (2002). High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Mol Biol Cell* 13, 3508-3520.

- Grammer, A. C., et Lipsky, P. E. (2000). CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms. *Adv Immunol* 76, 61-178.
- Green, P. J., Feizi, T., Stoll, M. S., Thiel, S., Prescott, A., et McConville, M. J. (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol* 66, 319-328.
- Grieshaber, S., Swanson, J. A., et Hackstadt, T. (2002). Determination of the physical environment within the *Chlamydia trachomatis* inclusion using ion-selective ratiometric probes. *Cell Microbiol* 4, 273-283.
- Grzybek, M., Kozubek, A., Dubielecka, P., et Sikorski, A. F. (2005). Rafts--the current picture. *Folia Histochem Cytobiol* 43, 3-10.
- Guermonprez, P., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A., et Leclerc, C. (1999). Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol* 162, 1910-1916.
- Gumienny, T. L., et Hengartner, M. O. (2001). How the worm removes corpses: the nematode *C. elegans* as a model system to study engulfment. *Cell Death Differ* 8, 564-568.
- Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., Lopez-Goni, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J. P., et Moreno, E. (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* 276, 44435-44443.
- Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Sjolín, C., Schreiber, A. D., Trimble, W. S., et Grinstein, S. (1998). v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11691-11696.
- Hackstadt, T., Rockey, D. D., Heinzen, R. A., et Scidmore, M. A. (1996). *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *Embo J* 15, 964-977.
- Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M. A., Shaw, E. I., et Fischer, E. R. (1999). The *Chlamydia trachomatis* Inca protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell Microbiol* 1, 119-130.
- Hales, L. M., et Shuman, H. A. (1999). *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect Immun* 67, 3662-3666.

- Hampton, R. Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 476-482.
- Harding, C. V., et Song, R. (1994). Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* *153*, 4925-4933.
- Harmon, B. G., Adams, L. G., et Frey, M. (1988). Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am J Vet Res* *49*, 1092-1097.
- Harmon, B. G., Adams, L. G., Templeton, J. W., et Smith, R., 3rd (1989). Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows that resisted infection after inoculation of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* *50*, 459-465.
- Harrison, M., Durose, L., Song, C. F., Barratt, E., Trinick, J., Jones, R., et Findlay, J. B. (2003). Structure and function of the vacuolar H⁺-ATPase: moving from low-resolution models to high-resolution structures. *J Bioenerg Biomembr* *35*, 337-345.
- Hayward, R. D., et Koronakis, V. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *Embo J* *18*, 4926-4934.
- He, H. T., Lellouch, A., et Marguet, D. (2005). Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. *Semin Immunol* *17*, 23-33.
- Heinzen, R. A., et Hackstadt, T. (1996). A developmental stage-specific histone H1 homolog of *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol* *178*, 5049-5052.
- Held, T. K., Weihua, X., Yuan, L., Kalvakolanu, D. V., et Cross, A. S. (1999). Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infect Immun* *67*, 206-212.
- Helenius, A., et Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* *73*, 1019-1049.
- Henson, P. M., Bratton, D. L., et Fadok, V. A. (2001). Apoptotic cell removal. *Curr Biol* *11*, R795-805.
- Hentges, F. (1994). B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin Exp Immunol* *97 Suppl 1*, 3-9.
- Herre, J., Gordon, S., et Brown, G. D. (2004). Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol* *40*, 869-876.

- Hershey, J. and W. Merrick (2000). "The pathway and mechanisms of initiation of protein synthesis." Cold Springs Harbour, NY: Cold springs HARbour Lab. Press. 1020 pp.
- Hilbi, H., Segal, G., et Shuman, H. A. (2001). Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 42, 603-617.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., et Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Holevinsky, K. O., et Nelson, D. J. (1998). Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophys J* 75, 2577-2586.
- Horwitz, M. A. (1984). Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 36, 27-33.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., et Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- Howe, D., et Mallavia, L. P. (2000). *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun* 68, 3815-3821.
- Huang, Y. S., J. H. Carson, et al. (2003). "Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB." *Genes Dev* 17(5): 638-53.
- Huang, Y. S. and J. D. Richter (2004). "Regulation of local mRNA translation." *Curr Opin Cell Biol* 16(3): 308-13.
- Hughes, E. A., et Cresswell, P. (1998). The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr Biol* 8, 709-712.
- Huyer, G., Piluek, W. F., Fansler, Z., Kreft, S. G., Hochstrasser, M., Brodsky, J. L., et Michaelis, S. (2004). Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispinning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* 279, 38369-38378.
- Inaba, K., Hosono, M., et Inaba, M. (1990). Thymic dendritic cells and B cells: isolation and function. *Int Rev Immunol* 6, 117-126.
- Ireton, K., et Cossart, P. (1997). Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu Rev Genet* 31, 113-138.

