

Université de Montréal

Caractérisation moléculaire de la modulation spatio-temporelle des fonctions du phagosome

Par

Guillaume Goyette

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en pathologie et biologie cellulaire

24 avril 2009

© Guillaume Goyette 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Caractérisation moléculaire de la modulation spatio-temporelle des fonctions du
phagosome

présentée par :
Guillaume Goyette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Paiement,
président-rapporteur
Michel Desjardins, directeur de recherche
Dorin-Lucian Ghitescu, membre du jury
John J.M. Bergeron, examinateur externe
Nicole Leclerc, représentante du doyen de la FES

Résumé

La phagocytose est un processus par lequel des cellules spécialisées du système immunitaire comme les macrophages ingèrent des microorganismes envahisseurs afin de les détruire. Les microbes phagocytés se retrouvent dans un compartiment intracellulaire nommé le phagosome, qui acquiert graduellement de nombreuses molécules lui permettant de se transformer en phagolysosome possédant la capacité de tuer et dégrader son contenu. L'utilisation de la protéomique a permis de mettre en évidence la présence de microdomaines (aussi nommés radeaux lipidiques ou radeaux membranaires) sur les phagosomes des macrophages. Notre équipe a démontré que ces radeaux exercent des fonctions cruciales au niveau de la membrane du phagosome. D'abord nous avons observé que la survie du parasite intracellulaire *L. donovani* est possible dans un phagosome dépourvu de radeaux lipidiques. Parallèlement nous avons constaté qu'un mutant de *L. donovani* n'exprimant pas de LPG à sa surface (LPG-) est rapidement tué dans un phagosome arborant des radeaux membranaires.

Pour comprendre le mécanisme de perturbation des microdomaines du phagosome par la molécule LPG, nous avons provoqué la phagocytose de mutants LPG- du parasite et comparé par microscopie les différences avec le parasite de type sauvage. Nous avons ainsi démontré que le LPG de *L. donovani* est nécessaire et suffisant au parasite pour empêcher la maturation normale du phagosome. Nous avons également découvert que la molécule LPG permet d'empêcher la formation des radeaux lipidiques sur le phagosome et peut aussi désorganiser les radeaux lipidiques préexistants. Enfin, nous avons montré que l'action de LPG est proportionnelle au nombre d'unités répétitives de sucres (Gal(β 1,4)-Man α 1-PO₄) qui composent cette molécule. Nos travaux ont démontré pour la première fois le rôle important de ces sous-domaines membranaires dans la maturation du phagosome. De plus, nos conclusions seront des pistes à suivre au cours des études cliniques ayant pour but d'enrayer la leishmaniose.

Le second objectif de ce travail consistait à effectuer la caractérisation des radeaux lipidiques par une analyse protéomique et lipidomique à l'aide de la spectrométrie de masse. Nous avons ainsi entrepris l'identification systématique des protéines présentes dans les radeaux membranaires des phagosomes et ce, à trois moments clés de leur

maturation. Le traitement des phagosomes purifiés avec un détergent nous a permis d'isoler les «Detergent Resistent Membranes» (DRMs) des phagosomes, qui sont l'équivalent biochimique des radeaux membranaires. Nous avons ainsi établi une liste de 921 protéines associées au phagosome, dont 352 sont présentes dans les DRMs. Les protéines du phagosome sont partagées presque également entre trois tendances cinétiques (augmentation, diminution et présence transitoire). Cependant, une analyse plus spécifique des protéines des DRMs démontre qu'une majorité d'entre elles augmentent en fonction de la maturation. Cette observation ainsi que certains de nos résultats montrent que les radeaux lipidiques des phagosomes précoces sont soit très peu nombreux, soit pauvres en protéines, et qu'ils sont recrutés au cours de la maturation du phagosome. Nous avons aussi analysé les phospholipides du phagosome et constaté que la proportion entre chaque classe varie lors de la maturation. De plus, en regardant spécifiquement les différentes espèces de phospholipides nous avons constaté que ce ne sont pas uniquement les espèces majoritaires de la cellule qui dominent la composition de la membrane du phagosome.

L'ensemble de nos résultats a permis de mettre en évidence plusieurs fonctions potentielles des radeaux lipidiques, lesquelles sont essentielles à la biogenèse des phagolysosomes (signalisation, fusion membranaire, action microbicide, transport transmembranaire, remodelage de l'actine). De plus, la cinétique d'acquisition des protéines de radeaux lipidiques indique que ceux-ci exerceraient leurs fonctions principalement au niveau des phagosomes ayant atteint un certain niveau de maturation. L'augmentation du nombre de protéines des radeaux membranaires qui s'effectue durant la maturation du phagosome s'accompagne d'une modulation des phospholipides, ce qui laisse penser que les radeaux membranaires se forment graduellement sur le phagosome et que ce ne sont pas seulement les protéines qui sont importées.

Mots-clés : phagosome, radeaux lipidiques, radeaux membranaires, protéomique, Leishmania, immunité

Abstract

Macrophages are specialized cells of the immune system which mediate destruction and killing of invading micro-organisms. They do so by engulfing them by a process called phagocytosis. Microbes are then captured in an intracellular compartment, the phagosome, which gradually acquires molecules able to attack and degrade its cargo. Use of proteomics let us demonstrate the presence of flotillin-1 enriched microdomains (also called lipid rafts or membrane rafts) on the phagosomes. Our team demonstrated the crucial importance of these rafts in the phagocytosis process. Indeed, survival of *L. donovani* correlates with its presence in a 'raftless' phagosome while a mutated *L. donovani* without LPG is rapidly killed in a phagosome containing lipid rafts.

To understand the membrane raft destabilisation mechanism mediated the LPG molecule, we induced phagocytosis of parasites devoid of LPG (LPG-) and compared it to the wild type parasite by microscopy. We first demonstrated that LPG alone is necessary to prevent normal maturation of the phagosome. Additionally, we discovered that the LPG molecule not only inhibits lipid rafts formation on the phagosome but also disorganise pre-existing lipid rafts. This effect of LPG is proportional to the number of repetitive sugar units (Gal(β 1,4)-Man α 1-PO₄) which compose this molecule. Our work demonstrated for the first time an important role of the membrane rafts in the phagosome maturation. Moreover, our conclusions will give new interesting leads for clinical studies on leishmaniosis.

The second goal of this work was to characterise them with proteomics and lipidomics tools. To do this, we undertook the systematic identification of proteins present on both subdomains of the phagosome (lipid rafts versus the rest of the phagosomal membrane). To achieve this, we purified phagosomes, from which we isolated lipid rafts by floating Triton X-100 insoluble membranes (DRMs for Detergent Insoluble Membranes). After that, we identified proteins by mass spectrometry.

Because phagosome is not a static organelle and its protein composition is constantly changing, we did our analysis on three representative maturation time-points (early phagosomes, intermediate phagosomes and phagolysosomes). Thereby, we established a list of 921 phagosome-associated proteins including 352 associated to DRMs. These proteins have three different behaviours during phagosome maturation; some of them decrease in quantity, others increase, while the rest are transiently present. Each of these kinetic sub-groups covers about a third of the phagosome proteins, while the group where proteins are increasing during maturation is particularly abundant in DRMs. This shows that early phagosomes contain either very few lipid rafts or rafts with low amounts of proteins, and these rafts are recruited during phagosome maturation. We also analysed phospholipids of the phagosome membrane and found that the proportions of the classes changes with time. Moreover, by looking specifically to different species of phospholipids, we noticed that the main species of the cell are not necessary the most important in the phagosome membrane.

Together, these results let us discover several potential functions of the phagosome membrane rafts (signalling, membrane fusion, microbicidal processes, transmembrane transport and actin dynamics). Furthermore, kinetics of the proteins acquisition on the membrane rafts reveals that these are playing their roles mainly on matures phagosomes. This increasing number of proteins in microdomains is accompanied by a modulation of the phospholipids, which let us think that membrane rafts assemble themselves gradually on the phagosome and this is not only proteins that are imported into them.

Keywords : phagosome, lipid rafts, membrane rafts, proteomics, Leishmania, immunity

Remerciements

Je remercie mon directeur de thèse, Docteur Michel Desjardins, qui a su voir mon potentiel et m'a offert de découvrir la biologie cellulaire lors d'un stage d'été, qui a été suivi d'une maîtrise et d'un long doctorat. J'ai énormément appris, que ce soit au niveau du travail de laboratoire, du travail d'équipe, de la rédaction de textes scientifiques et de l'autonomie. Un très grand merci à Jean-François Dermine qui m'a initié aux deux projets à la base de mon travail de thèse et avec qui j'ai appris tout en m'amusant. Merci aussi à Isabelle Jutras qui m'a beaucoup aidé dans l'analyse des résultats et dans la rédaction de mon deuxième article. Merci à Jonathan Boulais, le biologiste devenu bioinformaticien pour les besoins de son projet et qui a su partager son temps et ses connaissances de programmation avec moi. Je remercie aussi Sophie Duclos pour ses conseils tout au long de mes années de doctorat et particulièrement pour la révision scientifique de cette thèse. Merci beaucoup à ma correctrice Lorraine Goyette qui a donné beaucoup de temps pour que mon texte scientifique respecte les nombreuses règles du français. Sans leur aide je n'aurais pas pu faire un travail aussi complet. Merci aussi à tous mes collègues passés : Mathieu Houde, Sylvain Brunet, Pascale Gueirard, Isabelle Morow, Étienne Gagnon, François St-Louis et mes collègues présents : Luc English, François-Xavier Campbell Valois, Magali Chemali, Matthias Trost, Peter Kong, Shayan Sadeghi, qui ont tous contribué à ce travail d'une façon ou d'une autre. Merci tout particulièrement aux deux meilleures techniciennes du monde Cristianne Rondeau et Annie Laplante sans qui le laboratoire serait beaucoup moins productif et agréable.

Un merci énorme à Marie-Eve Fortin pour sa patience, ses encouragements et son aide dans la logistique. Merci Papa et Maman pour tout votre support depuis les 29 dernières années. Un merci spécial à Denise et François Fortin pour leur aide appréciable en fin de rédaction. Merci finalement à toute ma famille et mes amis qui,

malgré toutes ces années sans savoir exactement ce que je faisais au laboratoire, m'ont encouragé sans relâche.

*Cette thèse est dédiée à Marie-Eve,
Nicolas et Éloïse, vous étiez ma
motivation pour accomplir ce travail.*

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
REMERCIEMENTS	VII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
CHAPITRE I. INTRODUCTION. REVUE DE LA LITTÉRATURE	22
INTRODUCTION	23
<i>1 La phagocytose</i>	23
1.1 Origines de la phagocytose.....	23
1.2 Mécanisme de la phagocytose	26
1.2.1 Internalisation	26
1.2.1.1 Récepteurs de la phagocytose	26
1.2.1.1.1 Récepteurs Fc	26
1.2.1.1.2 Récepteurs du complément	28
1.2.1.1.3 Récepteurs éboueurs (SRs)	29
1.2.1.1.4 Lectines.....	29
1.2.1.2 Réorganisation de l'actine	30
1.2.1.2.1 Signalisation en aval des FcγRs	30
1.2.1.2.2 Signalisation en aval du CR3	35
1.2.1.2.3 Signalisation déclenchée par les agents pathogènes	35
1.2.1.2.4 Réseau d'actine.....	36
1.2.1.3 Sources de membranes.....	38
1.2.2 Maturation du phagosome	40
1.2.2.1 Acidification du phagosome.....	40
1.2.2.2 GTPases Rab.....	40
1.3 Le protéome du phagosome	43
1.3.1 Radeaux lipidiques du phagosome.....	45
1.3.2 Implication du réticulum endoplasmique	45
1.3.3 Présentation croisée dans le phagosome.....	45
1.3.4 Gamma-sécrétase	48
1.3.5 Implication de l'exocyste dans la phagocytose	48

1.3.6 Modulation du protéome par l'interféron-gamma	49
2 <i>Leishmania</i>	51
2.1 Mise en contexte de <i>Leishmania</i>	51
2.2 Cycle de vie de <i>Leishmania</i>	51
2.2.1 Chez le mammifère	53
2.2.2 Chez le moustique	58
2.2.3 Culture des <i>Leishmania</i> en laboratoire	58
2.3 Le lipophosphoglycan (LPG).....	59
2.3.1 Structure du LPG	59
2.3.2 Mutagenèse du LPG	61
2.3.3 Fonctions du LPG.....	61
3 Les radeaux membranaires	64
3.1 Découverte des radeaux membranaires	64
3.2 Hétérogénéité des lipides à la source des radeaux membranaires.....	70
3.2.1 Les acides gras.....	72
3.2.2 Le cholestérol	72
3.2.3 Les Gangliosides	73
3.3 Structure des radeaux membranaires	73
3.3.1 Composition lipidique des radeaux membranaires.....	73
3.3.2 Composition différente des deux feuilletts de la membrane.....	75
3.3.3 Autres caractéristiques des radeaux membranaires.....	76
3.4 Partitionnement sélectif des protéines dans les radeaux membranaires	77
3.4.1 Ancres lipidiques	77
3.4.2 Protéines transmembranaires des radeaux	80
3.4.3 Protéines structurales des radeaux membranaires	83
3.4.3.1 Les cavéolines	83
3.4.3.2 Les flotillines	84
3.4.4 Méthodes d'analyse des protéines des radeaux membranaires.....	85
3.4.4.1 Isolation des DRMs	85
3.4.4.1.1 Extraction de protéines par des détergents	86
3.4.4.1.2 Immunobuvardage	89
3.4.4.1.3 Spectrométrie de masse	89
3.4.4.2 Isolation sans détergent.....	91
3.4.4.3 Microscope photonique.....	91
3.4.4.3.1 Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes.....	91
3.4.4.3.2 Suivi de particule unique	93
3.4.4.3.3 Autres méthodes de microscopie photonique	93
3.4.4.4 Microscope électronique	93
3.4.4.5 Cytométrie en flux	94

3.4.4.6 ELISA.....	96
3.5 Fonctions des radeaux membranaires	97
3.5.1 Plateforme de signalisation.....	97
3.5.2 Synapse immunologique	97
3.5.3 Fusion membranaire	98
3.5.4 Endocytose	99
3.5.6 Interactions avec les agents pathogènes	99
CHAPITRE II. INTRODUCTION. TRAVAUX DE DOCTORAT	103
BUTS, DONNÉES PRÉLIMINAIRES ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL.....	104
CHAPITRE III. RÉSULTATS ARTICLE 1	106
CHAPITRE IV. RÉSULTATS ARTICLE 2	132
CHAPITRE V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	170
DISCUSSION GÉNÉRALE	171
<i>Hétérogénéité des radeaux membranaires du phagosome.....</i>	<i>171</i>
<i>Le LPG empêche le recrutement des radeaux membranaires sur le phagosome.....</i>	<i>171</i>
<i>Le LPG désorganise les radeaux lipidiques préexistants</i>	<i>172</i>
<i>Mode d'action du LPG sur les radeaux membranaires</i>	<i>173</i>
<i>Le protéome du phagosome varie plutôt en quantité qu'en qualité.....</i>	<i>175</i>
<i>Les protéines du phagosome ont trois principaux comportements cinétiques</i>	<i>176</i>
<i>Les fonctions du phagosome sont révélées sous un nouvel angle</i>	<i>177</i>
<i>Les protéines associées aux DRMs sont distinctes du reste des protéines des phagosomes</i>	<i>179</i>
<i>Le recrutement des protéines dans les DRMs est un aspect important de la maturation du phagosome</i>	<i>180</i>
<i>Nos résultats permettent de mettre à jour le phagosome virtuel.....</i>	<i>184</i>
Fonctions microbicides.....	184
Fusion membranaire	185
Biogenèse des corps multivésiculaires	186
Régulation de l'apoptose et de l'autophagie	186
Présentation sur les CMH classe II.....	188
Présentation croisée sur les CMH classe I	188
Vésicules recouvertes de clathrine (formation et bourgeonnement).....	189
Transport transmembranaire	190
Complexe de l'exocyste	193
Remodelage de l'actine	194
<i>Les fonctions cellulaires altérées par le LPG sont dépendantes des radeaux membranaires</i>	<i>195</i>

<i>La composition en phospholipides des phagosomes est distincte de celle de la cellule.....</i>	197
CONCLUSION	199
CHAPITRE VI. BIBLIOGRAPHIE.....	201
CHAPITRE VII. ANNEXES	I
ANNEXE I. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	II
ANNEXE II. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES ARTICLE 2.....	VI
ANNEXE III. ARTICLE 3.....	XXII
ANNEXE IV. ARTICLE 4	XXIII

Liste des tableaux

CHAPITRE I. INTRODUCTION. REVUE DE LA LITTÉRATURE	22
TABLEAU 1 : PROTÉINES DE LEISHMANIA DONOVANI DIFFÉRENTIELLEMENT RÉGULÉES LORS DE SA DIFFÉRENCIATION.	57
CHAPITRE II. INTRODUCTION. TRAVAUX DE DOCTORAT	103
CHAPITRE III. RÉSULTATS ARTICLE 1	106
CHAPITRE IV. RÉSULTATS ARTICLE 2	132
CHAPITRE V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	170
CHAPITRE VI. BIBLIOGRAPHIE.....	201
CHAPITRE VII. ANNEXES	I
SUPPLEMENTARY TABLE 1. LIST OF THE 921 PHAGOSOMAL PROTEINS	XV
SUPPLEMENTARY TABLE 2. LIST OF THE 350 PROTEINS PRESENT IN PHAGOSOMAL DRMS	XVI
SUPPLEMENTARY TABLE 3 PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS FROM PCA	XVII
SUPPLEMENTARY TABLE 4 VATPASE SUBUNITS IDENTIFIED ON THE PHAGOSOME	XVIII
SUPPLEMENTARY TABLE 5 LIST OF THE PHOSPHOLIPIDS OF THE PHAGOSOME IDENTIFIED IN THE NEGATIVE IONIZATION MODE.....	XIX
SUPPLEMENTARY TABLE 6 LIST OF THE PHOSPHOLIPIDS IDENTIFIED IN THE NEGATIVE ION MODE OF THE FOURIER TRANSFORM MASS SPECTROMETER	XX
SUPPLEMENTARY TABLE 7 LIST OF THE PHOSPHOLIPIDS IDENTIFIED IN THE POSITIVE ION MODE OF THE FOURIER TRANSFORM MASS SPECTROMETER	XXI

Liste des figures

CHAPITRE I. INTRODUCTION. REVUE DE LA LITTÉRATURE	22
FIGURE 1 : ÉVOLUTION DU MÉCANISME DE LA PHAGOCYTOSE	25
FIGURE 2 : STRUCTURE DES DEUX TYPES DE RÉCEPTEURS FC	27
FIGURE 3 : MOUVEMENTS DISTINCTS DES MEMBRANES IMPLIQUÉES DURANT LA FORMATION DES DIFFÉRENTS TYPES DE PHAGOSOMES	31
FIGURE 4 : VOIES DE SIGNALISATION EN AVAL DES RÉCEPTEURS FC.....	31
FIGURE 5 : VOIES DE SIGNALISATION EN AVAL DES PRINCIPAUX RÉCEPTEURS POUR LA PHAGOCYTOSE MENANT À LA RÉORGANISATION DE L'ACTINE.....	34
FIGURE 6 : MOUVEMENT DES PSEUDOPODES ENTOURANT UNE PARTICULE OPSONISÉE PAR DES IGG.....	37
FIGURE 7 : DIFFÉRENTES SOURCES DE MEMBRANE VENANT COMPLÉTER L'APPORT DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	39
FIGURE 8 : LE PREMIER PHAGOSOME VIRTUEL PUBLIÉ EN 2001 RAPPORTAIT 140 PROTÉINES ASSOCIÉES AU PHAGOSOME	44
FIGURE 9 : MODÈLE DE LA PRÉSENTATION CROISÉE EFFECTUÉE PAR LE PHAGOSOME	47
FIGURE 10 : LE PHAGOSOME VIRTUEL DES FONCTIONS MODULÉES PAR L'INTERFÉRON- γ	50
FIGURE 11 : CYCLE DE VIE DE LEISHMANIA.....	52
FIGURE 12 : STRUCTURE DU LPG	60
FIGURE 13 : MODÈLE DES RADEAUX LIPIDIQUES PROPOSÉ PAR SIMONS ET IKONEN EN 1997	66
FIGURE 14 : LE MODÈLE DES RADEAUX LIPIDIQUES TEL QU'IL EST GÉNÉRALEMENT ACCEPTÉ AUJOURD'HUI.	68
FIGURE 15 : CLASSES DE LIPIDES IMPORTANTS.....	71
FIGURE 16 : LA STRUCTURE D'UNE ANCRE GPI EN TROIS DOMAINES	79
FIGURE 17 : LA MEMBRANE DES RADEAUX LIPIDIQUES EST PLUS ÉPAISSE	82
FIGURE 18 : PRINCIPES DE LA SOLUBILISATION PAR LES DÉTERGENTS	88
FIGURE 19 : PRINCIPALES COMPOSANTES D'UN SYSTÈME DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE	90
FIGURE 20 : QUELQUES MÉTHODES D'ANALYSE DES RADEAUX LIPIDIQUES	90
FIGURE 21 : DE NOMBREUSES BACTÉRIES UTILISENT LES PROPRIÉTÉS DES RADEAUX MEMBRANAIRES POUR INFECTER LES CELLULES DE MAMMIFÈRES	102
CHAPITRE II. INTRODUCTION. TRAVAUX DE DOCTORAT	103
CHAPITRE III. RÉSULTATS ARTICLE 1	106
FIG. 1. MULTIPLE DOMAINS ON THE PHAGOSOME MEMBRANE.	112
FIG. 2. LPG PREVENTS THE RECRUITMENT/FORMATION OF GM1-ENRICHED MICRODOMAINS.	115
FIG. 3. LPG PREVENTS THE RECRUITMENT OF GM1 TO PHAGOSOMES BY A DIRECT ACTION ON THE MEMBRANE.....	119

FIG. 4. LPG DISRUPTS PREEXISTING PHAGOSOME MICRODOMAINS BY PROMOTING THEIR DISASSEMBLY RATHER THAN BY ALTERING THEIR PROTEIN COMPOSITION.	121
CHAPITRE IV. RÉSULTATS ARTICLE 2	132
FIGURE 1. THE PHAGOSOME PROTEOME DIFFER NOT ONLY WITH MATURATION BUT ALSO BETWEEN DIFFERENT MEMBRANE SUBDOMAINS	153
FIGURE 2. VALIDATION OF THE PEPTIDE COUNTING APPROACH	154
FIGURE 3. SPATIO-TEMPORAL PROFILING OF PHAGOSOME PROTEINS.....	156
FIGURE 4. DYNAMICS OF THE LIPID-RAFT INTERACTOME DURING PHAGOSOME MATURATION.	158
FIGURE 5. VIRTUAL PHAGOSOME.	160
FIGURE 6. LIPIDOMICS ANALYSIS OF THE TOTAL CELL LIPIDS (TCL).....	162
FIGURE 7. LIPIDOMICS ANALYSIS OF THE PHAGOSOME MATURATION.	164
CHAPITRE V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	170
CHAPITRE VI. BIBLIOGRAPHIE.....	201
CHAPITRE VII. ANNEXES	I
SUPPLEMENTARY FIGURE 1. SPATIO-TEMPORAL PROFILING OF PHAGOSOME FUNCTIONAL GROUPS OF PROTEINS.	IX
SUPPLEMENTARY FIGURE 2. WESTERN-BLOT VALIDATION OF PROTEINS IDENTIFIED IN LIPID RAFTS.	X
SUPPLEMENTARY FIGURE 3. FUNCTIONAL CLUSTERIZATION IN THE PHAGOSOME MEMBRANE.	XII
SUPPLEMENTARY FIGURE 4. ALTERATION OF PHAGOSOME FUNCTIONS BY LEISHMANIA.....	XIV

Liste des abréviations

ABC	ATP Binding Casette
ABC	ATP-binding cassette transporter
Acs14	Acyl-CoA synthetase 4
ADP	Adénosine diphosphate
Ankfy 1	Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1
ANT2	Adenine nucleotide translocator 2
APH-1	Anterior Pharynx-Defective 1
APP	Amyloid Precursor Protein
ARP2/3	Actin-related protein 2/3
Asah1	Acid ceramidase
ASCT2	ASC-like Na(+)-dependent neutral amino acid transporter
ATP	Adénosine triphosphate
B2m	Beta-2 microglobulin
CbG	Cyclic b-1-2-glucan
CHMP4B	Charged multivesicular body protein 4b
CHTX	Cholera Toxin B subunit
Ckap5	Cytoskeleton-associated protein 5
CMC	Concentration micellaire critique
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CR	Complement Receptor
CRP	C-reactive protein
DRMs	Detergent Resistant Membranes
DSMs	Detergent soluble membranes
EEA1	Early Endosome Antigen 1
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport)

FcgR	Récepteur Fcg
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAPDH	Plyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gba	Glucosylceramidase precursor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GILT	Lysosomal thiol reductase
GLUT1	Glucose transporter type 1
GM1	Monosialotetrahexosylganglioside
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPI-APs	GPI anchored protein
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Hémagglutinine d'influenza
HRP	HorseRadish Peroxidase
ICAT	Isotope-coded affinity tag
ICAT	Isotope-coded affinity tags
IgG	Immunoglobulines de type G
IL-1	Interleukine 1
IL-2R	Récepteur de l'interleukine 2
INF-g	Interféron-gamma
Ipa	Invasion plasmid antigens
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
LAMP1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LAMP2	Lysosomal-Associated Membrane Protein 2
LC3	MAP1A/1B light chain 3 B

LFA1	Leukocyte Function Associated antigen 1
LIMP-2	Lysosome membrane protein 2
Lipa	Lysosomal acid lipase 1
LPG	lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharide
LR8	Tolerance-related and induced transcript protein
LRG-47	Interferon inducible protein 1
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1
MARCO	Macrophage Receptor with COllagenous structure
MbCD	Méthyl- β -cyclodextrine
MBL	Mannan-binding lectin
ME	Microscope électronique
MHC	Major histocompatibility complex
MHC II li	Major Histocompatibility Class II-associated invariant chain
mLPG	LPG métacyclique
MPT	Mitochondrial permeability transition
MS	Mass Spectrometer
MVBs	MultiVesicular Bodies
Myosin hc	Myosin heavy chain
Myosin lc	Myosin light chain
NCTN	Nicastrin
NPC2	Niemann Pick type C2
Otase	Leucyl-cystinyl aminopeptidase
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidyl choline
PCA	Protein-fragment complementation assay
PE	Phosphatidyl ethanolamine
PEN-2	Presenilin ENhancer 2
PG	Phosphatidyl glycerol

PHB	Domaine d'homologie à la prohibitine
PI	Phosphatidyl inositol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PrP	Prion Protein
PrPsc	Prion Protein scrapie-isoform
Prx-4	Peroxiredoxin 4
PS	Phosphatidyl serine
PtdIns(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-biphosphate
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PTdIns4P	Phosphatidylinositol-4-phosphate
PTP	Permeability transition pore
PTP	Phosphotyrosine phosphatase
RabGDI	Rab GDP-Dissociation Inhibitor
RE	Réticulum endoplasmique
RELISA	Raft ELISA
RPC	Redundant peptide count
SbV	Antimoine pentavalent
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SERCA2	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum calcium ATPase 2
SH2	Src Homology 2
SHP-1	Src Homology domain Protein 1
SILAC	Stable isotope labelling with amino acids in cell culture
SM	Sphigomyeline
SMACs	Supra-Molecular Activation Complexes
SNAREs	Soluble N-ethylmaleimide sensitive Attachment protein REceptors)
SNAT	Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporter 1
SNR	Signal Noise Ratio

SPT	Single Particle Tracking
SR	Scavenger Receptor
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
T3SS	Type 3 Secretion System
TCL	Total cell lysate
TCR	T-Cell Receptor
Tf-R	Récepteur de la transferrine
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR7	Toll-like receptor 7
TM	Total membranes
Tmp 14	Tripartite motif protein 14
TMP21-1	21 kDa transmembrane-trafficking protein
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
V-ATPase	Pompe adénosine triphosphatase vacuolaire
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

**CHAPITRE I. INTRODUCTION. REVUE DE LA
LITTÉRATURE**

Introduction

1 La phagocytose

1.1 Origines de la phagocytose

Pour un immunologiste, la phagocytose est l'ingestion et la destruction de particules étrangères envahissantes, par exemple une bactérie, par une cellule. Cependant, pour le biologiste cellulaire, le mécanisme de la phagocytose est un processus d'internalisation de particules de plus de 0,5 μm impliqué dans le système immunitaire ainsi que la phagotrophie et le remodelage cellulaire. On distingue la phagocytose de l'endocytose (internalisation de particules de moins de 0,5 μm , généralement à l'aide d'un échafaudage de clathrine) et de la macropinocytose (engouffrement de fluide extracellulaire formant des macropinosomes pouvant excéder 5 μm) (Swanson, 2008). L'archétype de la première cellule ayant des capacités de phagocytose est l'amibe *Dictyostelium discoideum*, un organisme unicellulaire qui se nourrit par phagocytose (phagotrophie). La fonction de phagocytose est présente dans une grande variété de cellules, et ce, dans tous les organismes du règne animal exception faite de la levure (Groves et al., 2008). Dans les organismes pluricellulaires, la phagocytose peut être accomplie aussi bien par les phagocytes professionnels (exemples : neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) que par les phagocytes non professionnels (exemples : cellules épithéliales, fibroblastes, cellules endothéliales). La principale différence entre ces deux sous-groupes de cellules est principalement l'efficacité du processus de phagocytose liée à la présence de récepteurs spécifiques à la surface des phagocytes professionnels.

La fonction de remodelage cellulaire qui comprend l'enlèvement, la dégradation et le recyclage des cellules apoptotiques est le type le plus commun de phagocytose puisqu'environ 200 milliards de cellules sont ainsi recyclées chaque jour (Metzstein et al., 1998). Les phagocytes non professionnels, qui ne circulent pas dans l'organisme,

ne contribuent pratiquement qu'à ce type de phagocytose tandis que les macrophages et autres phagocytes professionnels s'occupent aussi de libérer l'organisme des particules envahissantes telles que les bactéries. À la suite de son internalisation, la particule se retrouve dans le phagosome, une organelle nouvellement formée, qui va acquérir des propriétés dégradatives lors de sa maturation en phagolysosome. Cette dégradation, qui chez l'amibe permet de récupérer des nutriments à partir de sa proie, a évolué dans les organismes pluricellulaires en un processus d'immunité innée permettant de tuer et de dégrader les bactéries pathogènes (figure 1a-b). De plus, à partir des vertébrés de la classe des chondrichthyens (*Chondrichthyes*), la phagocytose a un nouveau rôle dans l'immunité. Certains peptides dérivés de l'agent pathogène sont alors chargés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et sont ensuite présentés à la surface pour induire une réponse immunitaire adaptative, beaucoup plus spécifique que l'immunité innée (figure 1c). En fait, la phagocytose est vraiment à la croisée des chemins entre l'immunité innée et l'immunité acquise (Jutras and Desjardins, 2005).

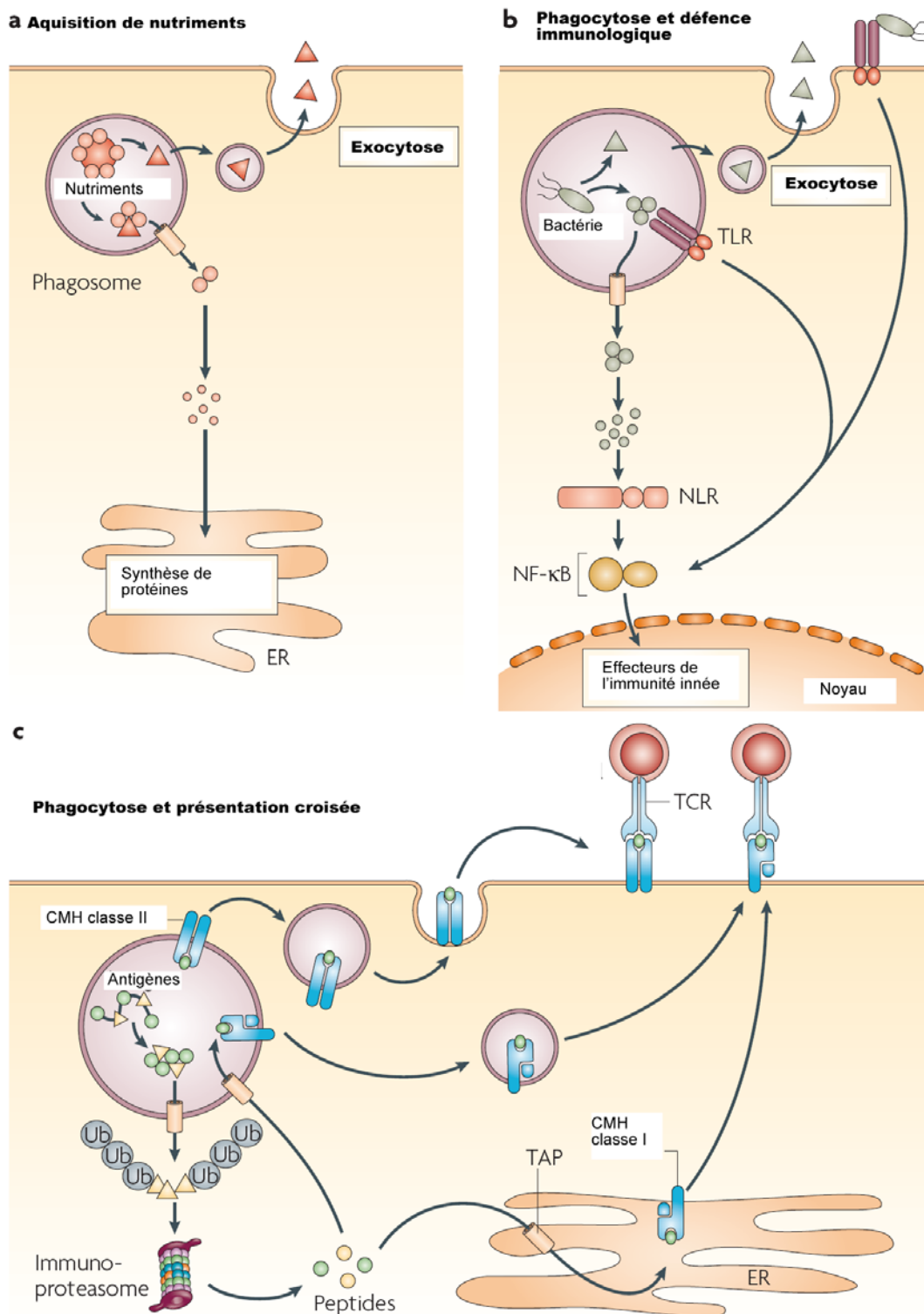


Figure 1 : Évolution du mécanisme de la phagocytose

A) La phagocytose a d'abord servi à l'alimentation des amibes. B) Elle a évolué pour combattre les agents pathogènes par des mécanismes de l'immunité innée. C) ainsi que de l'immunité adaptative (adapté de Stuart and Ezekowitz, 2008).

1.2 Mécanisme de la phagocytose

1.2.1 Internalisation

1.2.1.1 Récepteurs de la phagocytose

La reconnaissance de la particule à phagocyter est la première étape de la phagocytose. Celle-ci est médiée par une variété de récepteurs à la surface du phagocyte, lesquels lient la particule directement ou indirectement (par l'intermédiaire des opsonines). Quelques-uns de ces récepteurs sont aptes à déclencher la phagocytose tandis que d'autres semblent seulement lier la particule à phagocyter pour augmenter l'efficacité de l'internalisation. Il y a quatre principales classes de récepteurs de la phagocytose : i) les récepteurs Fc; ii) les récepteurs du complément; iii) les récepteurs « éboueurs » (SR pour *Scavenger Receptor*); et iv) les lectines (Underhill and Ozinsky, 2002).

1.2.1.1.1 Récepteurs Fc

Les corps étrangers qui se retrouvent dans la circulation sanguine peuvent être opsonisés par des immunoglobulines, principalement celles de type G (IgG), qui constituent 75 % des immunoglobulines dans le sérum humain (Junqueira et al., 1975). Les récepteurs Fc γ (s) reconnaissent et lient la région nommée fragment cristallisable (Fc) des IgG. Les phagocytes tels que les macrophages ou les neutrophiles expriment différentes combinaisons de Fc γ Rs qui font simultanément la reconnaissance de la particule opsonisée. Il y a deux catégories de Fc γ Rs, les activateurs et les inhibiteurs. D'un côté, il y a les Fc γ Rs contenant un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) dans leur domaine intracellulaire et qui recrutent des kinases qui activent une cascade de phosphorylation (Fc γ RI, Fc γ RIIA et Fc γ RIIIA). Par opposition, Fc γ RIIB contient un motif ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) qui recrute des phosphatases qui inhibent le signal de phagocytose (Ravetch and Bolland, 2001) (figure 2). Les taux relatifs d'expression des Fc γ Rs activateurs et inhibiteurs permettent donc de faire varier le seuil nécessaire pour déclencher la phagocytose en réponse à des particules opsonisées par des IgG.

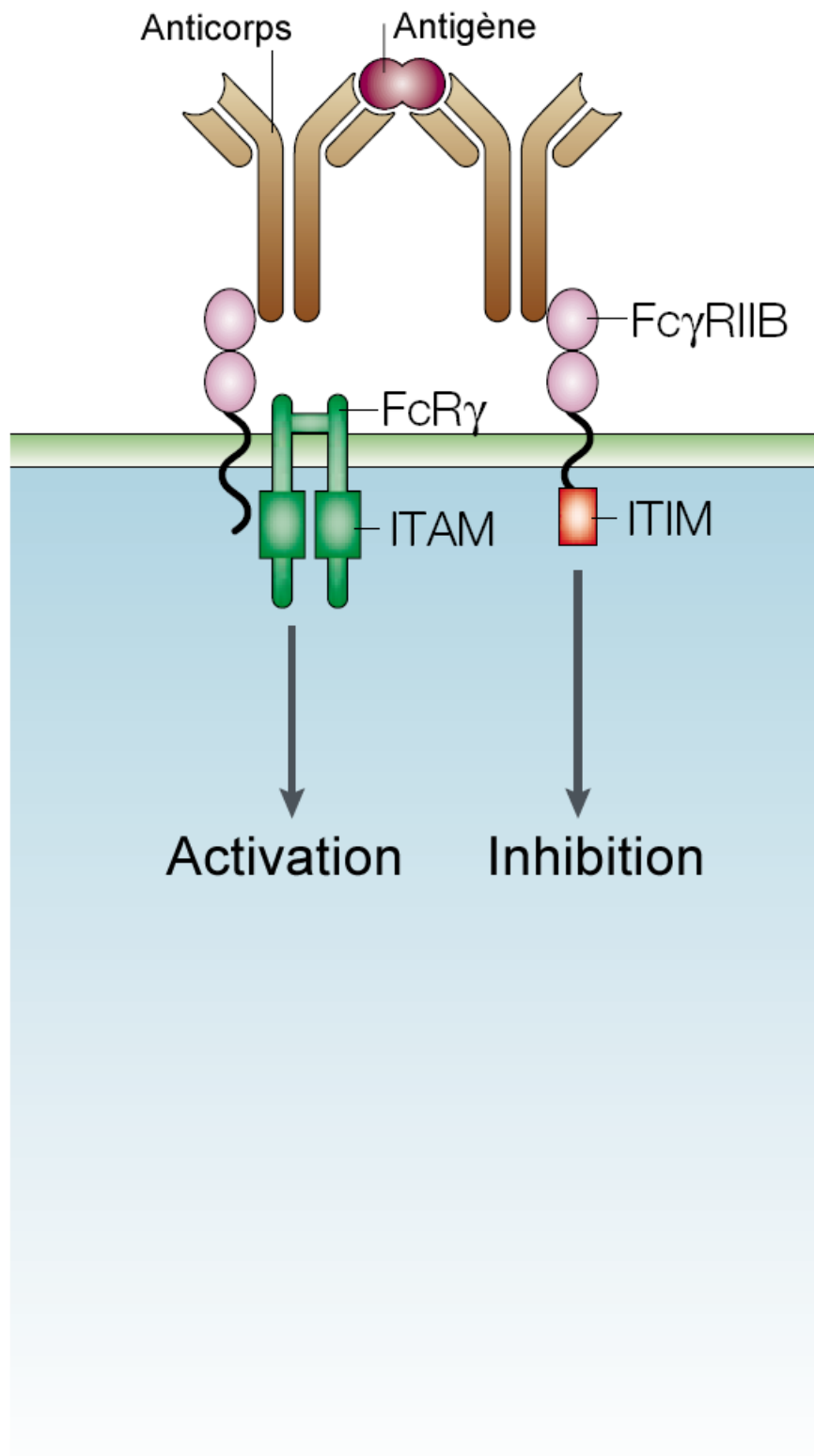


Figure 2 : Structure des deux types de récepteurs Fc (adapté de Takai, 2002)

1.2.1.1.2 Récepteurs du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines circulantes ou membranaires du sang, principalement sécrétées par le foie. Initialement, le rôle qu'on leur reconnaissait était de compléter l'action des immunoglobulines sériques, d'où leur nom. Les particules étrangères peuvent être opsonisées par les protéines du complément et ainsi être reconnues par des récepteurs spécifiques au complément (CR pour *Complement Receptor*). Les CRs impliqués dans la phagocytose incluent CR1, CR3 (ou intégrine $\alpha M\beta_2$ ou CD11b/CD18 ou Mac1) et CR4 (intégrine $\alpha_X\beta_2$ ou CD11c/CD18 ou gp150/95).