Ireton, K., Payraastre, B., et Cossart, P. (1999). The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 274, 17025-17032.

Ishidoh, K., Takeda-Ezaki, M., Watanabe, S., Sato, N., Aihara, M., Imagawa, K., Kikuchi, M., et Kominami, E. (1999). Analysis of where and which types of proteinases participate in lysosomal proteinase processing using bafilomycin A1 and *Helicobacter pylori* Vac A toxin. *J Biochem (Tokyo)* 125, 770-779.

Jakob, C. A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y., et Aebi, M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* 2, 423-430.

Jankowski, A., Scott, C. C., et Grinstein, S. (2002). Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *J Biol Chem* 277, 6059-6066.

Janssen, K. P., et Schleicher, M. (2001). *Dictyostelium discoideum*: a genetic model system for the study of professional phagocytes. Profilin, phosphoinositides and the Imp gene family in *Dictyostelium*. *Biochim Biophys Acta* 1525, 228-233.

Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H., et Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 4, 134-139.

Jeffery, W. R., C. R. Tomlinson, et al. (1983). "Localization of actin messenger RNA during early ascidian development." *Dev Biol* 99(2): 408-17

Jensenius, J. C. (2005). The mannan-binding lectin (MBL) pathway of complement activation: biochemistry, biology and clinical implications. *Adv Exp Med Biol* 564, 21-22.

Jin, P., D. C. Zarnescu, et al. (2004). "Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway." *Nat Neurosci* 7(2): 113-7.

Jozefowski, S., Arredouani, M., Sulahian, T., et Kobzik, L. (2005). Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO. *J Immunol* 175, 8032-8041.

Jutras, I., et Desjardins, M. (2005). Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 511-527.

Kagan, J. C., et Roy, C. R. (2002). *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* 4, 945-954.

- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M., et Hengartner, H. (1996). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 14, 207-232.
- Kanai, Y., N. Dohmae, et al. (2004). "Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule." *Neuron* 43(4): 513-25.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch (2004). "The molecular mechanics of eukaryotic translation." *Annu Rev Biochem* 73: 657-704.
- Kasahara, M., Kandil, E., Salter-Cid, L., et Flajnik, M. F. (1996). Origin and evolution of the class I gene family: why are some of the mammalian class I genes encoded outside the major histocompatibility complex? *Res Immunol* 147, 278-284; discussion 284-275.
- Kawasaki, M., Nakayama, K., et Wakatsuki, S. (2005). Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Curr Opin Struct Biol* 15, 681-689.
- Kehry, M. R. (1996). CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol* 156, 2345-2348.
- Kima, P. E., et Dunn, W. (2005). Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate Leishmania parasitophorous vacuoles. *Microb Pathog* 38, 139-145.
- Kindler, S., H. Wang, et al. (2005). "RNA transport and local control of translation." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 223-45.
- King, M. L., T. J. Messitt, et al. (2005). "Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte." *Biol Cell* 97(1): 19-33.
- Kirby, J. E., Vogel, J. P., Andrews, H. L., et Isberg, R. R. (1998). Evidence for pore-forming ability by Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* 27, 323-336.
- Kishore, U., et Reid, K. B. (2000). C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49, 159-170.
- Kislauskis, E. H., X. Zhu, et al. (1994). "Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype." *J Cell Biol* 127(2): 441-51.
- Klion, A. D., et Nutman, T. B. (2004). The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* 113, 30-37.
- Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G., et Gruenberg, J. (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1, 113-118.

Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., et Liautard, J. P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15711-15716.

Konig, R. (2002). Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* *14*, 75-83.

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

Krichevsky, A. M. and K. S. Kosik (2001). "Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation." *Neuron* *32*(4): 683-96.

Kropshofer, H., Hammerling, G. J., et Vogt, A. B. (1999). The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol Rev* *172*, 267-278.

Kruskal, B. A., Sastry, K., Warner, A. B., Mathieu, C. E., et Ezekowitz, R. A. (1992). Phagocytic chimeric receptors require both transmembrane and cytoplasmic domains from the mannose receptor. *J Exp Med* *176*, 1673-1680.

Kubota, A., Lian, R. H., Lohwasser, S., Salcedo, M., et Takei, F. (1999). IFN-gamma production and cytotoxicity of IL-2-activated murine NK cells are differentially regulated by MHC class I molecules. *J Immunol* *163*, 6488-6493.

Kwon, S., E. Barbarese, et al. (1999). "The cis-acting RNA trafficking signal from myelin basic protein mRNA and its cognate trans-acting ligand hnRNP A2 enhance cap-dependent translation." *J Cell Biol* *147*(2): 247-56.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.

Lang, D. M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrusch, B., Laessing, U., Wiechers, M. F., Plattner, H., et Stuermer, C. A. (1998). Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol* *37*, 502-523.

- Lavoie, C., Lanoix, J., Kan, F. W., et Paiement, J. (1996). Cell-free assembly of rough and smooth endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1415-1425.
- Lawe, D. C., Chawla, A., Merithew, E., Dumas, J., Carrington, W., Fogarty, K., Lifshitz, L., Tuft, R., Lambright, D., et Corvera, S. (2002). Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *J Biol Chem* 277, 8611-8617.
- Lawrence, J. B. and R. H. Singer (1986). "Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins." *Cell* 45(3): 407-15.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., et Cossart, P. (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* 65, 5309-5319.
- Lehrer, R. I., et Ganz, T. (1990). Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 76, 2169-2181.
- Li, Z., Y. Zhang, et al. (2001). "The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA." *Nucleic Acids Res* 29(11): 2276-83.
- Lichanska, A. M., et Hume, D. A. (2000). Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp Hematol* 28, 601-611.
- Lilley, B. N., et Ploegh, H. L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-840.
- Lin, W. C., et Desiderio, S. (1995). V(D)J recombination and the cell cycle. *Immunol Today* 16, 279-289.
- Lippe, R., Miaczynska, M., Rybin, V., Runge, A., et Zerial, M. (2001). Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell* 12, 2219-2228.
- Lipsky, P. E., Attrep, J. F., Grammer, A. C., McIlraith, M. J., et Nishioka, Y. (1997). Analysis of CD40-CD40 ligand interactions in the regulation of human B cell function. *Ann N Y Acad Sci* 815, 372-383.
- Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., et Gilliet, M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2, 585-589.
- Lodge, R., et Descoteaux, A. (2005). Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* 114, 256-265.

- Lu, L., et Thomson, A. W. (2002). Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation* 73, S19-22.
- Maldonado-Garcia, G., Chico-Ortiz, M., Lopez-Marin, L. M., et Sanchez-Garcia, F. J. (2004). High-polarity Mycobacterium avium-derived lipids interact with murine macrophage lipid rafts. *Scand J Immunol* 60, 463-470.
- Majeski, A. E., et Dice, J. F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2435-2444.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J., et Gerisch, G. (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 83, 915-924.
- Martin F. Flajnik, K. M., and Louis Du Pasquier (2003). Evolution of the immune system, In *Fundamental immunology*, W. E. Paul, ed. (New York: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 519-570.
- Masopust, D., et Ahmed, R. (2004). Reflections on CD8 T-cell activation and memory. *Immunol Res* 29, 151-160.
- Matsui, S., Matsumoto, S., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Watanabe, H., Ohashi, K., Mizuno, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., et Suzuki, K. (2002). LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 277, 544-549.
- Maurer, M., Echtenacher, B., Hultner, L., Kollias, G., Mannel, D. N., Langley, K. E., et Galli, S. J. (1998). The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells. *J Exp Med* 188, 2343-2348.
- McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., et Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98, 377-386.
- McCaul, T. F., et Williams, J. C. (1981). Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol* 147, 1063-1076.
- McGreal, E., et Gasque, P. (2002). Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem Soc Trans* 30, 1010-1014.
- McNeely, T. B., et Doyle, P. S. (1996). Isolation of lipophosphoglycans from *Leishmania donovani* amastigotes. *Arch Biochem Biophys* 334, 1-8.

- McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T. H., et Rothman, J. E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* *407*, 153-159.
- Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M., et Cyr, D. M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* *3*, 100-105.
- Medrano, S., et Steward, O. (2001). Differential mRNA localization in astroglial cells in culture. *J Comp Neurol* *430*, 56-71.
- Medzhitov, R. (2003). Innate immune system, In *Fundamental immunology*, W. E. Paul, ed. (New York: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 497-517.
- Mendez, R. and J. D. Richter (2001). "Translational control by CPEB: a means to the end." *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*(7): 521-9.
- Meresse, S., Unsworth, K. E., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martinez-Lorenzo, M. J., Waterman, S. R., Gorvel, J. P., et Holden, D. W. (2001). Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella. *Cell Microbiol* *3*, 567-577.
- Messmer, U. K., et Pfeilschifter, J. (2000). New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* *22*, 878-881.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., et Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* *7*, 766-772.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., et Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* *27*, 421-429.
- Mold, C., Gresham, H. D., et Du Clos, T. W. (2001). Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs. *J Immunol* *166*, 1200-1205.
- Molmeret, M., Alli, O. A., Radulic, M., Susa, M., Doric, M., et Kwaik, Y. A. (2002). The C-terminus of IcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of Legionella pneumophila within Acanthamoeba polyphaga. *Mol Microbiol* *43*, 1139-1150.
- Morel, P. A., et Feili-Hariri, M. (2001). How do dendritic cells prevent autoimmunity? *Trends Immunol* *22*, 546-547.

- Moreno, E., et Moriyon, I. (2002). *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1-3.
- Moreno, E., Speth, S. L., Jones, L. M., et Berman, D. T. (1981). Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infect Immun* 31, 214-222.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Cantoni, C., Pende, D., Mingari, M. C., et Moretta, A. (2002). Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 4, 1539-1544.
- Morrice, N. A., et Powis, S. J. (1998). A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr Biol* 8, 713-716.
- Muller, W. E., Blumbach, B., et Muller, I. M. (1999). Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates. *Transplantation* 68, 1215-1227.
- Muller-Taubenberger, A., Lupas, A. N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E., et Gerisch, G. (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *Embo J* 20, 6772-6782.
- Muslimov, I. A., M. Titmus, et al. (2002). "Transport of Neuronal BC1 RNA in Mauthner Axons." *J Neurosci* 22(11): 4293-301.
- Nagasawa, J., Douglas, W. W., et Schulz, R. A. (1970). Ultrastructural evidence of secretion by exocytosis and of "synaptic vesicle" formation in posterior pituitary glands. *Nature* 227, 407-409.
- Nakagawa, T. Y., et Rudensky, A. Y. (1999). The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 172, 121-129.
- Nandi, D., Jiang, H., et Monaco, J. J. (1996). Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol* 156, 2361-2364.
- Nash, T. W., Libby, D. M., et Horwitz, M. A. (1984). Interaction between the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) and human alveolar macrophages. Influence of antibody, lymphokines, and hydrocortisone. *J Clin Invest* 74, 771-782.
- Niedergang, F., et Chavrier, P. (2005). Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol* 291, 43-60.
- Niedergang, F., Colucci-Guyon, E., Dubois, T., Raposo, G., et Chavrier, P. (2003). ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol* 161, 1143-1150.

- Noda, T., Suzuki, K., et Ohsumi, Y. (2002). Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol* 12, 231-235.
- Nossal, G. J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76, 229-239.
- Oh, Y. K., Harding, C. V., et Swanson, J. A. (1997). The efficiency of antigen delivery from macrophage phagosomes into cytoplasm for MHC class I-restricted antigen presentation. *Vaccine* 15, 511-518.
- Okada, M., Huston, C. D., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr., Kita, K., et Nozaki, T. (2005). Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* 4, 827-831.
- Olivari, S., Galli, C., Alanen, H., Ruddock, L., et Molinari, M. (2005). A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem* 280, 2424-2428.
- Ottenhoff, T. H., Verreck, F. A., Hoeve, M. A., et van de Vosse, E. (2005). Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 85, 53-64.
- Otto, G. P., Wu, M. Y., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O. R., Hilbi, H., Shuman, H. A., et Kessin, R. H. (2004). Macroautophagy is dispensable for intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Microbiol* 51, 63-72.
- Owen, J. J., Jenkinson, E. J., Kingston, R., Williams, G. T., et Smith, C. A. (1990). Cell growth and gene rearrangement signals during the development of T lymphocytes within the thymus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327, 111-116.
- Padh, H., Ha, J., Lavasa, M., et Steck, T. L. (1993). A post-lysosomal compartment in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 268, 6742-6747.
- Palaniyar, N., Nadesalingam, J., et Reid, K. B. (2002). Pulmonary innate immune proteins and receptors that interact with gram-positive bacterial ligands. *Immunobiology* 205, 575-594.
- Palecanda, A., et Kobzik, L. (2001). Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. *Curr Mol Med* 1, 589-595.
- Paquet, M. E., Cohen-Doyle, M., Shore, G. C., et Williams, D. B. (2004). Bap29/31 influences the intracellular traffic of MHC class I molecules. *J Immunol* 172, 7548-7555.
- Patterson, S. D. (2003). Proteomics: evolution of the technology. *Biotechniques* 35, 440-444.