CR1 est une molécule constituée d'un domaine transmembranaire, d'un large domaine extracellulaire de reconnaissance du ligand et d'une petite queue intracellulaire. Ce récepteur reconnaît les protéines C1q, C4b et C3b du complément ainsi que d'autres opsonines comme la *mannan-binding lectin* (MBL). CR1 ne peut pas, à lui seul, déclencher l'internalisation d'une particule sans autres signaux, mais l'activation de CR1 agit de façon synergique avec la signalisation provenant des Fc γ Rs (Ghiran et al., 2000). Les CR3 et CR4 sont des hétérodimères constitués d'une chaîne bêta commune (CD18) couplée à une chaîne alpha spécifique, CD11b et CD11c respectivement. Tous deux reconnaissent l'opsonine iC3b. Ils ont aussi besoin d'autres signaux pour induire la phagocytose de particules opsonisées. L'étape d'activation nécessaire pour déclencher la phagocytose par les CRs peut être induite par des cytokines inflammatoires (*Tumor Necrosis Factor alpha*, TNF α), par des molécules microbiennes (lipopolysaccharide, LPS) ou par l'adhésion avec un autre récepteur (fibronectine). Cette préactivation augmente le nombre de CR3 à la surface ainsi que leur affinité (Jones et al., 1998; Sengelov et al., 1993). De plus, la co-ligation des récepteurs du complément et des récepteurs Fc est bien connue pour produire des effets coopératifs dans le cadre de la phagocytose (Underhill and Ozinsky, 2002).

1.2.1.1.3 Récepteurs éboueurs (SRs)

Deux membres de la famille des SRs ont été impliqués dans la liaison et l'internalisation des microbes, SR-A et MARCO (*Macrophage Receptor with Collagenous structure*). SR-A est un homotrimère transmembranaire qui lie directement les composantes bactériennes telles que la paroi cellulaire, l'acide teichoïque et le LPS. MARCO lie une variété de particules incluant les bactéries Gram-positives, les bactéries Gram-négatives ainsi que des particules artificielles comme le latex (Palecanda et al., 1999; van der Laan et al., 1999). Contrairement au Fc γ R ou au CR3 qui permettent de reconstituer la phagocytose lorsqu'on les transfecte dans une cellule non-phagocytaire, SR-A et MARCO ne confèrent qu'une capacité de liaison aux bactéries, sans permettre une internalisation significative. Pour que la phagocytose ait lieu par l'intermédiaire de ces récepteurs, il faut sans doute la participation de co-récepteurs (Underhill and Ozinsky, 2002).

1.2.1.1.4 Lectines

Les phagocytes des mammifères expriment une grande variété de lectines de surface qui permettent la reconnaissance des sucres du soi ou du non-soi. Le récepteur du mannose (qui lie le α -mannane) et dectine-1 (qui lie le β -glucane) peuvent médier la phagocytose de la levure ou du zymosan (paroi cellulaire de la levure, composée principalement de mannoprotéines/ α -mannanes et de β -glucanes) (Brown and Gordon, 2001; Ezekowitz et al., 1990). De nombreuses observations ont permis de déterminer que le récepteur du mannose est suffisant pour lier et induire la phagocytose d'une particule (Underhill and Ozinsky, 2002). Dectine-1 a aussi été reconnue comme suffisante pour déclencher la phagocytose du zymosan. Par contre, dectine-1 n'est pas le seul récepteur des β -glucanes pour la phagocytose, car CR3 a aussi une haute affinité pour ce sucre (Ross, 2000).

1.2.1.2 Réorganisation de l'actine

1.2.1.2.1 Signalisation en aval des Fc γ Rs

Lors de la phagocytose médiée par les Fc γ Rs, le phagosome est formé par l'avancée de pseudopodes guidés par les récepteurs, à la manière d'une fermeture éclair, d'où le nom dans la littérature du *zipper model* (figure 3). Dans ce type de phagocytose, la membrane est apposée intimement à la surface de la particule et c'est cette dernière qui détermine la forme du phagosome (Swanson, 2008) (figure 6a). Une fois que la particule est liée aux récepteurs de surface du phagocyte, une polymérisation localisée et transitoire de l'actine est nécessaire pour accomplir l'internalisation. La réorganisation de l'actine est régulée par des voies de signalisation activées en aval des récepteurs liés.

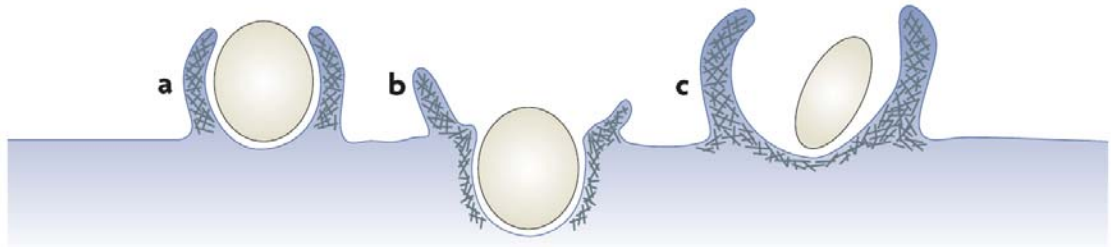


Figure 3 : Mouvements distincts des membranes impliquées durant la formation des différents types de phagosomes

A) La fermeture éclair est induite par les FcγRs. B) La particule s'enfonce dans la cellule lors de la phagocytose médiée par CR3. C) La phagocytose déclenchée par des facteurs de croissance forme un macropinosome (adapté de Swanson, 2008).

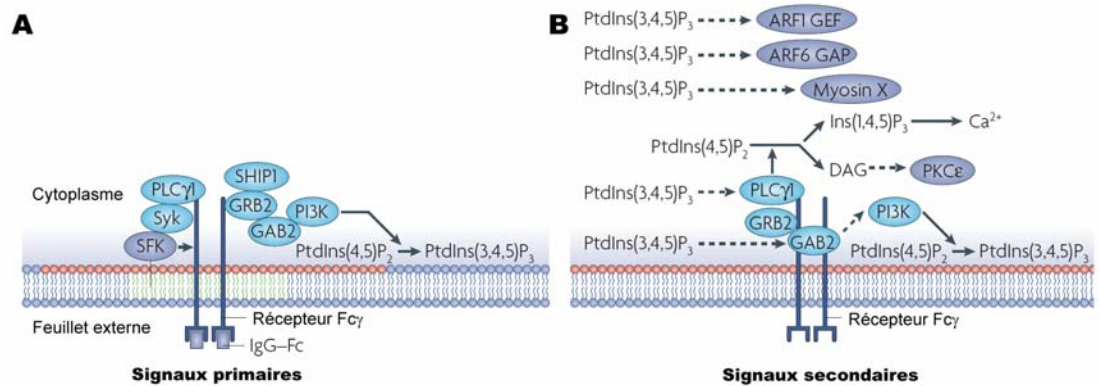


Figure 4 : Voies de signalisation en aval des récepteurs Fc

A) Protéines recrutées sur le domaine ITAM à la suite de l'activation des FcγRs et qui provoquent la production de PtdIns(3,4,5)P₃ B) Signaux secondaires induits par le PtdIns(3,4,5)P₃. (adapté de Swanson, 2008)

La phosphorylation des résidus tyrosines du motif ITAM des Fc γ R_s activateurs s'effectue très rapidement après la liaison des complexes antigènes-IgG. Cette phosphorylation effectuée par des tyrosines kinases de la famille Src (exemple : Lyn) est essentielle pour la polymérisation de l'actine qui s'ensuit (Ghazizadeh and Fleit, 1994). L'action des kinases est facilitée par le regroupement des Fc γ R_s dans des microdomaines membranaires enrichis de cholestérol (*lipid rafts*) dont nous parlerons en détail dans le chapitre 3 (Sobota et al., 2005). Il y a aussi des récepteurs autres que les Fc γ R_s ayant des domaines ITAM, comme dectine-1, qui peuvent déclencher le remodelage de l'actine. Une fois qu'ils sont phosphorylés, les résidus tyrosines servent de site d'amarrage pour les protéines ayant un domaine d'homologie à Src de type 2 (SH2 pour *Src Homology 2*). Une des protéines à domaine SH2 importante dans le cadre de la phagocytose est la protéine kinase Syk, sans laquelle les cellules ne peuvent pas internaliser des particules opsonisées par IgG (Kiefer et al., 1998). Lorsqu'activée, Syk permet à son tour aux protéines adaptatrices GRB2 et GARB2 ainsi qu'à la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) de se joindre au complexe de signalisation. La majorité des formes de phagocytose et de macropinocytose requièrent la PI3K, qui génère le phosphatidylinositol phosphorylé en positions 3, 4 et 5 sur son groupement inositol [PtdIns(3,4,5)P₃] ainsi que le PtdIns(3,4)P₂ à partir de PtdIns(4,5)P₂ et de PTdIns4P respectivement (Swanson, 2008). Par la suite, le PtdIns(3,4,5)P₃ permet l'activité des protéines ARF1 GEF, des protéines ARF6 GAP, de la myosine X et de la phospholypase C γ 1 (PLC γ 1) dans les membranes de la coupe phagocytaire (figure 4).

Une famille d'effecteurs parmi les plus importantes dans le contrôle de la réorganisation de l'actine est celle des Rho GTPases. Lorsqu'activées et liées au GTP, les protéines de cette famille interagissent avec d'autres effecteurs, ce qui a pour effet de recruter le complexe Arp2/3 et d'activer la polymérisation de l'actine (figure 5). L'activité des facteurs d'échange des nucléotides guanyliques (GEF pour *Guanine nucleotide Exchange Factor*) est requise pour l'activité des protéines Rho. Les GEFs catalysent l'échange du GDP pour un GTP, faisant ainsi passer la protéine Rho de la

forme inactive à la forme active. Parmi les protéines Rho, Cdc42 et Rac1 sont les mieux caractérisées et démontrent des activités complémentaires essentielles au processus de la phagocytose. Cdc42, sous sa forme active, s'accumule sur le bout des pseudopodes qui s'étirent pour englober la particule, et ce, surtout en début de phagocytose. Rac1 est plutôt distribuée tout autour de la coupe phagocytaire durant la fermeture du phagosome (Hoppe and Swanson, 2004). Un rôle supplémentaire à la base du phagosome a été proposé pour Rac2, une autre Rho GTPase (Yamauchi et al., 2004). La protéine Vav, une RacGEF, est une autre protéine impliquée dans le contrôle de l'actine qui s'accumule sur les coupes phagocytaires médiées par le Fc γ R, mais pas par le CR3. Les nombreuses différences dans la régulation de l'actine à partir de ces deux récepteurs ont amené les chercheurs à classer ces deux processus en deux modes de phagocytose : le type I (Fc γ R, dépendant de Cdc42/Rac) et le type II (CR3, dépendant de Rho). La phagocytose de type I correspond en fait au mécanisme de la fermeture éclair. Quant à la phagocytose de type II, elle a été décrite comme un mécanisme n'impliquant pas ou peu de pseudopodes, et au cours duquel la particule « coule » ou « sombre » (*sink*) dans la cellule (Kaplan, 1977).

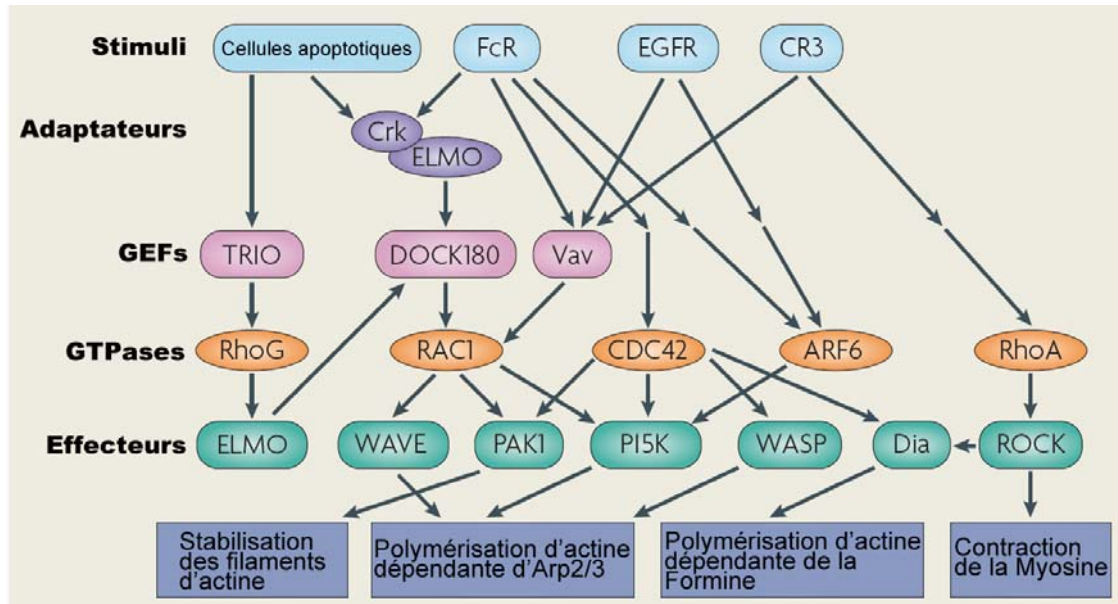


Figure 5 : Voies de signalisation en aval des principaux récepteurs pour la phagocytose menant à la réorganisation de l'actine (adapté de Swanson, 2008)

1.2.1.2.2 Signalisation en aval du CR3

Comme il a été mentionné plus haut, contrairement à la phagocytose dépendant des FcγRs, la phagocytose déclenchée par CR3 n'est pas constitutivement active et nécessite une préactivation. La petite GTPase Rap1 est suffisante pour faire cette préactivation en augmentant la capacité de liaison du récepteur aux particules couvertes de C3bi (Caron et al., 2000). Cette GTPase est elle-même activée par des médiateurs inflammatoires comme le TNFα. On a longtemps pensé que, contrairement à ce qui se passe lors de la phagocytose par les FcγRs, lorsque le signal provient de CR3, ni les tyrosines kinases ni Cdc42 ou Rac ne sont impliquées dans la signalisation subséquente. Certains résultats récents ont cependant contredit ce dogme et la validité de ce modèle est encore débattue (Swanson, 2008). Une autre protéine de la famille Rho, RhoA, est exclusivement impliquée lors de la phagocytose par le CR3 (Caron and Hall, 1998) (figure 5). L'assemblage des filaments d'actine (F-actine) induit par RhoA ne forme pas un réseau continu au pourtour de la coupe phagocytaire comme avec Cdc42/Rac1, mais plutôt des points focaux de F-actine et d'autres protéines du cytosquelette (Allen and Aderem, 1996).

1.2.1.2.3 Signalisation déclenchée par les agents pathogènes

En plus de la phagocytose déclenchée par le phagocyte, il y a aussi la possibilité que la phagocytose soit promue par la bactérie envahissante elle-même. En effet, certaines bactéries pathogènes qui sont équipées pour survivre après leur internalisation ont développé deux principaux moyens pour provoquer cette entrée. La phagocytose peut être déclenchée par les bactéries *Salmonella* et *Shigella* qui manipulent la signalisation de l'hôte en y injectant des effecteurs par leur système de sécrétion de type 3 (T3SS pour *Type 3 Secretion System*), ce qui provoque leur « naufrage » dans la cellule d'une façon semblable à la phagocytose de type II. La bactérie *Listeria monocytogenes* interagit avec l'hôte à l'aide de ses adhésines InlA et InlB, ce qui provoque son internalisation par le mécanisme de la fermeture éclair (type 1) (Groves et al., 2008).

1.2.1.2.4 Réseau d'actine

L'actine se concentre principalement dans les pseudopodes qui s'allongent et elle persiste jusqu'à la fermeture du phagosome (figure 6b). Le réseau de F-actine et des protéines contractiles associées créent une contraction qui permet l'entrée active de la particule (Swanson et al., 1999). Plusieurs classes de myosines sont impliquées dans la phagocytose médiée par Fc γ R, incluant les myosines 1C, II, IX et X (Swanson, 2008) (figure 6c). Le mécanisme précis de la fermeture de la coupe phagocytaire n'est pas connu, mais nécessite probablement la constriction de ses extrémités pour ne plus former qu'une petite ouverture, suivie d'une scission qui sépare le phagosome de la membrane plasmique.

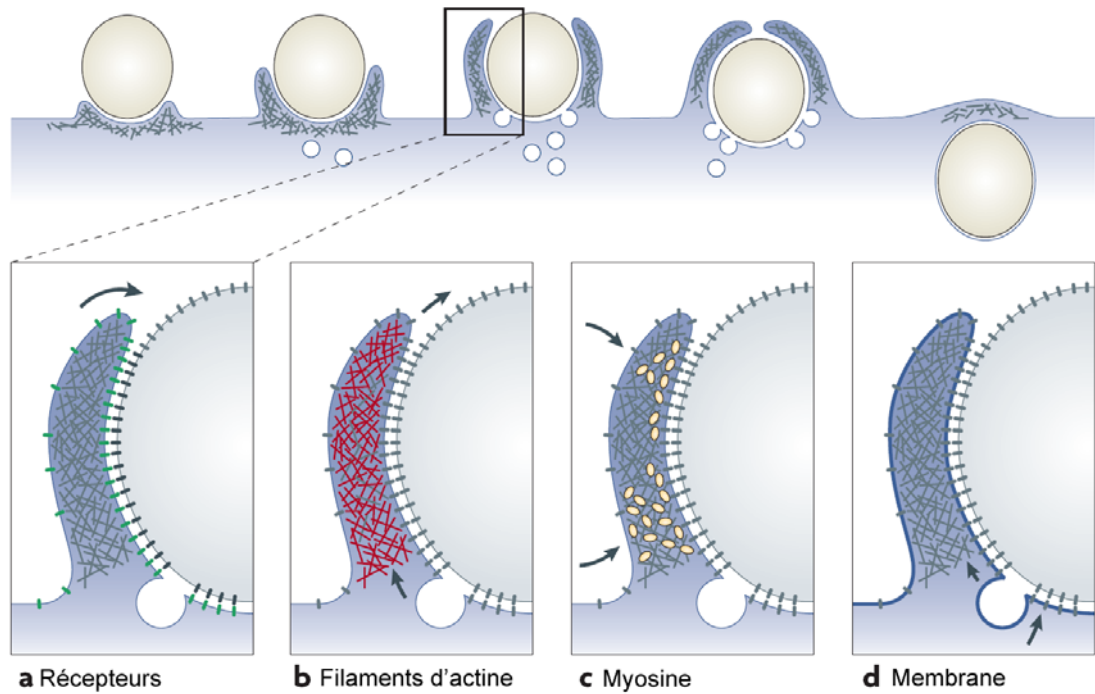


Figure 6 : Mouvement des pseudopodes entourant une particule opsonisée par des IgG

A) Les $Fc\gamma R$ s permettent à la membrane de suivre la particule. B) Le réseau de F-actine permet de soutenir le pseudopode en formation. C) La myosine permet l'activité contractile de la coupe phagocytaire qui entraîne l'internalisation de la particule (adapté de Swanson, 2008).