- Patterson, S. D., et Aebersold, R. H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 311-323.
- Paul, W. E. (2003). *Fundamental immunology*, Vol 1, 5th edn (New York: Lippincott Williams & Wilkins).
- Paul, W. E., Brown, M., Hornbeck, P., Mizuguchi, J., Ohara, J., Rabin, E., Snapper, C., et Tsang, W. (1987). Regulation of B-lymphocyte activation, proliferation, and differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 505, 82-89.
- Paulnock, D. M., Demick, K. P., et Collier, S. P. (2000). Analysis of interferon-gamma-dependent and -independent pathways of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 67, 677-682.
- Payne, N. R., et Horwitz, M. A. (1987). Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* 166, 1377-1389.
- Peters, C., Stierhof, Y. D., et Ilg, T. (1997). Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infect Immun* 65, 783-786.
- Peters, J. M. (1999). Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res* 248, 339-349.
- Peters, C., Bayer, M. J., Buhler, S., Andersen, J. S., Mann, M., et Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409, 581-588.
- Phan, U. T., Arunachalam, B., et Cresswell, P. (2000). Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). Maturation, activity, and mechanism of action. *J Biol Chem* 275, 25907-25914.
- Pham, N. K., Mouriz, J., et Kima, P. E. (2005). *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infect Immun* 73, 8322-8333.
- Pieters, J. (2001). Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 3, 249-255.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J. L., et Gorvel, J. P. (1998). Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* 66, 2387-2392.
- Plaeger-Marshall, S., Wilson, L. A., et Smith, J. W. (1983). Alteration of rabbit alveolar and peritoneal macrophage function by herpes simplex virus. *Infect Immun* 41, 1376-1379.

- Poloso, N. J., et Roche, P. A. (2004). Association of MHC class II-peptide complexes with plasma membrane lipid microdomains. *Curr Opin Immunol* 16, 103-107.
- Porte, F., Liautard, J. P., et Kohler, S. (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 67, 4041-4047.
- Porter, R. R. (1985). The complement components coded in the major histocompatibility complexes and their biological activities. *Immunol Rev* 87, 7-17.
- Prive, C., et Descoteaux, A. (2000). *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol* 30, 2235-2244.
- Quesniaux, V. J., Nicolle, D. M., Torres, D., Kremer, L., Guerardel, Y., Nigou, J., Puzo, G., Erard, F., et Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* 172, 4425-4434.
- Radsak, M., Iking-Konert, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., et Hansch, G. M. (2000). Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* 101, 521-530.
- Rafelski, S. M., et Theriot, J. A. (2004). Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem* 73, 209-239.
- Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., et Ezekowitz, R. A. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 416, 644-648.
- Rao, M., Rothwell, S. W., Wassef, N. M., Pagano, R. E., et Alving, C. R. (1997). Visualization of peptides derived from liposome-encapsulated proteins in the trans-Golgi area of macrophages. *Immunol Lett* 59, 99-105.
- Raught, B., A. C. Gingras, et al. (2000). "Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI." *Embo J* 19(3): 434-44.
- Reddien, P. W., et Horvitz, H. R. (2004). The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 193-221.

- Reiner, S. L., Zheng, S., Wang, Z. E., Stowring, L., et Locksley, R. M. (1994). *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 179, 447-456.
- Richo, G., et Conner, G. E. (1991). Proteolytic activation of human procathepsin D. *Adv Exp Med Biol* 306, 289-296.
- Roche, P. A., Hoffman, M. R., et Pizzo, S. V. (1990). Effect of interferon-gamma and human alpha 2-macroglobulin on peritoneal macrophage morphology and Ia antigen expression. *Biochim Biophys Acta* 1051, 166-173.
- Rock, K. L., Rothstein, L., Gamble, S., et Fleischacker, C. (1993). Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. *J Immunol* 150, 438-446.
- Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 5, 285-294.
- Roop, R. M., 2nd, Bellaire, B. H., Valderas, M. W., et Cardelli, J. A. (2004). Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. *Mol Microbiol* 52, 621-630.
- Roos, D., van Bruggen, R., et Meischl, C. (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 5, 1307-1315.
- Root, R. K., et Cohen, M. S. (1981). The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev Infect Dis* 3, 565-598.
- Ross, A. F., Y. Oleynikov, et al. (1997). "Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein." *Mol Cell Biol* 17(4): 2158-65.
- Roy, L., Bergeron, J. J., Lavoie, C., Hendriks, R., Gushue, J., Fazel, A., Pelletier, A., Morre, D. J., Subramaniam, V. N., Hong, W., et Paiement, J. (2000). Role of p97 and syntaxin 5 in the assembly of transitional endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 11, 2529-2542.
- Rudensky, A., et Beers, C. (2006). Lysosomal cysteine proteases and antigen presentation. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 81-95.
- Sacks, D. L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 69, 100-103.
- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., et Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., et Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.

Sallusto, F., et Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.

Sarrias, M. R., Gronlund, J., Padilla, O., Madsen, J., Holmskov, U., et Lozano, F. (2004). The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 24, 1-37.

Schlumberger, M. C., et Hardt, W. D. (2005). Triggered phagocytosis by Salmonella: bacterial molecular mimicry of RhoGTPase activation/deactivation. *Curr Top Microbiol Immunol* 291, 29-42.

Schreurs, M. W., Eggert, A. A., de Boer, A. J., Figdor, C. G., et Adema, G. J. (1999). Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 29, 2835-2841.

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

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

Scott, C. C., Botelho, R. J., et Grinstein, S. (2003). Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol* 193, 137-152.

Scott, C. C., Cuellar-Mata, P., Matsuo, T., Davidson, H. W., et Grinstein, S. (2002). Role of 3-phosphoinositides in the maturation of Salmonella-containing vacuoles within host cells. *J Biol Chem* 277, 12770-12776.

Scott, C. C., Dobson, W., Botelho, R. J., Coady-Osberg, N., Chavrier, P., Knecht, D. A., Heath, C., Stahl, P., et Grinstein, S. (2005). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol* 169, 139-149.

Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23, 197-223.

Segal, G., Purcell, M., et Shuman, H. A. (1998). Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 1669-1674.

Segal, G., Russo, J. J., et Shuman, H. A. (1999). Relationships between a new type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* *34*, 799-809.

Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., et Ireton, K. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* *103*, 501-510.

Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., et 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.

Shi, G. P., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh, H. L., et Chapman, H. A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* *10*, 197-206.

Shiina, N., K. Shinkura, et al. (2005). "A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: regulatory machinery for local translation." *J Neurosci* *25*(17): 4420-34.

Sibeliuss, U., Schulz, E. C., Rose, F., Hattar, K., Jacobs, T., Weiss, S., Chakraborty, T., Seeger, W., et Grimminger, F. (1999). Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect Immun* *67*, 1125-1130.

Silverstein, A. M. (1995). From the forehead of Zeus: the ontogeny of the immune response. *Eye* *9* (Pt 2), 147-151.

Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., et Moretta, A. (2004). CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10116-10121.

Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., et Lopez-Goni, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* *29*, 125-138.

Sontheimer, R. D., Racila, E., et Racila, D. M. (2005). C1q: its functions within the innate and adaptive immune responses and its role in lupus autoimmunity. *J Invest Dermatol* *125*, 14-23.

Sprent, J., et Surh, C. D. (2002). T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20, 551-579.

Stahl, P. D., et Ezekowitz, R. A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 10, 50-55.

Steele-Mortimer, O., Brumell, J. H., Knodler, L. A., Meresse, S., Lopez, A., et Finlay, B. B. (2002). The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol* 4, 43-54.

Stefani, G., C. E. Fraser, et al. (2004). "Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells." *J Neurosci* 24(33): 7272-6.

Steinbach, G., Koch, H., Meyer, H., et Klaus, C. (1996). Influence of prior infection on the dynamics of bacterial counts in calves experimentally infected with *Salmonella dublin*. *Vet Microbiol* 48, 199-206.

Steinhoff, G., Wonigeit, K., et Pichlmayr, R. (1988). Analysis of sequential changes in major histocompatibility complex expression in human liver grafts after transplantation. *Transplantation* 45, 394-401.

Steinman, R. M., et Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.

Steinman, R. M., et Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-5136.

Steward, O. and W. B. Levy (1982). "Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus." *J Neurosci* 2(3): 284-91.

Strzelecka-Kiliszek, A., Kwiatkowska, K., et Sobota, A. (2002). Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by Fc gamma R. *J Immunol* 169, 6787-6794.

Subtil, A., Parsot, C., et Dautry-Varsat, A. (2001). Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* 39, 792-800.

Sun, H., Shen, Y., Dokainish, H., Holgado-Madruga, M., Wong, A., et Ireton, K. (2005). Host adaptor proteins Gab1 and CrkII promote InlB-dependent entry of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 7, 443-457.