1.2.1.3 Sources de membranes

La phagocytose de grosses particules nécessite, en plus de la contribution de la membrane plasmique, la contribution des membranes des organelles intracellulaires. La membrane du phagosome est donc fournie à des degrés variables à partir des endosomes de recyclage (Niedergang et al., 2003), des endosomes tardifs (Huynh et al., 2007b), des lysosomes (Czibener et al., 2006; Tardieux et al., 1992), des granules azurophiles (Suzaki et al., 1997) ainsi que du réticulum endoplasmique (Gagnon et al., 2002) (figure 7).

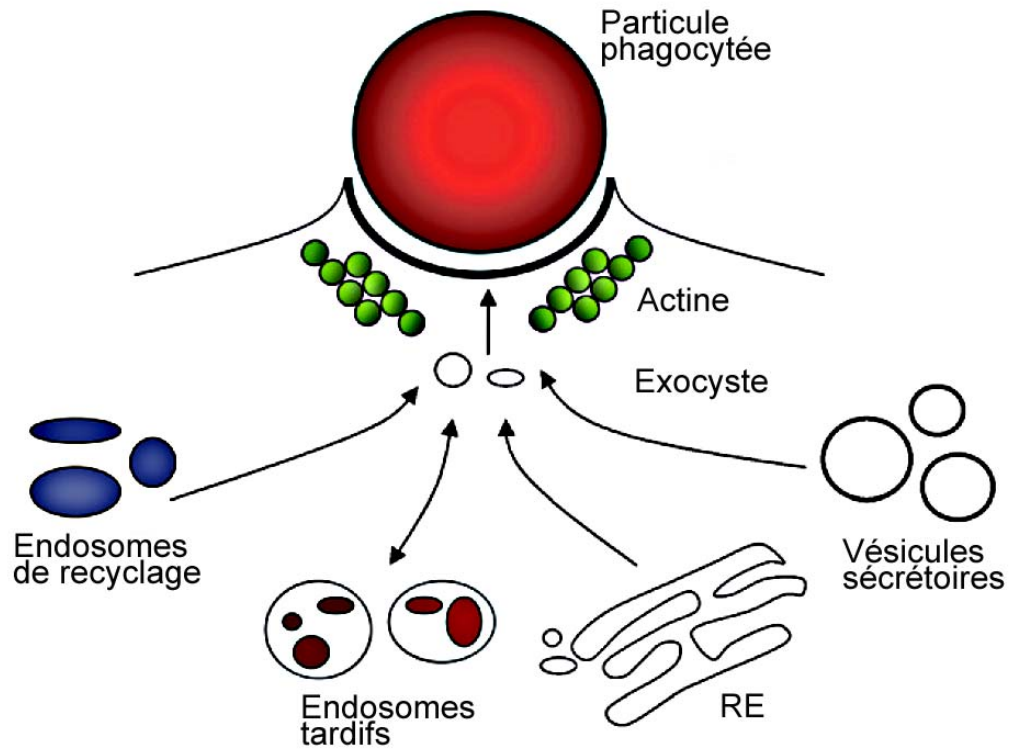


Figure 7 : Différentes sources de membrane venant compléter l'apport de la membrane plasmique (adapté de Groves et al., 2008)

1.2.2 Maturation du phagosome

1.2.2.1 Acidification du phagosome

La maturation du phagosome peut être considérée comme la dernière étape du processus de la phagocytose, et c'est à cette étape que la bactérie ou la cellule apoptotique ingérée est dégradée. Les analyses du phagosome à différents moments ont révélé que la vacuole phagocytaire évolue dans la cellule en passant par une série de stades menant à son acidification progressive et éventuellement à sa fusion avec les lysosomes pour former le phagolysosome. Durant ces étapes d'acidification, le cargo se dissocie des récepteurs, qui peuvent être recyclés, et la membrane phagosomiale acquiert successivement les petites GTPases rab5 et rab7 (Rink et al., 2005). Cette acidification est essentielle à la maturation, car c'est seulement lorsque le pH dans la lumière du phagosome est assez bas que les protéases acidiqes de la famille des cathepsines deviennent actives et jouent leur rôle majeur dans la dégradation de la particule (Lennon-Dumenil et al., 2002). L'acidification du phagosome survient en deux étapes. D'abord, une acidification précoce diminue légèrement le pH (Hackam et al., 1997) puis la pompe adénosine triphosphatase vacuolaire (V-ATPase) est recrutée au phagosome et accélère le processus (Beyenbach and Wiczorek, 2006). La V-ATPase est un complexe de 12 à 14 sous-unités réparties en deux structures : le complexe V_1 (sous-unités A à H) qui accomplit l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP), et le complexe V_0 (sous-unités a, c, c' et d) qui transporte des protons vers l'intérieur du phagosome. L'énergie tirée de l'hydrolyse de l'ATP permet à la V-ATPase de transporter les ions H^+ contre leur gradient de concentration.

1.2.2.2 GTPases Rab

La famille des protéines Rab regroupe des protéines qui lient soit la guanosine triphosphate (GTP) ou la guanosine diphosphate (GDP); elles se retrouvent, de ce fait, dans le vaste groupe des GTPases, tout comme les Rho. Elles sont très importantes dans le transport vésiculaire, particulièrement dans l'endocytose et la phagocytose.

Ces protéines ont un rôle d'interrupteur moléculaire. Dans leur conformation inactive, les protéines Rab sont liées à la GDP et restent dans le cytoplasme en complexe avec un inhibiteur de dissociation de la GDP (RabGDI pour *Rab GDP-Dissociation Inhibitor*) (Ullrich et al., 1994). Un événement de signalisation provoque la relâche de la protéine Rab par la RabGDI, ce qui expose la queue prénylée de la Rab, lui permettant alors de se lier à la membrane (du phagosome, pour les Rabs qui nous intéressent). Les GTPases Rab peuvent ensuite interagir avec un GEF, ce qui va provoquer l'échange du GDP pour du GTP. La protéine rab maintenant active peut alors lier des protéines effectrices (Grosshans et al., 2006) qui vont permettre l'exécution de la maturation du phagosome. Les principales Rabs impliquées dans la maturation du phagosome sont rab5 et rab7 (Desjardins et al., 1994b).

Rab5 est surtout impliquée dans la fusion homotypique des endosomes, mais on la retrouve transitoirement sur les phagosomes précoces. Son recrutement est fait par la protéine EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) qui elle-même se lie aux endosomes et aux phagosomes précoces grâce à son domaine d'interaction au PtdIns(3,4,5)P₃ (Lawe et al., 2002). La présence de rab5 et de protéines de la famille des SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive Attachment protein REceptors*) sur le phagosome permet d'accomplir la fusion entre les phagosomes nouvellement refermés et les endosomes précoces. La fusion entre le phagosome et l'endosome n'est pas complète, ce serait plutôt un mécanisme transitoire de fusion/fission permettant l'échange sélectif de molécules entre la lumière des deux vésicules (Desjardins, 1995; Desjardins et al., 1997; Duclos and Desjardins, 2000). Ce mécanisme nommé le '*kiss and run*' n'est pas propre aux phagosomes, mais se retrouve aussi dans la biogenèse des lysosomes (Duclos et al., 2003). On sait que l'alternance entre les formes GDP et GTP de rab5 permet de contrôler cette fusion transitoire puisque les macrophages exprimant de façon stable un mutant de Rab5 défectueux dans son activité GTPasique forment des phagosomes géants résultant de la fusion complète avec les endosomes (Duclos and Desjardins, 2000).

La mobilisation des effecteurs de rab5, dont rabenosyn-5 (Nielsen et al., 2000) contribue également au recrutement de rab7. Le mécanisme précis de la mobilisation de rab7 sur le phagosome n'est pas connu, mais un modèle propose que rab5 soit échangée par rab7 lors d'un processus appelé la conversion des rabs (Rink et al., 2005). Dès qu'il est positif pour rab7, le phagosome devient apte à passer aux étapes suivantes de sa maturation incluant la fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes (Roberts et al., 2006; Vieira et al., 2003).

La fusion efficace du phagosome avec les vésicules endocytaires ainsi qu'une acidification appropriée ont des implications capitales pour la fonction la plus évoluée des phagosomes : la présentation antigénique. Une autre petite GTPase, rab27a, a aussi un rôle dans la maturation du phagosome, rôle qui a été récemment démontré dans ce contexte (Jancic et al., 2007). L'arrivée de NOX2, une NADPH oxidase qui génère des dérivés réactifs de l'oxygène et qui dépend de rab27a, permet de réduire l'acidification du phagosome. La perte de rab27a mène à une suracidification du phagosome, ce qui réduit grandement l'efficacité de la présentation antigénique.

LAMP1 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*) et LAMP2 sont des glycoprotéines spécifiquement localisées sur les lysosomes (Eskelinen et al., 2003) et sont recrutées sur le phagosome lors de sa maturation. Leur fonction précise n'est pas encore élucidée, mais cette fonction semble importante, du moins chez le nématode *Caenorhabditis elegans* dans les dernières étapes de la phagocytose. En leur absence, la maturation du phagosome est arrêtée avant d'acquérir Rab7 (Huynh et al., 2007a).

Comme certains agents pathogènes arrivent à utiliser la machinerie phagocytaire pour entrer, survivre ou se répliquer à l'intérieur de l'hôte, comprendre les différentes étapes de la maturation du phagosome pourrait être la clé pour l'élaboration de thérapies.

1.3 Le protéome du phagosome

L'utilisation de microbilles de polystyrène (souvent appelées billes de latex) a permis d'établir un protocole afin d'effectuer l'isolement des phagosomes de macrophages (Desjardins 1994a). Une approche protéomique haut débit a ensuite été utilisée pour obtenir une liste de plus de 140 protéines associées à cette organelle (Garin et al., 2001). Cette première étude à grande échelle du protéome du phagosome n'a pas abordé les fonctions ou la régulation de ces protéines dans le cadre de la maturation, mais a permis le développement d'un modèle descriptif des joueurs impliqués (figure 8).

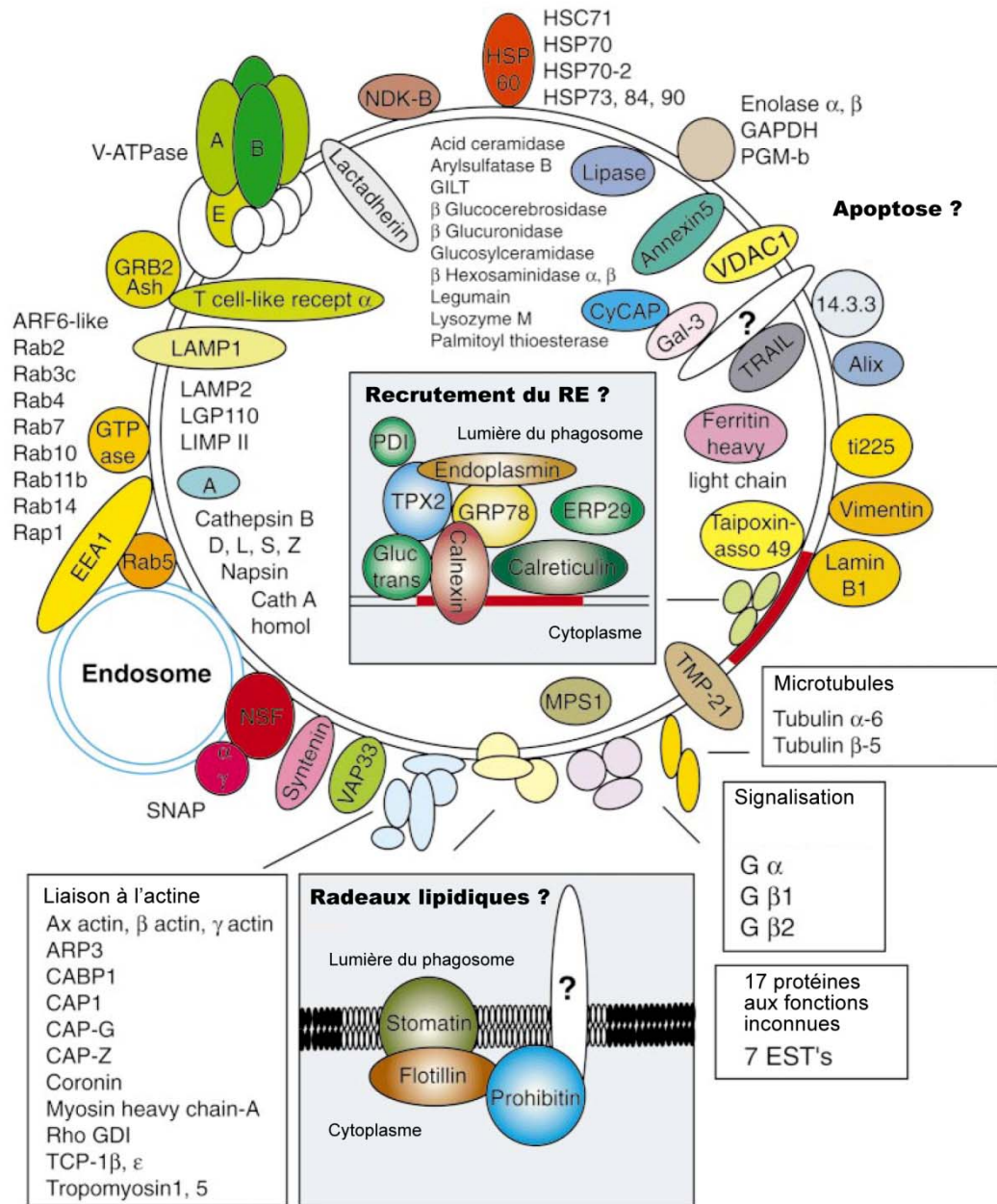


Figure 8 : Le premier phagosome virtuel publié en 2001 rapportait 140 protéines associées au phagosome (adapté de Garin et al., 2001).

1.3.1 Radeaux lipidiques du phagosome

La liste des protéines, générée par spectrométrie de masse, a permis d'établir des hypothèses sur les fonctions du phagosome dont certaines étaient jusque-là insoupçonnées. D'abord, la présence de flotilline-1, de stomatine et de prohibitine a permis à notre équipe de déterminer que la membrane des phagosomes comprend des microdomaines membranaires ayant les propriétés caractéristiques des radeaux lipidiques décrits sur la membrane plasmique (Dermine et al., 2001; Simons and Ikonen, 1997). L'isolement biochimique de ces microdomaines a permis de déterminer qu'ils ségréuaient un sous-ensemble de protéines dont la V-ATPase, l'actine et les sous-unités α , $\beta 1$ et $\beta 2$ des protéines G hétérotrimériques (Dermine et al., 2001).

1.3.2 Implication du réticulum endoplasmique

Par suite de la découverte de protéines typiquement associées au réticulum endoplasmique (RE) dans l'étude protéomique (exemple : calnexine, calréticuline), notre laboratoire a émis l'hypothèse d'une implication de cette organelle dans la phagocytose (Garin et al., 2001). Une étude plus fonctionnelle impliquant beaucoup de microscopie a permis de formuler un modèle de phagocytose où la membrane du RE fusionne avec la membrane plasmique au moment de la formation du phagosome (Gagnon et al., 2002). Cette source de membrane serait utilisée, selon ce modèle, lorsque les particules internalisées sont trop grandes pour que la membrane plasmique soit suffisante à elle seule.

1.3.3 Présentation croisée dans le phagosome

La découverte de l'apport du RE comme source de membrane du phagosome offre des implications vraiment intéressantes puisque le phagosome pourrait disposer de certaines fonctions qu'on pensait propres au RE. Par la suite, une étude, dont les résultats nous ont stupéfiés, a démontré que, grâce à la machinerie moléculaire obtenue du RE, le phagosome est autosuffisant pour accomplir la présentation croisée

d'antigènes exogènes sur les CMH de classe 1 (article III en annexe, Houde et al., 2003) (figure 9).

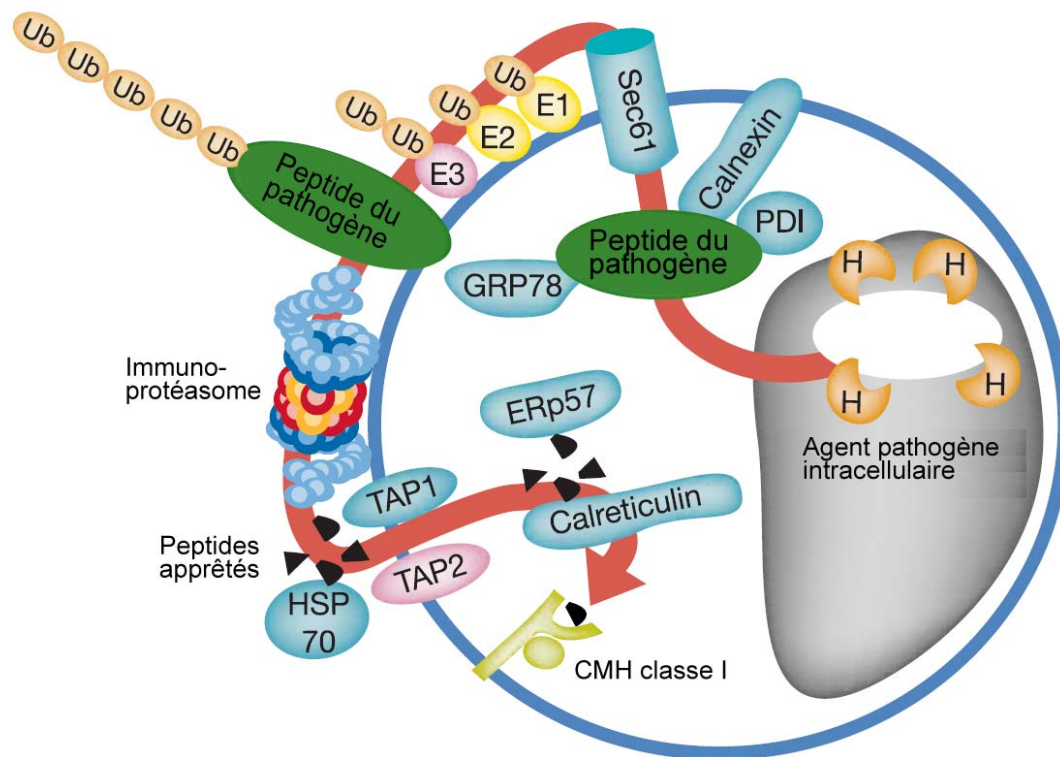


Figure 9 : Modèle de la présentation croisée effectuée par le phagosome (adapté de Houde et al., 2003)

1.3.4 Gamma-sécrétase

La gamma-sécrétase (γ -sécrétase) est un complexe de plusieurs sous-unités ayant des activités spécifiques de protéolyse. Lui-même intégral à la membrane, ce complexe clive certaines protéines transmembranaires à l'intérieur même du domaine transmembranaire. Le substrat le plus connu de la γ -sécrétase est la protéine précurseur de l'amyloïde (APP pour *Amyloid Precursor Protein*) qui, lorsque clivée, produit un court peptide, le bêta-amyloïde, dont la forme anormalement repliée est impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Selkoe and Kopan, 2003). Deux des substrats de la γ -sécrétase avaient déjà été décrits comme étant associés à la membrane du phagosome (Leemans et al., 2003; Ogden et al., 2001). Les analyses protéomiques chez la souris et la drosophile ont permis de démontrer la présence de quatre composants de la γ -sécrétase [préséniline, nicastrine, APH-1 (*Anterior Pharynx-Defective 1*), et PEN-2 (*Presenilin ENhancer 2*)] qui y sont fonctionnels (Jutras et al., 2005). D'une manière intéressante, ces protéines restent abondantes sur le phagosome tout au long de sa maturation, contrairement aux marqueurs précoces qui décroissent (exemple : Rab5) et aux marqueurs lysosomiaux qui croissent (exemple : LAMP1). Une observation encore plus captivante a été que les sous-unités de la γ -sécrétase se retrouvent avec flotilline-1 dans les radeaux lipidiques des phagosomes (Jutras et al., 2005).

1.3.5 Implication de l'exocyste dans la phagocytose

Un développement récent a émergé de l'étude protéomique des phagosomes des cellules phagocytaires S2 de la mouche *Drosophila melanogaster* (Stuart et al., 2007). Plusieurs sous-unités du complexe de l'exocyste, une machinerie multi-moléculaire qui dirige des vésicules sécrétoires vers la membrane plasmique, ont été identifiées sur le phagosome. Les membranes des vésicules d'exocytose semblent donc également impliquées dans la formation du phagosome. D'ailleurs, les sous-unités de l'exocyste s'avèrent importantes dans le processus de la phagocytose, car lorsqu'on diminue leur

expression par ARN interférent, la phagocytose des bactéries diminue de façon significative (article IV en annexe, Stuart et al., 2007).

1.3.6 Modulation du protéome par l'interféron-gamma

Au cours d'une autre étude protéomique, nous sommes allés plus loin et nous sommes penchés sur la modulation des fonctions du phagosome par la cytokine inflammatoire interféron-gamma (INF- γ). Ayant isolé des phagosomes de macrophages traités ou non à l'INF- γ , notre équipe a quantifié la différence d'expression des protéines entre ces deux conditions. Nous avons ainsi observé que 167 protéines phagosomiales sont régulées en présence de l'INF- γ , dont plus de 90 % qui sont surexprimées (Jutras et al., 2008). Les protéines du phagosome dont l'expression est la plus augmentée par cette cytokine font partie des groupes impliqués dans les fonctions microbicides (exemples : NADPH oxydase, V-ATPase), la fusion membranaire (exemples : syntaxine-7, syntaxine-13, rab7), la signalisation (exemple : GTPases) et la présentation antigénique (exemples : protéasome, CMH-I)(Jutras et al., 2008) (figure 10).

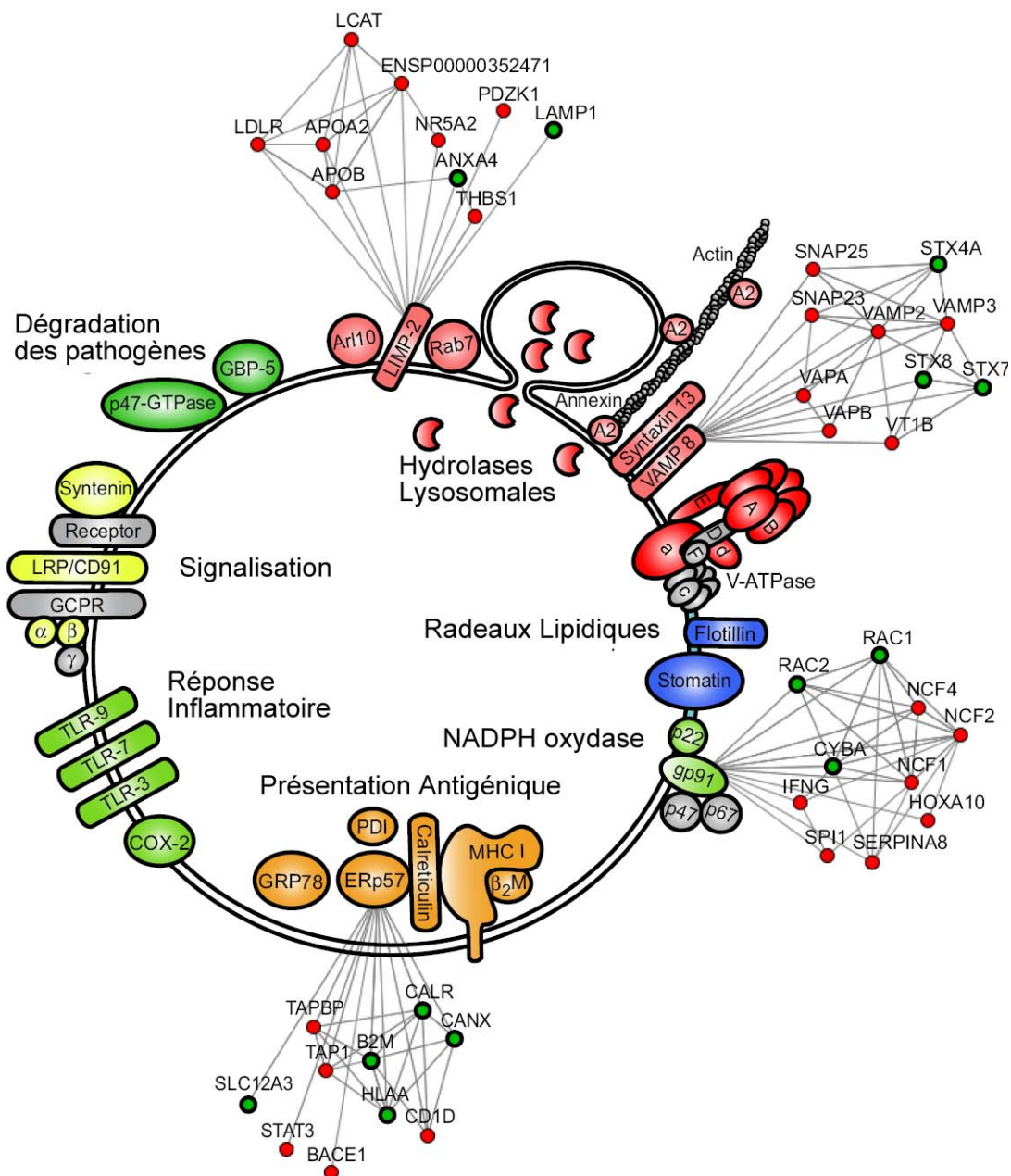


Figure 10 : Le phagosome virtuel des fonctions modulées par l'interféron- γ
(adapté de Jutras et al., 2008)

2 Leishmania

2.1 Mise en contexte de *Leishmania*

Leishmania est un parasite protozoaire de l'ordre des kinétoplastidés, qui comprend entre autres *Trypanosoma brucei*, agent de la maladie du sommeil, et *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas. Les différentes espèces de *Leishmania* infectent plus de 15 millions de personnes, et on dénombre deux millions de nouveaux cas chaque année (Herwaldt, 1999). Elles sont responsables de maladies dans un large spectre de sévérité, allant de l'affection cutanée relativement contenue à la manifestation viscérale progressive qui peut être fatale. Dans ce dernier cas, *L. donovani*, l'agent de la leishmaniose viscérale (Kala-azar), se dissémine et infecte les macrophages du foie, de la rate et de la moelle épinière (Lodge and Descoteaux, 2008).

Il n'existe pas encore de vaccins efficaces pour prévenir la maladie, et les tentatives de contrôle du vecteur sont, pour l'instant, restées sans succès. Le traitement des infections dues à ce parasite repose donc essentiellement sur la chimiothérapie. La pharmacopée disponible contre *Leishmania* est limitée et le traitement prescrit en première intention est un composé à base d'antimoine pentavalent (SbV), une molécule utilisée depuis plus de 50 ans (Ouellette et al., 2003).

2.2 Cycle de vie de *Leishmania*

Le parasite intracellulaire du genre *Leishmania* est un protiste ayant un cycle de vie en deux stades puisqu'il subit de nombreux changements en passant d'un de ses hôtes obligatoires à l'autre. La forme flagellée (promastigote, allongée et mobile) de *Leishmania* se retrouve chez les moustiques de la sous-famille des *Phlebotominae* tandis que la forme aflagellée (amastigote, arrondie et non mobile) se retrouve chez les mammifères (rongeurs, canidés, humains) (Alexander and Russell, 1992) (figure 11).

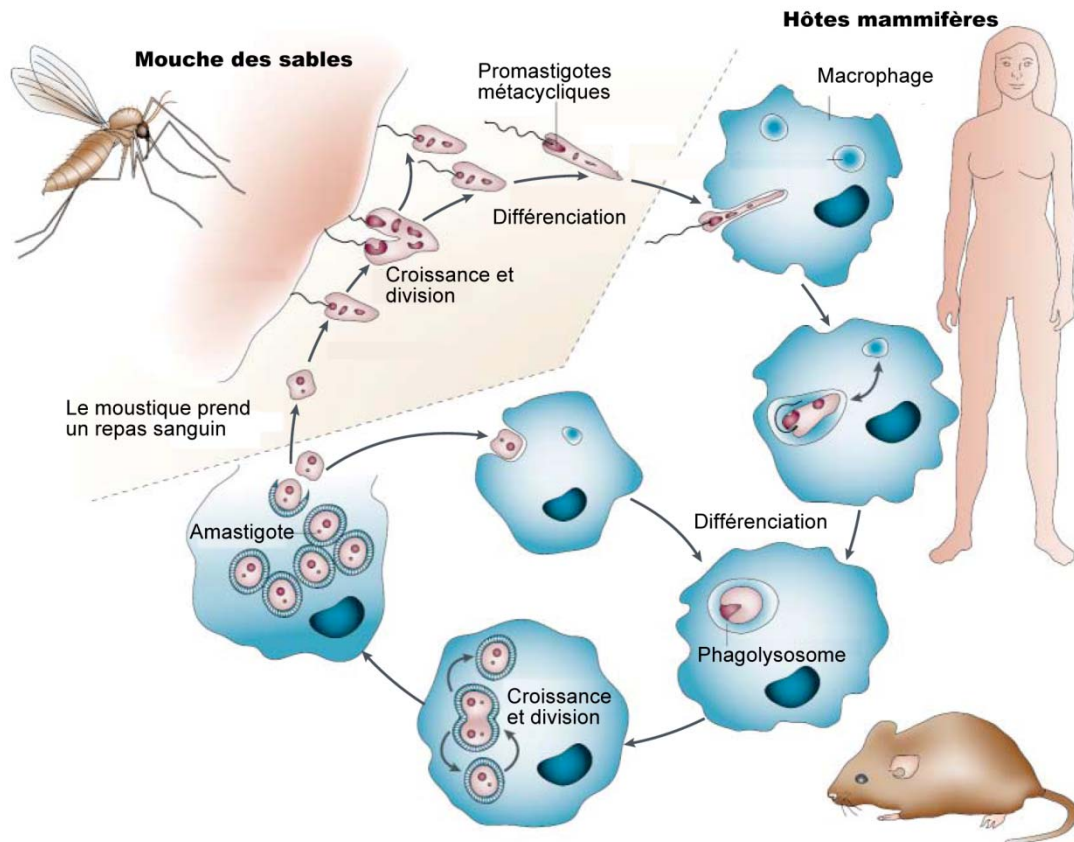


Figure 11 : Cycle de vie de *Leishmania*
(adapté de Sacks and Noben-Trauth, 2002)

2.2.1 Chez le mammifère

Lors de son repas sanguin, le moustique infecté relâche des *Leishmania* promastigotes sous leur forme virulente (promastigotes métacycliques) dans le derme du mammifère. Les parasites peuvent alors se retrouver dans la circulation sanguine de leur nouvel hôte où ils subissent l'assaut du système du complément. La molécule de lipophosphoglycan (LPG) de *Leishmania* lui permet de résister aux mécanismes lytiques du complément en empêchant l'insertion du complexe C5b-9 (MAC) dans sa membrane (Puentes et al., 1990). De plus, chez *L. donovani*, la protéase de surface gp63 coupe le C3b en un fragment inactif, l'iC3b, qui recouvre alors le parasite et facilite sa capture par la voie de CR3. Ce mode de capture est avantageux pour le promastigote puisqu'il n'active pas la cascade lytique du complément (Brittingham et al., 1995; Mosser and Brittingham, 1997) ni la flambée oxydative (Wright and Silverstein, 1983). L'internalisation de *Leishmania* peut aussi se faire via d'autres récepteurs, dont les récepteurs à mannose-fucose (Wilson and Pearson, 1986) et les récepteurs de la protéine C-réactive (CRP pour *C-reactive protein*) (Culley et al., 1996) qui ne déclenchent pas l'activation des macrophages et, par conséquent, favorisent la survie du parasite (Astarie-Dequeker et al., 1999; Bodman-Smith et al., 2002; Wilson and Pearson, 1986). Le LPG est impliqué dans la reconnaissance du parasite par les récepteurs du macrophage, mais n'est pas essentiel à la liaison puisque les parasites mutants, qui sont déficients pour cette molécule, sont phagocytés aussi efficacement, si non plus, que le type sauvage (McNeely and Turco, 1990).

Une fois dans le phagosome, les promastigotes utilisent des mécanismes pour en perturber la maturation. Une étude de Michel Desjardins et d'Albert Descoteaux a montré que l'inhibition de la fusion phagosome-endosome par *Leishmania* contribue à sa survie (Desjardins and Descoteaux, 1997). Contrairement aux endosomes précoces, les interactions des phagosomes contenant *L. major* ou *L. donovani* avec les endosomes tardifs sont inhibées (Dermine et al., 2000; Desjardins and Descoteaux, 1997), et le recrutement des protéines tardives du phagosome telles que Rab7 et LAMP1 est différé (Holm et al., 2001; Scianimanico et al., 1999). Cette inhibition

semble être uniquement dépendante du domaine des unités répétitives du LPG puisque les phagosomes contenant des promastigotes exprimant une forme tronquée du LPG viennent à maturation normalement (Desjardins and Descoteaux, 1997; Scianimanico et al., 1999). L'environnement favorable non acide, qui est ainsi maintenu plus longtemps, permet aux promastigotes d'initier leur différenciation en amastigotes. Cette inhibition n'est pas commune à toutes les espèces de *Leishmania*. *L. amazonensis* se retrouve plus rapidement dans les phagolysosomes (Courret et al., 2002) tandis que *L. mexicana* arrive à se différencier en amastigote et à survivre dans le phagosome même sans l'aide de son LPG (Ilg et al., 2001). Il est à noter que *L. amazonensis* et *L. mexicana* résident à plusieurs dans de larges vacuoles parasitophores contrairement à *L. donovani* et *L. major* qui sont seules dans des phagosomes serrés (Antoine et al., 1998).

L'augmentation de la température et la baisse du pH à l'intérieur du phagosome sont les principaux facteurs qui déclenchent la différenciation du promastigote en amastigote (Zilberstein and Shapira, 1994). Durant cette phase, les *Leishmania* doivent accomplir une grande adaptation, car elles changent d'environnement à trois niveaux : i) d'un organisme poïkilotherme à un organisme homéotherme; ii) d'un insecte à un mammifère; iii) d'un mode de vie extracellulaire à un mode de vie intracellulaire (Bente et al., 2003).

Contrairement à la forme promastigote et à bien d'autres agents pathogènes, la forme amastigote peut résister aux conditions défavorables des phagolysosomes. On a en effet observé que les phagosomes contenant *L. donovani* possèdent des marqueurs d'endosomes tardifs et de lysosomes tels que les cathepsines, les peptidases, le CMH de classe II et LAMP1 (Lang et al., 1994; Prina et al., 1990; Russell et al., 1992). Cette augmentation de la résistance n'est manifestement pas due au glycocalyx riche en LPG, car cette protection se retrouve chez les promastigotes et non chez les amastigotes (Pimenta et al., 1991). La survie des amastigotes dans les phagolysosomes est principalement attribuée aux diverses enzymes qu'ils expriment telles que la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase qui sont capables de

neutraliser les composés oxydatifs toxiques produits dans les phagolysosomes des macrophages lors de la flambée oxydative (Channon and Blackwell, 1985). Une autre façon, pour les amastigotes, de survivre à l'intérieur des macrophages consiste à inhiber les voies de signalisation de la cellule hôte en vue de perturber certaines fonctions cellulaires. Chez les cellules infectées par *Leishmania*, on a observé une diminution de la réponse de la cellule au LPS, à l'IFN- γ et à certains activateurs de la protéine kinase C (PKC) (Descoteaux et al., 1991; Ray et al., 2000).

Les autres transformations associées à la différenciation des *Leishmania* ont été étudiées par des analyses génomiques. Les résultats combinés de nombreuses études montrent qu'il y a un très petit nombre de gènes différentiellement exprimés (0,2 % à 5 %) entre la forme promastigote et la forme amastigote (Cohen-Freue et al., 2007). Ceci s'explique par la particularité du génome de *Leishmania* d'être pratiquement exprimé de façon constitutive. En effet, il ne semble pas exister de régulation au niveau de l'initiation de la transcription, mais essentiellement une régulation post-transcriptionnelle (Ouellette et al., 2003). Par la suite, les équipes cherchant à caractériser les différences entre les deux stades de *Leishmania* se sont tournées vers la protéomique. Les premières études protéomiques utilisant la méthode du gel 2D ont permis de faire une première caractérisation spécifique au stade pour les espèces *L. infantum* (Acestor et al., 2002; El Fakhry et al., 2002), *L. donovani* (Bente et al., 2003), *L. mexicana* (Nugent et al., 2004) et *L. panamensis* (Walker et al., 2006). En moyenne, 200 taches ont été analysées sur les gels 2D pour chacune de ces espèces, et 5 à 12 % de ces taches montraient une expression différentielle selon le stade (Cohen-Freue et al., 2007).

Plus particulièrement pour *L. donovani*, 100 protéines sur les 2000 du génome ont été identifiées comme étant différentiellement exprimées entre les deux formes du parasite (Bente et al., 2003). Ces protéines peuvent être classées en cinq groupes selon la cinétique d'expression à différents stades (promastigote au jour 0, amastigote au jour 1, amastigote au jour 2 à 5). Elles se classent également en six catégories fonctionnelles : i) réponse au stress; ii) assemblage du cytosquelette; iii) métabolisme

de l'énergie et phosphorylation; iv) cycle cellulaire et prolifération; v) métabolisme des acides aminés; vi) enzymes protéolytiques (Bente et al., 2003) (tableau 1). Quelques espèces ont, par la suite, été analysées par une approche quantitative plus précise comme la technologie *isotope-coded affinity tag* (ICAT) (Cohen-Freue et al., 2007).

Catégories fonctionnelles	Jour 0 promastigotes	Jour 1 24h après choc thermique	Jours 2-5 Amastigotes	Catégories fonctionnelles	Jour 0 promastigotes	Jour 1 24h après choc thermique	Jours 2-5 Amastigotes
1 Réponse au stress							
heat shock protein 90	-	+	+	triosephosphate isomerase	-	-	+
heat shock protein 70	-	+	+	Rieske iron-sulfur protein	-	+	+
heat shock 70 related protein 1	-	+	+	ATPase β -subunit	-	-	+
cyclophilin D	-	+	+	thymidine kinase	-	+	+
aldolase	-	+	+	arginine kinase	-	+	+
enolase	-	+	+	nucleoside diphosphate kin. B	-	+	+
26 kDa heat shock related protein	-	-	+	adenylate kinase	+	-	-
heat shock protein 60	-	-	+	calcium motif P-type ATPase	+	-	-
peroxiredoxin	-	-	+	LACK	+	-	-
F1-ATPase β -subunit	-	-	+	aldolase epimerase rel. protein	+	-	-
protein phosphatase C	-	+	-	4 Cycle cellulaire et prolifération			
2 Cytosquelette et membrane							
ArfGap-like zinc finger protein	-	+	+	poly-zinc finger protein	-	-	+
arginine kinase	-	+	+	Ran-binding protein	-	+	+
aldolase	-	+	+	elongation protein 1	-	+	+
enolase	-	+	+	negative regulator of cdc42p	-	-	+
negative regulator of cdc42p	-	-	+	enolase	-	+	+
α -tubulin	-	-	+	replication factor A	+	-	-
α -tubulin	-	+	-	eukaryotic initiation factor 4a	+	-	-
β -tubulin	-	+	+	eukaryotic initiation factor 5a	+	-	-
α -tubulin	+	-	-	eukaryotic initiation factor 5a	-	-	+
3 Métabolisme de l'énergie et phosphorylation							
enolase	-	+	+	high mobility group protein	+	-	-
aldolase	-	+	+	5 Métabolisme des acides aminés			
alcohol-dehydrogenase	-	+	+	alanine transaminase	-	+	+
				adenosylhomocysteinase	-	+	+
				adenosylhomocysteinase	+	-	-
				S-adenosylmethionine synthase	+	-	-

Tableau 1 : Protéines de *Leishmania donovani* différentiellement régulées lors de sa différenciation.