Sung, Y. J., N. Dolzhanskaya, et al. (2003). "The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo." *J Biol Chem* 278(18): 15669-78.

Suzaki, E., Kobayashi, H., Kodama, Y., Masujima, T., et Terakawa, S. (1997). Video-rate dynamics of exocytotic events associated with phagocytosis in neutrophils. *Cell Motil Cytoskeleton* 38, 215-228.

Tan, P., Kropshofer, H., Mandelboim, O., Bulbuc, N., Hammerling, G. J., et Momburg, F. (2002). Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J Immunol* 168, 1950-1960.

Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., et al. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7, 156-164.

Takei, N., M. Kawamura, et al. (2001). "Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin." *J Biol Chem* 276(46): 42818-25.

Takei, N., N. Inamura, et al. (2004). "Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites." *J Neurosci* 24(44): 9760-9.

Tang, S. J. and E. M. Schuman (2002). "Protein synthesis in the dendrite." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357(1420): 521-9.

Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J. A., Heuser, J. E., et Andrews, N. W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71, 1117-1130.

Taylor, P. R., Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., et Gordon, S. (2004). The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol* 172, 1157-1162.

Taylor, S. W., Fahy, E., et Ghosh, S. S. (2003). Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol* 21, 82-88.

Terebiznik, M. R., Vieira, O. V., Marcus, S. L., Slade, A., Yip, C. M., Trimble, W. S., Meyer, T., Finlay, B. B., et Grinstein, S. (2002). Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by Salmonella. *Nat Cell Biol* 4, 766-773.

- Thiel, S., Petersen, S. V., Vorup-Jensen, T., Matsushita, M., Fujita, T., Stover, C. M., Schwaeble, W. J., et Jensenius, J. C. (2000). Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAsp19. *J Immunol* *165*, 878-887.
- Thompson, A. G., et Thomas, R. (2002). Induction of immune tolerance by dendritic cells: implications for preventative and therapeutic immunotherapy of autoimmune disease. *Immunol Cell Biol* *80*, 509-519.
- Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G., et Roy, C. R. (2001). How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* *114*, 4637-4650.
- Tjelle, T. E., Lovdal, T., et Berg, T. (2000). Phagosome dynamics and function. *Bioessays* *22*, 255-263.
- Touret, N., Paroutis, P., et Grinstein, S. (2005). The nature of the phagosomal membrane: endoplasmic reticulum versus plasmalemma. *J Leukoc Biol* *77*, 878-885.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., *et al.* (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* *123*, 157-170.
- Trombetta, E. S., et Parodi, A. J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* *19*, 649-676.
- Turco, S. J., et Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* *46*, 65-94.
- Uchiya, K., Barbieri, M. A., Funato, K., Shah, A. H., Stahl, P. D., et Groisman, E. A. (1999). A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *Embo J* *18*, 3924-3933.
- Ullrich, H. J., Beatty, W. L., et Russell, D. G. (1999). Direct delivery of procathepsin D to phagosomes: implications for phagosome biogenesis and parasitism by *Mycobacterium*. *Eur J Cell Biol* *78*, 739-748.
- Vallejo, A. N., Davila, E., Weyand, C. M., et Goronzy, J. J. (2004). Biology of T lymphocytes. *Rheum Dis Clin North Am* *30*, 135-157.
- van Deurs, B., Holm, P. K., et Sandvig, K. (1996). Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEP-2 cells. *Eur J Cell Biol* *69*, 343-350.

van Meer, G., et Sprong, H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol* 16, 373-378.

Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., et Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14, 584-640.

Vescovi, E. G., Ayala, Y. M., Di Cera, E., et Groisman, E. A. (1997). Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg²⁺ and Ca²⁺. *J Biol Chem* 272, 1440-1443.

Via, L. E., Deretic, D., Ulmer, R. J., Hibler, N. S., Huber, L. A., et 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.

Villadangos, J. A. (2001). Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* 38, 329-346.

Villadangos, J. A. (2001). Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* 38, 329-346.

Villadangos, J. A., Schnorrer, P., et Wilson, N. S. (2005). Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol Rev* 207, 191-205.

Vogel, J. P., Andrews, H. L., Wong, S. K., et Isberg, R. R. (1998). Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279, 873-876.

Wan, Y., Wu, Y., Zhou, J., Zou, L., Liang, Y., Zhao, J., Jia, Z., Engberg, J., Bian, J., et Zhou, W. (2005). Cross-presentation of phage particle antigen in MHC class II and endoplasmic reticulum marker-positive compartments. *Eur J Immunol* 35, 2041-2050.