– sous exprimée + sur exprimée (adapté de Bente et al., 2003)

2.2.2 Chez le moustique

Lorsque le moustique prend un repas sanguin chez un mammifère infecté, il ingère des macrophages parasités. Les amastigotes contenus dans les macrophages sont, par la suite, libérés dans le système digestif de la mouche, où ils se différencient en promastigotes répliatifs, appelés procycliques, capables de s'attacher à l'épithélium intestinal (Sacks et al., 1995) (figure 11). À ce stade, les promastigotes ne sont pas infectieux. Ces derniers subissent ensuite un procédé de maturation, appelé métacyclogenèse, au cours duquel ils se différencient en une forme métacyclique non répliative, mais très virulente (Sacks, 1989). La forme métacyclique infectieuse migre ultimement dans la trompe (proboscide) de l'insecte et sera ainsi transmise à l'hôte lors du prochain repas sanguin (Sacks and Kamhawi, 2001).

2.2.3 Culture des *Leishmania* en laboratoire

Pour étudier les *Leishmania* et pouvoir faire des expériences d'infection dans des lignées cellulaires de macrophages, des techniques ont été développées pour la culture de *Leishmania* en laboratoire. Dans différents milieux de culture relativement complexes, pendant la phase de croissance logarithmique à 25°C, le parasite est sous la forme promastigote. Quand la forme promastigote atteint la phase stationnaire, il y a transformation en forme métacyclique suivie de l'expression de marqueurs spécifiques (McKean et al., 2001). La forme amastigote des parasites était originalement recueillie à partir de culture de macrophages ou d'animaux infectés. Depuis, des conditions de culture en milieu stérile (milieu axénique) ont été développées et permettent la multiplication de la forme amastigote de certaines espèces de *Leishmania* caractérisées par l'expression de marqueurs amastigotes spécifiques. Les stimuli qui favorisent la transformation *in vitro* de promastigotes en amastigotes sont le pH acide (5,5 à 4,8) et la température (37°C) (Bente et al., 2003; Sereno and Lemesre, 1997).

2.3 Le lipophosphoglycan (LPG)

2.3.1 Structure du LPG

Le LPG est la molécule de surface la plus abondante chez le promastigote, avec environ 5 millions de copies par cellule. Chez la forme amastigote, le LPG est sous-exprimé par au moins trois ordres de grandeur. La structure de cette molécule comprend quatre domaines, représentés à la figure 12A par la structure prototypique du LPG de *L. donovani*. Les quatre domaines sont : i) une ancre O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(myo)inositol; ii) un noyau hexasaccharidique; iii) une région répétitive du trisaccharide Gal(β 1,4)-Man α 1-PO₄; et iv) un petit embout oligosaccharidique. Des polymorphismes spécifiques aux espèces se produisent au niveau de l'embout et des unités répétitives tandis que l'ancre lipidique et le noyau hexasaccharidique sont conservés (Turco and Descoteaux, 1992). De plus, durant la métacyclogenèse, le nombre d'unités de trisaccharides répétées double, passant de 15 à 30 environ. Cette élongation du LPG est accompagnée de changements dans l'embout et de substitutions dans les unités répétitives, ce qui permet la régulation de la liaison et de la relâche du parasite sur l'épithélium de l'insecte (Sacks and Kamhawi, 2001).

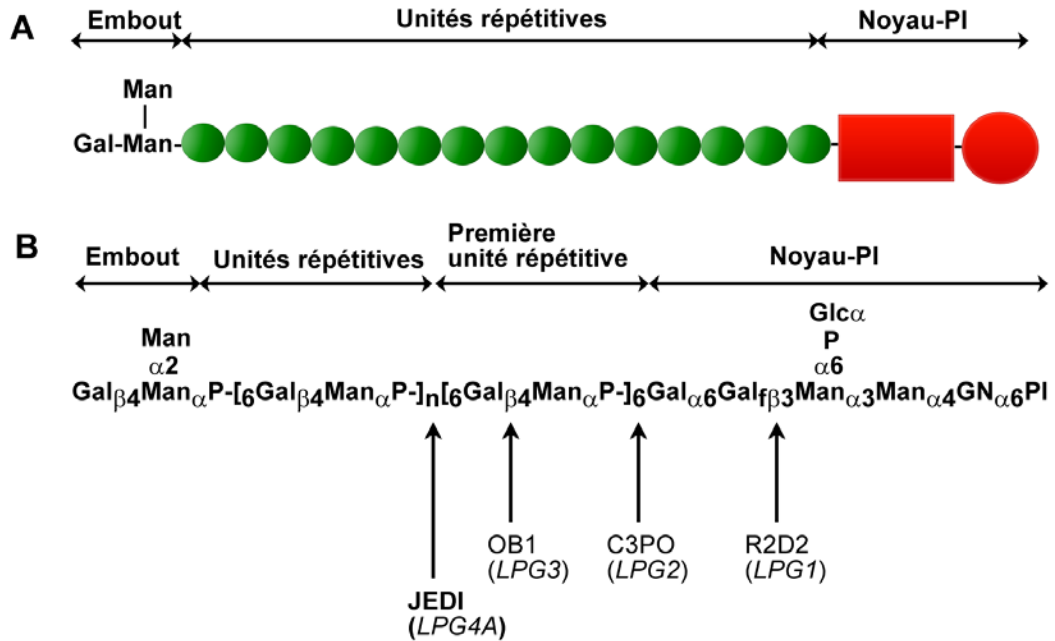


Figure 12 : Structure du LPG

A) Le grand cercle représente l'ancre phosphatidylinositol qui est connectée au noyau hexasaccharidique (rectangle). Les sous-unités répétitives de Gal($\beta 1,4$)-Man $\alpha 1$ -PO $_4$ (petit cercles) sont liées au noyau et leur nombre dépend des espèces et du stade du parasite (adapté de Lodge and Descoteaux, 2008); B) Localisation de la coupure de la molécule LPG chez les mutants R2D2, C3P0, OB1 et JEDI (adapté de Beverley and Turco, 1998)

2.3.2 Mutagenèse du LPG

Une combinaison de mutants pour la synthèse des unités de la molécule Gal(β 1,4)-Man α 1-PO₄ ou pour la molécule LPG elle-même a été utilisée pour enquêter sur les rôles du LPG dans le cycle de vie de *Leishmania*. Un des sucres de l'embout du LPG inclut un groupement galactosyl qui peut lier les lectines telles que l'agglutinine de ricin. En soumettant des *Leishmania donovani* hautement mutagénisées à de multiples cycles d'agglutination avec l'agglutinine du ricin et en les enrichissant pour les cellules non-agglutinées, il devient possible d'obtenir des parasites dépourvus de LPG détectable (King and Turco, 1988). Ces mutants provenant de la perte d'une des protéines essentielles à la fabrication ou à l'assemblage des molécules LPG ont été appelés « mutants *lpg-* ». Les quatre premiers mutants *lpg-* caractérisés ont été nommés en l'honneur des films de Star Wars (R2D2 ou *lpg1*^{-/-}, C3PO ou *lpg2*^{-/-}, OB1 ou *lpg3*^{-/-} et JEDI ou *lpg4*^{-/-}) (figure 12B) (Beverley and Turco, 1998).

2.3.3 Fonctions du LPG

Plusieurs rôles du LPG ont été proposés pour la survie du parasite. Chez l'insecte, le LPG forme un glycocalyx dense apte à protéger les promastigotes contre la dégradation par les enzymes digestives (Schlein et al., 1990). Le polymorphisme structural du LPG permet aux espèces de *Leishmania* d'utiliser des vecteurs différents, ce qui favorise leur dissémination sans que les parasites compétitionnent entre eux (Pimenta et al., 1994b).

Chez le mammifère, le LPG accomplit plusieurs fonctions avant l'internalisation des parasites dans les macrophages. Comme il a été mentionné précédemment, c'est le LPG qui protège le parasite contre les attaques du complément. D'ailleurs, la longueur doublée du LPG des promastigotes métacycliques joue un grand rôle dans cette fonction puisque cette forme de *Leishmania* résiste beaucoup mieux à la lyse que les procycliques (Franke et al., 1985; Puentes et al., 1990). Le LPG a aussi un rôle dans la

fixation de *Leishmania* aux récepteurs CR3 du macrophage, ce rôle a été évoqué précédemment.

Le LPG aurait aussi plusieurs rôles dans le phagosome, dont l'inactivation des enzymes dégradatives contenues dans les lysosomes (El-On et al., 1980). Grâce à ses charges négatives, le LPG servirait aussi de chélateur de calcium et d'autres cations divalents, ce qui préviendrait la production de radicaux hydroxyles toxiques lors de l'activation des macrophages (Eilam et al., 1985; Homans et al., 1992). Le LPG a aussi des effets reconnus sur la signalisation impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires (Houslay, 1991) comme la production d'IL-1 (Olivier et al., 2005) et d'IL-12 (Sutterwala et al., 1997). Le LPG affecte également des fonctions propres au phagosome, incluant la génération de radicaux libres de l'oxygène et le remodelage de l'actine entourant le phagosome (Lodge and Descoteaux, 2008). De plus, le LPG serait impliqué dans l'inhibition des voies de signalisation de PKC (Holm et al., 2001) et de la voie JAK2/STAT1 dépendante de SHP-1 (Blanchette et al., 1999).

Finalement, les données du groupe de Desjardins ont démontré que la molécule LPG est responsable de l'inhibition de la fusion phagosome-endosome (Desjardins and Descoteaux, 1997). En effet, les promastigotes mutants de *L. donovani* *lpg2*^{-/-}, qui expriment un LPG tronqué sans unité disaccharidique répétitive (Descoteaux et al., 1995), permettent la fusion et la maturation des phagosomes, contrairement aux promastigotes de type sauvage. Cette même étude a démontré que la molécule LPG, à elle seule, était responsable de cette inhibition en montrant que l'opsonisation des mutants *lpg2*^{-/-} avec du LPG purifié rétablissait le blocage de la fusion (Desjardins and Descoteaux, 1997). Le nombre d'unités disacchariques répétitives du LPG serait la clé d'une inhibition efficace de la fusion puisque le mutant RT5 de *L. donovani* (qui exprime seulement de 3 à 5 répétitions au lieu de 15) se retrouve dans des phagosomes dont le taux de fusion est intermédiaire entre celui des phagosomes contenant le type sauvage et celui des phagosomes contenant le type mutant *lpg2*^{-/-} (McNeely and Turco, 1990).

Le gène *lpg2* code pour la manosyl transférase, un transporteur intracellulaire qui permet la translocation de résidus mannose du cytoplasme vers l'appareil de Golgi (Ma et al., 1997). L'absence de ce transporteur empêche la fabrication des unités de sucre répétitives et l'ajout de ces molécules n'est plus possible sur le LPG, ni sur les phosphoglycans sécrétés, ni sur les protéines comme la phosphatase alcaline (Ilg et al., 1994). Un autre gène contribuant à la biosynthèse du LPG est le *lpg1*, codant pour une galactofuranosyl transférase (Huang and Turco, 1993). Cette enzyme joue son rôle dans la synthèse du noyau hexasaccharidique, qui n'est présent que dans la molécule LPG. Chez le parasite *lpg1*^{-/-}, on a donc une molécule LPG tronquée et aucune autre molécule n'est touchée. Par conséquent, le mutant *lpg1*^{-/-} permet de distinguer l'effet de LPG de celui des autres molécules possédant des unités répétitives.

L'équipe de Desjardins a, par la suite, montré que les mutants *lpg1*^{-/-} et *lpg2*^{-/-} avaient le même taux d'inhibition de la fusion, ce qui renforce l'idée que c'est vraiment le LPG qui en est le responsable (Dermine et al., 2000). Le LPG de *L. major* inhibe encore plus la fusion que celui de *L. donovani*, et on a d'abord pensé que cet effet était dû aux chaînes latérales de sucre, présentes sur le LPG de *L. major*, mais pas sur celui de *L. donovani*. Cependant, ce n'est pas le cas puisque le mutant Spock de *L. major*, qui est dépourvu de ces extensions de sucre, inhibe autant la fusion que le type sauvage. Ce serait plutôt la longueur de la molécule qui en serait responsable (Butcher et al., 1996). Finalement, il a aussi été démontré que l'inhibition de la fusion des phagosomes par LPG est un processus actif nécessitant que *Leishmania* soit vivante (Dermine et al., 2000).

3 Les radeaux membranaires

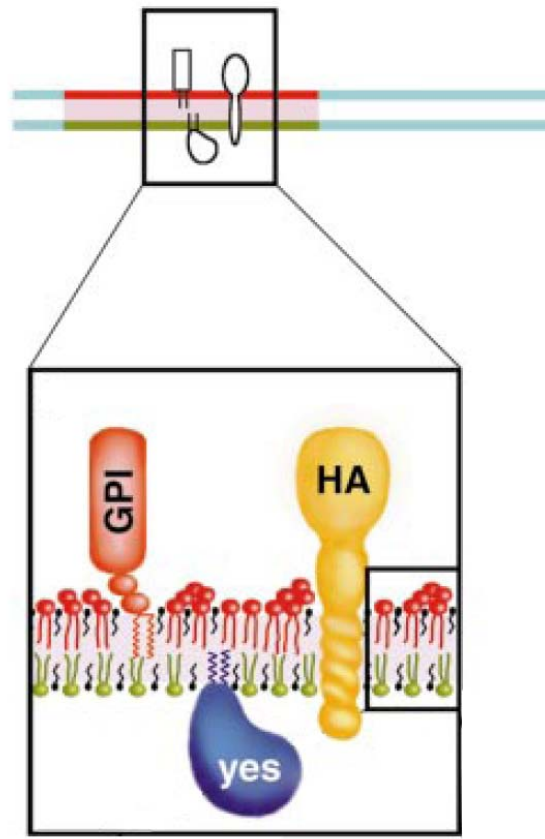
3.1 Découverte des radeaux membranaires

La première description de sous-domaines membranaires a été faite par Simons et van Meer, qui étudiaient les différences lipidiques et protéiques entre la région apicale et basolatérale des cellules polarisées (Simons and van Meer, 1988). Ils ont proposé en 1988 que cette asymétrie est possible grâce à des domaines membranaires du trans Golgi, dont le feuillet luminal est enrichi en sphingolipides et contient les protéines destinées à la zone apicale de la cellule. Ces lipides et protéines seraient acheminés aux membranes apicales sous forme de vésicules. Brown et Rose ont été les premiers à faire l'isolation de sous-domaines enrichis en glycolipides, aussi nommés membranes résistantes au détergent (DRMs pour *Detergent Resistant Membranes*), par extraction au Triton X-100 (TX-100) puis flottaison par centrifugation dans un gradient de sucrose. Ils ont montré que l'insolubilité au TX-100 des protéines à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) n'est pas causée par une association au cytosquelette ni même par interaction avec d'autres protéines. Ce sont en effet les propriétés de leur composition lipidique particulière qui rendent ces domaines plus résistants à la solubilisation.

Le terme « raft » a été utilisé pour la première fois par Brown en 1994 (Brown, 1994), mais ce n'est que trois ans plus tard que Simons et Ikonen ont décrit le modèle des radeaux lipidiques (*lipids rafts*) tel qu'il est encore généralement accepté aujourd'hui (Simons and Ikonen, 1997). Selon ce modèle nommé l'hypothèse des radeaux (*the raft hypothesis*), les radeaux lipidiques sont de petites régions de la membrane plasmique formées de façon transitoire par l'enrichissement de certains lipides (sphingolipides, cholestérol) et de certaines protéines, et qui jouent un rôle particulier par rapport au reste de la membrane (figure 13). Il a rapidement été proposé que le concept des DRMs et celui des radeaux lipidiques puissent être physiquement et conceptuellement liés (Arni et al., 1998). Durant les 10 dernières années, les termes DRMs et radeaux lipidiques ont souvent été utilisés à tort comme synonymes. On sait maintenant que le

contenu lipidique des DRMs ne se retrouve pas tel quel dans les microdomaines lipidiques. Il faut donc faire bien attention et distinguer les radeaux lipidiques (structures *in vivo* enrichies de sphingolipides et de cholestérol) des DRMs, qui sont le résultat d'une solubilisation partielle des membranes et qui n'existent pas sans détergent (Lichtenberg et al., 2005).

Maintenant que cette distinction est faite, il est reconnu que l'isolation des DRMs suivie de leur analyse est une bonne façon d'étudier le partitionnement de certains groupes de protéines selon leurs affinités biochimiques. Une fois qu'il est établi par d'autres techniques (comme la microscopie), qu'une membrane comporte des radeaux lipidiques, l'analyse comparative des DRMs et du reste de la membrane, soit les domaines membranaires solubles aux détergents (DSMs pour *Detergent Soluble Membranes*), nous permet de distinguer deux sous-groupes distincts de protéines qui ont toutes les chances de représenter les protéines de radeaux lipidiques versus les protéines de non-radeaux (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007). Une série de précautions peuvent être utilisées pour renforcer l'analyse des DRMs servant à étudier les radeaux lipidiques : marqueurs internes, analyse des lipides, déprivation du cholestérol, utilisation de différents détergents (Babiychuk and Draeger, 2006). Du point de vue de l'équipe pionnière dans l'étude des radeaux lipidiques, la méthode par isolation des DRMs est adéquate pour évaluer l'association et la dissociation de protéines dans les radeaux lipidiques lors de changements biochimiques et/ou physiologiques (Lingwood and Simons, 2007).



*Figure 13 : Modèle des radeaux lipidiques proposé par Simons et Ikonen en 1997
 Les radeaux (en rouge) sont distincts des autres régions de la membrane (en bleu).
 Les radeaux contiennent des protéines attachées par leur ancre GPI au feuillet
 exoplasmique, des protéines attachées au feuillet cytoplasmique par des queues acyl
 (ex. : la protéine Yes) ainsi que des protéines transmembranaires (adapté de Simons
 and Ikonen, 1997).*

Les radeaux lipidiques sont des sous-domaines de la membrane maintenant bien acceptés comme réalité biologique. Les deux caractéristiques de ces radeaux les plus généralement reconnues sont l'enrichissement du feuillet exoplasmique en sphingolipides, glycolipides et cholestérol et le fait que cette partie de la membrane est plus ordonnée, c'est-à-dire moins fluide que le reste de la membrane (figure 14).

L'insolubilité de ces domaines dans certains détergents comme le TX-100 et leur très faible densité due à leur faible ratio protéines/lipides ont permis de développer des méthodes pour les isoler et ainsi étudier leurs composants. On croit maintenant que certaines protéines y sont spécifiquement ségréguées, principalement les protéines à ancre GPI ainsi que les protéines associées à la membrane par palmitoylation ou myristoylation comme flotilline ou stomatine. On sait maintenant que ces sous-domaines se retrouvent à la surface de presque tous les types de cellules, qu'elles soient polarisées ou non. Dans les cellules polarisées (ex.: cellules épithéliales), les radeaux lipidiques se retrouvent à la surface apicale tandis que dans les cellules non polarisées (exemple : lymphocytes, phagocytes), ils sont distribués sur toute la membrane plasmique, en petites taches. On a d'abord évalué le diamètre de ces taches entre 20 à 200 nm (Morris et al., 2004), mais il semble plutôt que ces microdomaines soient issus de la coalescence de nanodomaines transitoires mesurant eux-mêmes 5-50 nm (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007).

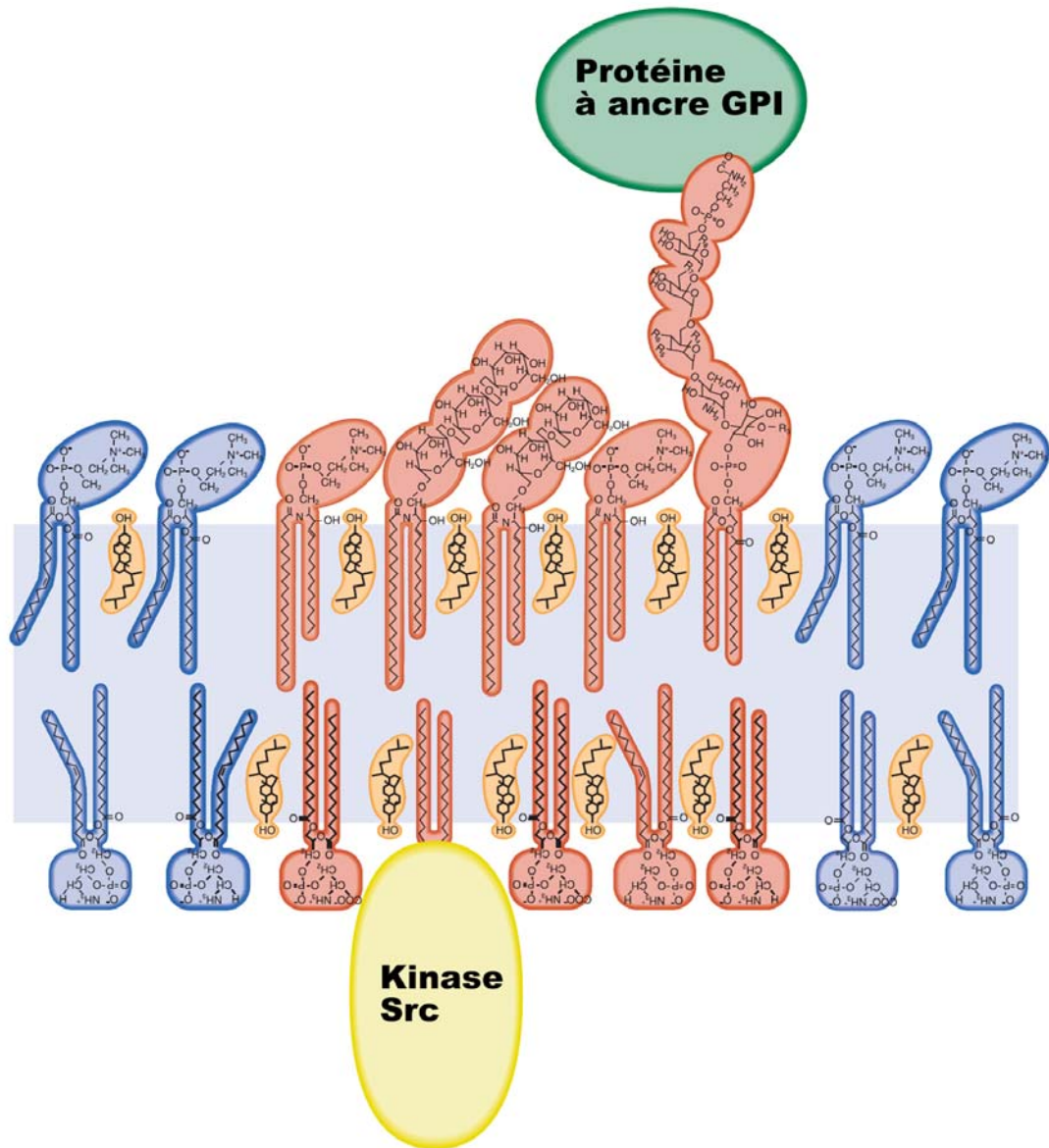


Figure 14 : Le modèle des radeaux lipidiques tel qu'il est généralement accepté aujourd'hui.

Les lipides des radeaux sont dans une phase ordonnée (rouge) par opposition au reste de la membrane qui est dans une phase désordonnée (bleu). Les radeaux sont enrichis de glycosphingolipides et sphingomyeline dans le feuillet exoplasmique tandis que le feuillet cytoplasmique contient des glycérolipides majoritairement saturés. Les molécules de cholestérol illustrées en orange se partitionnent particulièrement dans la phase ordonnée (adapté de Simons and Ikonen, 2000).

Une nouvelle terminologie a été adoptée par les spécialistes de l'étude des radeaux lipidiques lors du congrès international *Keystone symposium on lipid rafts and cell function*, qui a eu lieu en mars 2006. À partir de ce moment, le terme de plus en plus répandu et accepté est « radeau membranaire » (*membrane rafts*) et sa définition est :

Les radeaux membranaires sont de petits domaines (10-200 nm) hétérogènes, hautement dynamiques et enrichis en stérol et sphingolipides qui compartimentalisent des processus cellulaires. De petits radeaux peuvent parfois être stabilisés pour former de plus grandes plateformes via des interactions protéine-protéine et protéine-lipide.

Le rapport découlant de cette conférence mentionne que le terme *lipid rafts* a été changé pour tenir compte des nouvelles observations selon lesquelles non seulement les lipides, mais aussi les protéines sont responsables de la formation et du maintien de ces microdomaines (Pike, 2006). La taille des radeaux membranaires a été ajustée à 10-200 nm pour tenir compte de la majorité des observations rapportées étant donné que les sous-domaines de moins de 10 nm sont trop transitoires et s'apparentent trop aux domaines formés par les fluctuations thermodynamiques des lipides (Veatch and Keller, 2005). Les structures plus grandes telles que les synapses immunologiques sont reconnues comme étant issues de la coalescence de plusieurs radeaux membranaires (Huppa and Davis, 2003).

Les termes radeaux membranaires et microdomaines membranaires seront donc utilisés pour le reste de cette thèse pour décrire la structure biologique qui forme un sous-domaine de la membrane plasmique ou de la membrane d'une organelle comme le phagosome. Le terme DRM sera utilisé pour mentionner le mélange de protéines et de lipides qui flotte à l'interface supérieure d'un gradient de densité (sucrose ou autre) suite à la solubilisation partielle de cellules ou d'organelles dans du TX-100 1% à 4°C. Le reste de la membrane qui a été soumis au détergent, mais qui n'a pas flotté dans le gradient, sera identifié DSM.

3.2 Hétérogénéité des lipides à la source des radeaux membranaires

Les membranes cellulaires sont composées d'une bicouche de lipides, ce sont des lipides amphipathiques (des phospholipides dans la plupart des cas), chaque lipide ayant sa tête polaire hydrophile (chargés négativement) orientée vers l'extérieur de la membrane et sa queue hydrophobe orientée vers l'intérieur. Les phospholipides que l'on retrouve le plus dans les membranes font partie du sous-groupe des phosphoacylglycérol (ou glycérophospholipides). Ils se composent d'une molécule de glycérol estérifiée à deux acides gras et un phosphate. Les deux acides gras de longueur et de saturation variables sont nommés R-1 et R-2 (Figure 15A). Les différents groupes polaires associés au phosphate définissent les classes de phospholipides dont les principales sont les phosphatidyl choline (PC), les phosphatidyl serine (PS), les phosphatidyl inositol (PI), les phosphatidyl ethanolamine (PE), et les phosphatidyl glycerol (PG). Un autre sous-groupe de lipides, particulièrement important dans l'étude des radeaux membranaires est celui des sphingolipides. Chez les sphingolipides, le porteur de la fonction alcool, comme le glycérol dans les glycérophospholipides, est la sphingosine. Le représentant le plus abondant de ce groupe est la sphingomyéline (SM). Contrairement au modèle de la membrane plasmique de Singer et Nicholson (Singer and Nicholson, 1972), l'hypothèse des radeaux prévoit que la membrane n'est pas complètement fluide et ce, à cause de la propension de certains lipides à se rassembler en microdomaines.

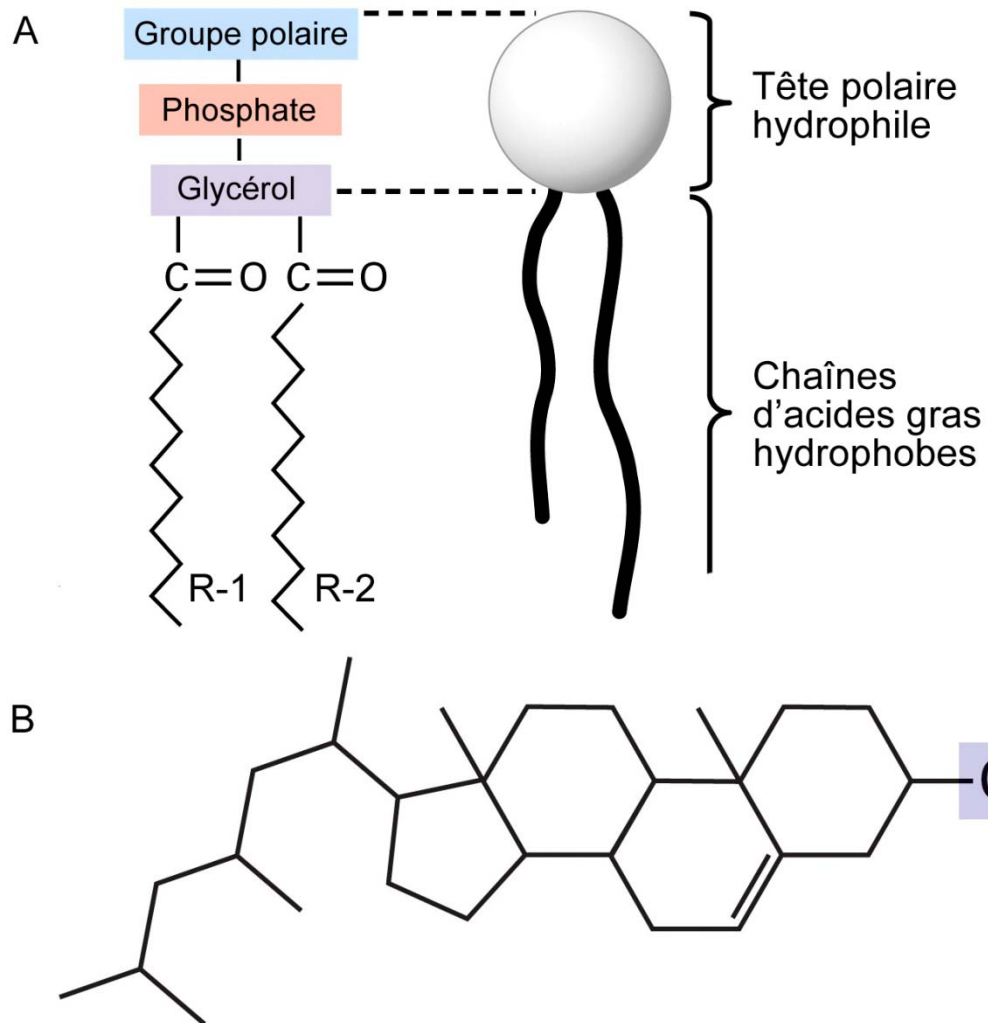


Figure 15 : Classes de lipides importants

A) Représentation d'un phospholipide, principal composant formant la bicouche des membranes cellulaires (adapté de Lodish, 2003) B) Molécule de cholestérol (adapté de Lodish, 2003)

3.2.1 *Les acides gras*

La longueur des chaînes d'acides gras influence la capacité de former des microdomaines membranaires. Presque toutes les chaînes d'acides gras des lipides membranaires $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{-COOH}]$ chez les eucaryotes ont un nombre pair d'atomes de carbone. Chez les mammifères, elles sont longues de 14 à 24 carbones. Ces chaînes ont une affinité pour les radeaux lipidiques qui augmente de 2 à 3 fois pour chaque éthyl supplémentaire. Le groupe polaire de tête des lipides influence aussi énormément leurs propriétés liées à la formation des membranes (Morris et al., 2004).

Une autre source d'hétérogénéité des lipides est la présence des doubles liens entre les carbones des chaînes d'acides gras. Les chaînes acyles insaturées les plus courantes ont une liaison double, mais certaines en ont 2, 3 ou 4. Chez les mammifères, les doubles liens sont toujours de conformation *cis*, ce qui introduit une pliure de 60° qui empêche la chaîne d'être linéaire. L'acide gras R-1 est totalement saturé chez les sphingolipides et glycérolipides tandis que seuls les glycérolipides sont insaturés en R-2, ce qui fait qu'ils sont moins linéaires et prennent plus d'espace latéral dans la bicouche (Morris et al., 2004) (figure 15a).

3.2.2 *Le cholestérol*

En plus des acides gras, le cholestérol est un composant majeur de certaines membranes, dont la membrane plasmique. Le cholestérol et ses dérivés constituent une classe importante de lipides membranaires, les stéroïdes, qui sont des composés dont le cœur consiste en 4 cycles aromatiques soudés. Bien que le cholestérol soit presque uniquement composé de carbone et d'hydrogène, il est de nature amphipatique. La tête polaire de ce lipide est un simple groupe $-\text{OH}$ tandis que ses anneaux s'étendent dans la membrane à une profondeur correspondant à C10 ou C12. Le cholestérol membranaire est un facteur déterminant de la fluidité de la bicouche. Trop hydrophobe pour pouvoir former à lui seul une structure en feuillet, le cholestérol se glisse entre les

phospholipides : son groupe hydroxyle prend contact avec la phase aqueuse, près des têtes polaires des phospholipides, alors que son groupe polycyclique stéroïde interfère avec leurs chaînes acyles et tend à les immobiliser (figure 15B).

3.2.3 Les Gangliosides

Ce groupe comprend des molécules composées d'un céramide lié par un lien glycoside à une chaîne d'oligosaccharides et d'acides N-acetylneuraminique (NANA, un sucre acide aussi appelé acide sialique) (Leray, 2009). Au niveau de la membrane plasmique, les gangliosides sont ségrégués avec les autres sphingolipides et le cholestérol dans les radeaux membranaires. Dans ces microdomaines, la grande surface occupée par les chaînes d'oligosaccharide procure une courbature à la membrane. Les fonctions biologiques des gangliosides sont principalement accomplies grâce à leur localisation dans les radeaux membranaires ou dans les cavéoles. Le GM1 (monosialotetrahexosylganglioside), qui est le ganglioside prototypique, est un membre du sous-groupe des gangliosides qui contiennent un seul résidu d'acide sialique (Christie, 2008). Le GM1 a d'importantes propriétés physiologiques qui influencent la plasticité et les mécanismes de réparation des neurones. En plus de ses fonctions dans la physiologie du cerveau, le GM1 peut être lié par la toxine du choléra (Mocchetti, 2005). Cette dernière caractéristique a permis de développer des molécules permettant de détecter le GM1 à partir de la sous-unité B de la toxine du cholera liée à un fluorophore ou une enzyme de détection.

3.3 Structure des radeaux membranaires

3.3.1 Composition lipidique des radeaux membranaires

On ne peut pas affirmer que la composition des DRMs est exactement celle des radeaux membranaires, car le processus d'extraction lui-même modifie cette composition (Lichtenberg et al., 2005). On a souvent mentionné le fait que la fraction insoluble à 4°C ne correspond pas nécessairement à une structure dans la membrane *in vivo* à 37°C. D'autres critiques indiquent que l'observation des radeaux par

microscopie n'est possible que par la coalescence artificielle de certains composants de la membrane par les anticorps utilisés, mais la faisabilité biologique de cette coalescence n'a été démontrée clairement que pour la synapse immunologique (Harder and Engelhardt, 2004).

Quelques études récentes ont tenté, avec un certain succès, de répondre aux détracteurs de l'hypothèse des radeaux et de l'isolation des DRMs. Chen et collaborateurs ont montré qu'en utilisant les cations Mg^{2+} et K^+ dans le tampon de solubilisation pour imiter l'environnement *intracellulaire*, il est possible d'isoler des DRMs qui sont alors stables même à 37°C (Chen et al., 2009). Les DRMs ainsi isolées avec la même concentration de détergent contiennent les mêmes protéines et lipides que les DRMs isolées à 4°C. De leur côté, Lingwood et collaborateurs ont montré que la membrane est apte à faire la coalescence de ses nanodomains en radeaux membranaires à 37°C (Lingwood et al., 2008). Malgré ces différences et faute de caractérisation précise des radeaux membranaires *in vivo*, la composition des DRMs est utilisée pour tenter d'élucider la structure des radeaux membranaires.

Les DRMs sont enrichies en cholestérol par rapport aux membranes totales de la cellule (32 mol% contre 12 mol%). On y trouve aussi un accroissement en sphingomyéline (14 mol% contre 1 mol%) (Brown, 1994). On rapporte finalement un accroissement moyen des glycolipides de 5 fois dans les microdomaines par rapport à la cellule totale.

Le cholestérol interagit surtout avec les lipides à longue chaîne saturée ($\geq C14$), cette liaison reposant sur les interactions de van der Waals. Les liaisons doubles ne sont tolérées qu'après les 12 premiers carbones. Le cholestérol agit comme espaceur hydrophobe qui permet aux lipides saturés de s'empaqueter étroitement et donc d'interagir davantage entre eux sur toute leur longueur. Le cholestérol se retrouve dans les deux feuillettes et le ratio cholestérol/lipide est en moyenne 30 mol% dans les DRMs.

3.3.2 Composition différente des deux feuillets de la membrane

Puisque les sphingolipides sont situés seulement dans le feuillet externe de la bicouche lipidique, le feuillet interne est *a priori* plus susceptible d'être solubilisé par les détergents. Cependant les évidences expérimentales indiquent qu'il n'en est rien. De ce point de vue, les détergents se révèlent donc très efficaces pour isoler les radeaux membranaires. En bref, la composition générale des feuillets externes est caractérisée par un enrichissement en sphingolipides, glycérophospholipides et cholestérol, et les principales protéines à y prendre place sont les protéines à ancre GPI. Du côté interne ou cytosolique, les lipides sont principalement des phospholipides saturés et du cholestérol auxquels sont ancrées des protéines comme flotilline, stomatine, cavéoline et les protéines kinases non-récepteurs (figure 14).

On sait que les microdomaines membranaires existent autant sur les feuillets internes qu'externes, et plusieurs évidences nous permettent de croire qu'ils sont couplés même si cette question a été longtemps débattue. Premièrement, il est possible de co-immunopurifier les parties externes et internes des microdomaines (Morris et al., 2004). Ensuite, des analyses statistiques, après observation au microscope électronique (ME), ont montré que les deux couches sont associées (Prior et al., 2003). Une indication fonctionnelle du couplage des couches externe et interne des radeaux provient de l'étude d'un important groupe de virus incluant HIV-1. Lors du bourgeonnement, le ciblage du feuillet interne des radeaux par le virus (via la protéine Gag chez HIV-1) résulte en l'inclusion de composants du feuillet externe dans leur capsid (sphingolipides, protéines à ancre GPI) (Morris et al., 2004). La façon la plus simple d'expliquer ce phénomène est que les deux feuillets sont couplés au niveau des radeaux. Il est cependant clair que la partie non-radeaux de la membrane, aussi appelée phase désordonnée, ne permet pas le couplage entre les deux feuillets à cause de la très grande mobilité des lipides et de l'espace entre chaque molécule qui est à la fois grand et variable (65-75 Å) (Scheiffele et al., 1999). Dans les microdomaines membranaires enrichis en lipides ordonnés et pauvres en protéines, il semble plus probable que le couplage dépend plus des lipides que des protéines. Le modeste groupe hydrophile du

cholestérol (-OH) n'est pas aussi fortement ancré à l'interface aqueuse que celui plus gros des acides gras. Il en résulte que la molécule de cholestérol vibre constamment dans l'axe des z (perpendiculaire à la surface de la membrane), pénétrant alors jusqu'à 30% dans le feuillet opposé (Endress et al., 2002). On a donc pensé que c'est un phénomène d'« interdigitation » des chaînes de phospholipides (Simons and Toomre, 2000) et du cholestérol qui serait la force majeure du couplage.

Des données plus récentes nous apprennent que l'interdigitation des chaînes des phospholipides n'est pas une force assez grande pour lier les deux feuillets et que la présence du cholestérol l'abolit (McIntosh et al., 1992; Schram and Thompson, 1995). Le cholestérol pourrait cependant être en grande partie responsable de ce couplage par le phénomène de la translocation interfeuillets. Ce modèle est basé sur le fait que le cholestérol peut être échangé librement entre les deux feuillets pour atteindre l'équilibre de son potentiel chimique (μ_c) contrairement aux phospholipides dont les échanges interfeuillets sont régulés par des enzymes (Collins, 2008).