Wang, J. H., et Reinherz, E. L. (2002). Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol* 38, 1039-1049.

Wang, Q., et Chang, A. (2003). Substrate recognition in ER-associated degradation mediated by Eps1, a member of the protein disulfide isomerase family. *Embo J* 22, 3792-3802.

- Wardlaw, A. J., Moqbel, R., et Kay, A. B. (1995). Eosinophils: biology and role in disease. *Adv Immunol* *60*, 151-266.
- Watarai, M., Derre, I., Kirby, J., Gowney, J. D., Dietrich, W. F., et Isberg, R. R. (2001). *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med* *194*, 1081-1096.
- Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* *15*, 821-850.
- Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D., et Palmer, E. (2003). Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* *299*, 1859-1863.
- Whatmore, J., Wiedemann, C., Somerharju, P., Swigart, P., et Cockcroft, S. (1999). Resynthesis of phosphatidylinositol in permeabilized neutrophils following phospholipase C β activation: transport of the intermediate, phosphatidic acid, from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum for phosphatidylinositol resynthesis is not dependent on soluble lipid carriers or vesicular transport. *Biochem J* *341* (Pt 2), 435-444.
- Wiebe, M. E., Burton, P. R., et Shankel, D. M. (1972). Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burnetii* phase I. *J Bacteriol* *110*, 368-377.
- Wong, P., et Pamer, E. G. (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* *21*, 29-70.
- Wright, S. D., et Silverstein, S. C. (1983). Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med* *158*, 2016-2023.
- Wu, H., Yang, J. M., Jin, S., Zhang, H., et Hait, W. N. (2006). Elongation factor-2 kinase regulates autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Res* *66*, 3015-3023.
- Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J. M., Yang, D., Gong, W. H., et Yoshimura, T. (2001). Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol* *69*, 698-704.
- Yaniv, K. and J. K. Yisraeli (2002). "The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis." *Gene* *287*(1-2): 49-54.
- Yates, J. R., 3rd, Gilchrist, A., Howell, K. E., et Bergeron, J. J. (2005). Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 702-714.

- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., et Rapoport, T. A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-847.
- Yokoyama, K., Akabane, Y., Ishii, N., et Yoshida, M. (1994). Isolation of prokaryotic V0V1-ATPase from a thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* 269, 12248-12253.
- Young, P., Deveraux, Q., Beal, R. E., Pickart, C. M., et Rechsteiner, M. (1998). Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem* 273, 5461-5467.
- Yue, C. C., Reynolds, C. W., et Henkart, P. A. (1987). Inhibition of cytolysin activity in large granular lymphocyte granules by lipids: evidence for a membrane insertion mechanism of lysis. *Mol Immunol* 24, 647-653.
- Zalevsky, J., Grigorova, I., et Mullins, R. D. (2001). Activation of the Arp2/3 complex by the *Listeria acta* protein. Acta binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex. *J Biol Chem* 276, 3468-3475.
- Zalfa, F. and C. Bagni (2004). "Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the Fragile X mental retardation protein?" *Curr Issues Mol Biol* 6(2): 73-88.
- Zeger, D. L., Osman, N., Hennings, M., McKenzie, I. F., Sears, D. W., et Hogarth, P. M. (1990). Mouse macrophage beta subunit (CD11b) cDNA for the CR3 complement receptor/Mac-1 antigen. *Immunogenetics* 31, 191-197.
- Zhang, H. L., T. Eom, et al. (2001). "Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility." *Neuron* 31(2): 261-75.
- Zhang, J., Feng, Y., et Forgac, M. (1994). Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase. *J Biol Chem* 269, 23518-23523.
- Zheng, B., Han, S., Spanopoulou, E., et Kelsoe, G. (1998). Immunoglobulin gene hypermutation in germinal centers is independent of the RAG-1 V(D)J recombinase. *Immunol Rev* 162, 133-141.
- Zhong, X., Shen, Y., Ballar, P., Apostolou, A., Agami, R., et Fang, S. (2004). AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 279, 45676-45684.
- Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J. M., Hislop, A. D., Canaday, D. H., Brutkiewicz, R. R., et Blum, J. S. (2005). Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens.

Immunity 22, 571-581.

Zuber, C., Fan, J. Y., Guhl, B., et Roth, J. (2004). Misfolded proinsulin accumulates in expanded pre-Golgi intermediates and endoplasmic reticulum subdomains in pancreatic beta cells of Akita mice. *FASEB J* 18, 917-919.