Les propriétés des microdomaines (peu élastiques et peu d'espace entre les lipides) nous permettent de penser que ces domaines sont naturellement très planaires. Cependant les radeaux membranaires existent dans différentes membranes courbées [endosome (Kirkham and Parton, 2005; Nada et al., 2009), phagosome (Dermine et al., 2001; Dermine et al., 2005) péroxisome (Boukh-Viner et al., 2005)]. Dans tous ces cas, une ou plusieurs protéines insérées en abondance semblent être ce qui permet aux deux feuillets de rester couplés malgré la courbure. Parmi les candidates pour jouer ce rôle, on retrouve la cavéoline pour les courbures concaves et la prominine pour les courbures convexes.

3.3.3 Autres caractéristiques des radeaux membranaires

Trop petits pour la résolution de la microscopie à fluorescence, mais suffisamment grands pour celle du microscope électronique, il se peut que les radeaux membranaires aient été observés par ME durant de nombreuses années sans qu'on le sache. Ces

domaines sont relativement pauvres en protéines, notamment en protéines transmembranaires : cette caractéristique nous permet de les reconnaître comme étant une zone de plus faible densité protéique. Individuellement petits, mais pouvant être très nombreux, ils couvrent de 20 % (cellules musculaires) à 30-40 % (lumière du Golgi) de la surface de la membrane. Ils couvrent vraisemblablement plus de surface relative du côté apical des cellules épithéliales (Morris et al., 2004).

3.4 Partitionnement sélectif des protéines dans les radeaux membranaires

3.4.1 Ancres lipidiques

Un des déterminants importants de la présence d'une protéine dans les radeaux membranaires est la présence d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) sur cette protéine (Chatterjee and Mayor, 2001). La majorité des protéines à ancre GPI connues se retrouvent dans les DRMs (Rietveld et al., 1999). Des protéines ayant différentes fonctions telles que la signalisation, l'immunité, la pathologie du prion ou du trypanosome, se retrouvent liées aux DRMs grâce à leur ancre GPI. Une ancre GPI est une structure glycolipidique ajoutée de façon post-traductionnelle en C-terminal de nombreuses protéines eucaryotes. Cette modification permet à la protéine de s'attacher au feuillet externe de la membrane plasmique (Tiede et al., 1999). L'ancre GPI est constituée de trois domaines: i) un lien phosphoéthanolamine ; ii) un cœur de glucides très conservé sur lequel sont ajoutées différentes chaînes latérales ; iii) une queue de phospholipides variant de 14 à 28 carbones pouvant être saturée ou insaturée (Paulick and Bertozzi, 2008) (figure 16). Une des principales conditions connues pour le partitionnement des ancres GPI dans les DRMs est la longueur de la chaîne d'hydrocarbures ($\geq C16$). Les protéines à ancre GPI (GPI-APs pour *GPI anchored proteins*) ont généralement deux chaînes d'acides gras saturés dans leur partie phosphatidylinositol (PI) à la différence des autres molécules de PI de la cellule qui ont une insaturation en sn2. Cette saturation générée par les protéines PGAP2 et PGAP3 semble importante pour la localisation dans les DRMs puisque, dans les cellules mutantes pour ces deux enzymes, les GPI-APs ont une insaturation et ne se retrouvent pas dans les DRMs (Maeda et al., 2007). Il est possible que ces chaînes

insaturées (donc droites) s'associent avec deux chaînes insaturées tout aussi droites de la partie céramide des sphingolipides et/ou avec la chaîne hydrocarbonée du cholestérol (Kinoshita et al., 2008). Ce lien GPI-APs avec les principaux constituants des radeaux membranaires pourrait expliquer le grand enrichissement des GPI-APs dans les DRMs.

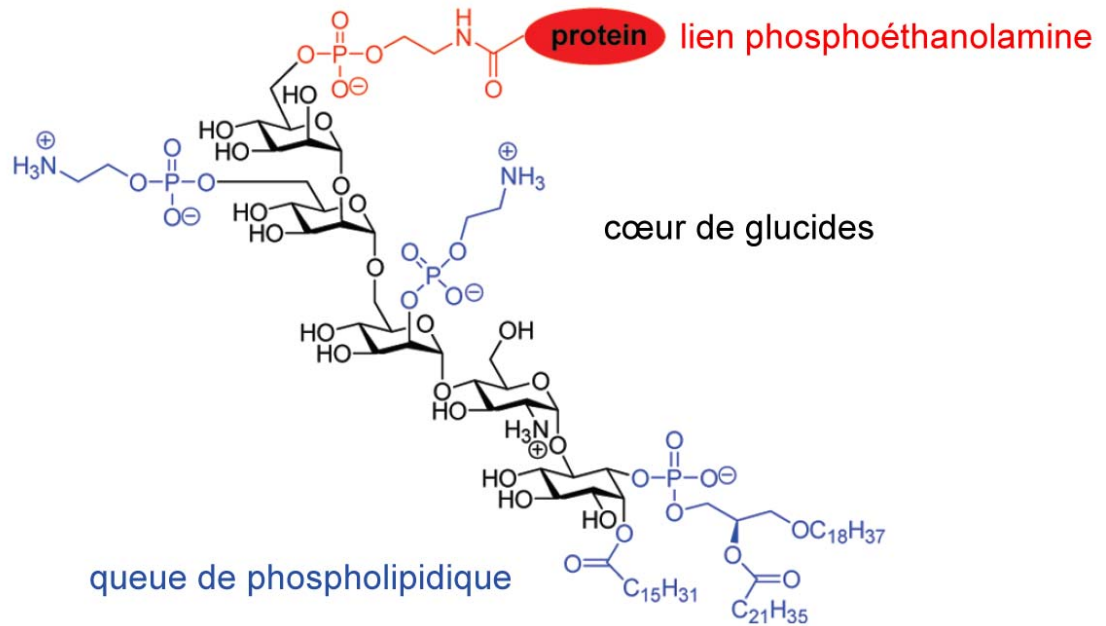


Figure 16 : La structure d'une ancre GPI en trois domaines (i) un lien phosphoéthanolamine (rouge), (ii) un cœur de glucides (noir), et (iii) une queue de phospholipidique (bleu) (adapté de Paulick and Bertozzi, 2008)

En dehors des ancres GPI, plusieurs protéines cytoplasmiques sont attachées aux radeaux par un de ces deux autres types d'ancres lipidiques. Le premier type d'ancre est un lipide C14 simple (myristate) attaché par un lien amide à un résidu glycine en N-terminal. La seconde possibilité est un groupe isoprenyl polyinsaturé attaché par un lien thioéther à une cystéine près du C-terminal (Resh, 1999). Bien que ces lipides soient généralement attachés de façon permanente à leurs protéines, un lien supplémentaire est normalement nécessaire pour ancrer la protéine à la membrane. Cet attache supplémentaire peut être une région polybasique (*polybasic patch*) qui peut lier les groupes acides des lipides, ou encore une palmitoylation (C16:0) (Roy et al., 2000). Sur la surface cytosolique, la palmitoylation est faite par un lien thioéther (C-) labile, ce qui permet de changer l'état de palmitoylation en réponse à un signal.

Dans les cellules, la plupart des protéines de radeaux membranaires sont palmitoylées, tandis que la majorité des protéines prénylées en sont exclues (Melkonian et al., 1999). Les protéines G constituent un exemple intéressant pour vérifier cette affirmation, car la sous-unité α est myristoylée, palmitoylée ou les deux tandis que la sous-unité γ est prénylée (Resh, 1999). À l'état de repos, le complexe $\alpha\beta\gamma$ est exclu des DRMs et lors de l'activation, la sous-unité α se dissocie de $\beta\gamma$ et se retrouve grandement associée aux DRMs (Melkonian et al., 1999). Il semble donc que l'exclusion par la prénylation est dominante sur l'inclusion par la myristoylation et palmitoylation.

3.4.2 Protéines transmembranaires des radeaux

La phase hautement ordonnée des lipides, qui est caractéristique des radeaux membranaires, n'accommodé pas ou peu la majorité des hélices transmembranaires. En plus, puisque le cholestérol permet d'étendre grandement les chaînes hydrocarbonées (elles sont bien droites), l'épaisseur des radeaux est ainsi plus importante que celle de la membrane classique (figure 17). Il s'ensuit que les radeaux ne peuvent supporter que les protéines ayant un domaine transmembranaire plus long que la grandeur habituelle. Finalement, puisque la haute densité des domaines Lo les

rend moins perméables aux ions, leur potentiel membranaire est plus grand et ceci altère la conformation des domaines transmembranaires.

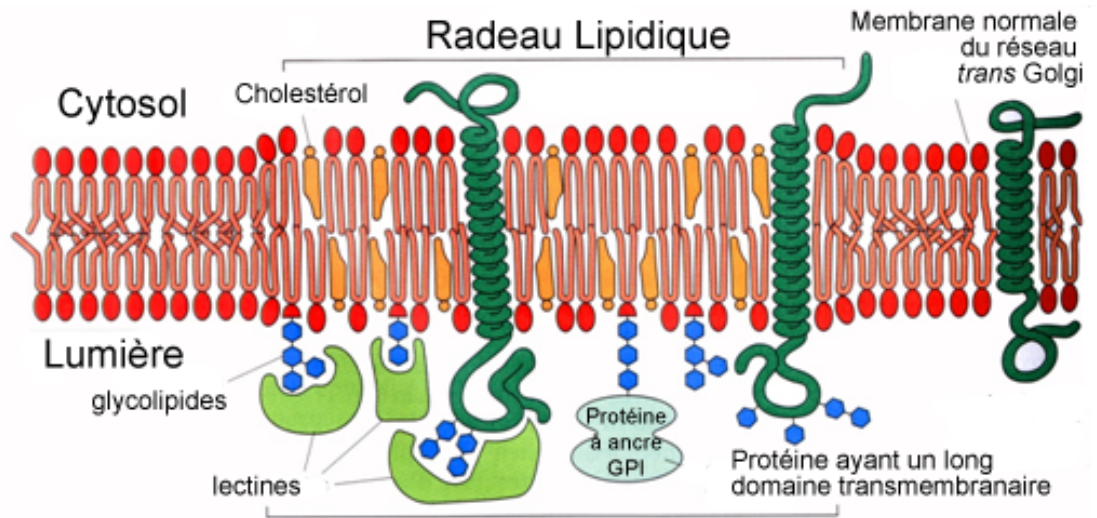


Figure 17 : La membrane des radeaux lipidiques est plus épaisse (adapté de Alberts, 2002).

Qu'en est-il alors de ces protéines transmembranaires qui occupent, malgré tout, les radeaux lipidiques de façon constitutive? La majorité de celles-ci surmontent les problèmes mentionnés précédemment en ayant plusieurs palmitates attachés de façon covalente à la région juxtamembranaire de leur région cytoplasmique. Ces palmitates sembleraient agir comme un bouclier, protégeant le domaine transmembranaire pour lui permettre de demeurer dans la phase Lo. Certaines protéines semblent avoir un domaine transmembranaire adapté aux radeaux. Par exemple, la protéine hémagglutinine d'influenza (HA), qui est dirigée vers les microdomaines et s'y insère, possède un domaine transmembranaire composé de 27 acides aminés hydrophobes et non de 25 comme c'est généralement le cas (Morris et al., 2004).

3.4.3 Protéines structurales des radeaux membranaires

3.4.3.1 Les cavéolines

Une des protéines les plus typiques des radeaux membranaires est la cavéoline. En fait, l'insertion de la cavéoline dans la membrane plasmique forme des invaginations de 50-80 nm nommées cavéoles (Ikonen et al., 2004). Les cavéoles sont enrichies de sphingolipides et de cholestérol, se retrouvent dans la fraction DRMs à la suite d'un traitement au Triton X-100 et sont considérées comme un sous-groupe de radeaux membranaires présent dans les cellules exprimant la cavéoline (Simons and Ikonen, 2000). Il y a trois membres dans la famille des cavéolines. Cavéoline-1 (anciennement cavéoline) est co-exprimée avec cavéoline-2 dans les cellules comportant de nombreuses cavéoles telles que les cellules endothéliales, les adipocytes et les fibroblastes tandis que cavéoline-3 est spécifique aux cellules musculaires (Ikonen et al., 2004). Pour ce qui est des macrophages de souris, des résultats contradictoires ont été publiés, mais il semble finalement que cavéoline-1 et 2 soient exprimées dans les macrophages primaires tandis que seule cavéoline-2 est exprimée chez les macrophages J774 (Gargalovic and Dory, 2001). Dans le cas des J774, il n'est pas étonnant de retrouver principalement cavéoline-2 dans l'appareil de Golgi puisqu'il a été démontré que le transport de cavéoline-2 à la membrane plasmique est dépendant

de cavéoline-1 (Parolini et al., 1999). Les cavéolines sont impliquées principalement dans la régulation du transport des lipides tels que le cholestérol et la modulation de la signalisation cellulaire (Gargalovic and Dory, 2001).

3.4.3.2 Les flotillines

Reggie-1 et 2 ont originalement été identifiées dans les neurones du nerf optique en régénération des poissons rouges (*Carassius auratus*) (Schulte et al., 1997). Ces protéines ont subséquemment été identifiées après la flottaison des complexes insolubles (DRMs) de cellules endothéliales, ce qui leur a valu le nouveau nom de flotillines (flotilline-1 étant reggie-2 et vice-versa) (Bickel et al., 1997). Dans les cellules n'exprimant pas de cavéoline (ex. : érythrocytes, plaquettes, lymphocytes), les protéines majeures des radeaux lipidiques font partie d'une large famille de protéines dont les flotillines et les stomatines définissent les deux types principaux. Les flotillines et stomatines se lient à la surface cytoplasmique des radeaux, probablement par palmitoylation. Les stomatines diffèrent des flotillines par 25 acides aminés supplémentaires en N-terminal.

Les flotillines ont deux domaines hydrophobes, et il a été suggéré qu'ils sont des domaines transmembranaires (Bickel, 2002). Le second de ces domaines n'est que de 18 acides aminés, ce qui est la bonne longueur pour un domaine TM dans la membrane de l'appareil de Golgi. Puisqu'un fragment de 14 kDa en N-terminal est protégé de la protéolyse du côté cytoplasmique du Golgi, il est probable que le domaine de 18 acides aminés traverse effectivement la membrane du Golgi (qui est fortement enrichie en radeaux lipidiques) (Gkantiragas et al., 2001). Cependant, flotilline-1 exprimée à la membrane plasmique n'est pas protégée contre la protéolyse cytoplasmique et son lien à la membrane dépend principalement de la palmitoylation. Cette flotilline de la membrane plasmique ne passe pas par le Golgi durant sa biosynthèse, ce qui suggère qu'il y a au moins deux routes biosynthétiques qui diffèrent selon la destination de cette protéine (Morrow et al., 2002). Les flotillines contiennent de plus un domaine peu caractérisé appelé le domaine d'homologie à la

prohibitine (PHB). Ce domaine est conservé évolutivement et est partagé par plusieurs protéines membranaires eucaryotes et procaryotes. Bien que les protéines ayant un domaine PHB montrent des différences pour leur localisation intracellulaire, de nombreux membres de cette famille sont décrits comme étant associés aux DRMs (Morrow et al., 2002). Ceci laisse sous-entendre que le domaine PHB a un rôle à jouer dans l'association avec les radeaux membranaires. L'équipe de Parton a d'ailleurs démontré que l'association aux membranes ainsi que le ciblage vers les microdomaines sont en grande partie dépendants d'une palmitoylation sur la cystéine 34 située dans le domaine PHB (Morrow et al., 2002).

Il y a plusieurs fonctions potentielles des cavéolines, des stomatines et des flotillines qui ont été avancées : régulation du contenu en lipides et en protéines de leur domaine, ciblage moléculaire, guidage de leur sous-domaine vers un compartiment cellulaire particulier, liaison directe avec certaines protéines en les restreignant ainsi aux radeaux. Dans leur revue, Morris et collaborateurs notent que la flotilline est souvent exprimée au niveau des membranes concaves [phagosomes (Dermine et al., 2001), endosomes tardifs (Gagescu et al., 2000), vésicules d'exportation biosynthétiques (Marchand et al., 2002)], mais pas dans les membranes convexes [vésicules sécrétées des érythrocytes (Salzer et al., 2002) ou les granules alpha des plaquettes (Mairhofer et al., 2002)]. En plus de remplir des fonctions potentielles dans la structure des radeaux membranaires, la flotilline est impliquée dans la signalisation de l'insuline pour engendrer la redistribution du transporteur de glucose dans les adipocytes (Baumann et al., 2000).

3.4.4 Méthodes d'analyse des protéines des radeaux membranaires

3.4.4.1 Isolation des DRMs

L'isolation des DRMs a été la méthode la plus utilisée pour étudier les protéines des radeaux membranaires. Cette méthode a l'avantage d'être utilisable sur de grandes quantités de cellules dans des études de cartographie protéomique. C'est de plus une méthode parfaite pour faire une approche systématique lorsqu'on veut étudier les protéines des radeaux lipidiques d'une cellule ou d'une organelle pour la première

fois, car en plus d'être relativement simple à mettre au point et à pratiquer, elle est rapide et nécessite seulement une ultracentrifugeuse comme équipement spécialisé. Le coût raisonnable des réactifs pour cette technique la rend disponible pour tous les laboratoires de recherche, contrairement à certaines autres techniques. Cependant, comme il a été mentionné précédemment, cette méthode a quelques désavantages et c'est pourquoi différentes solutions de remplacement ont été développées. Brièvement, le principal désavantage de cette technique est qu'il a été démontré que la composition lipidique des DRMs n'est pas identique à celle des radeaux membranaires (Lichtenberg et al., 2005). La solubilisation des membranes pour former des micelles ne dépend pas seulement de la composition en lipides de cette membrane, mais aussi du détergent utilisé et des conditions expérimentales telles que la composition de la phase aqueuse et la température. De plus, la prémisse qui sous-tend que la grande concentration en cholestérol et en sphingomyéline est nécessairement la cause de l'insolubilité des radeaux membranaires s'est avérée fautive après des essais avec des membranes artificielles (Lichtenberg et al., 2005). Finalement, il reste possible que les protéines extraites par le détergent soient sélectionnées selon leurs propriétés physiques (hydrophobicité, longueur du domaine transmembranaire) plutôt que selon leur distribution dans les microdomaines (Munro, 2003). Malgré ces quelques défauts, cette méthode est de loin celle qui a permis le plus grand nombre de découvertes dans le domaine des radeaux membranaires. Classiquement, cette méthode consiste en l'extraction des protéines avec des détergents suivie de l'analyse des protéines effectuée par immunobuvardage, spectrométrie de masse ou par une combinaison de ces deux techniques.

3.4.4.1.1 Extraction de protéines par des détergents

Les détergents sont des molécules amphipathiques qui désorganisent les membranes en s'intercalant dans les bicouches phospholipidiques et en solubilisant les lipides et les protéines. Certains détergents sont des produits naturels (exemple : désoxycholate de sodium), mais la plupart sont des molécules de synthèse élaborées pour le nettoyage ou la dispersion des mélanges d'huile et d'eau. Les détergents ioniques, comme le

sodium dodécylsulfate (SDS), contiennent un groupement chargé (figure 18A). Les détergents non ioniques tels que le TX-100 et l'octylglucoside sont dépourvus de groupement chargé. À des concentrations très faibles, les détergents se solubilisent dans l'eau et prennent la forme de molécules isolées. Lorsque la concentration augmente, les molécules commencent à former des micelles, de petits agrégats sphériques dans lesquels les parties hydrophiles des molécules sont dirigées vers l'extérieur et les parties hydrophobes regroupées au centre (figure 18B). La concentration micellaire critique (CMC) à laquelle les micelles se forment est caractéristique de chaque détergent et dépend des structures de ses parties hydrophobes et hydrophiles. Les détergents ioniques se fixent aux régions hydrophobes exposées des protéines membranaires ainsi qu'aux parties centrales hydrophobes des protéines hydrosolubles, ce qui les dénature. Les détergents non ioniques ne dénaturent pas les protéines et sont donc utiles pour les extraire des membranes avant de les purifier. Ces détergents agissent de manière différente selon leur concentration. À des concentrations supérieures à la CMC, ils solubilisent les membranes biologiques en formant des micelles mixtes de détergent, de phospholipides et de protéines membranaires intrinsèques (figure 18C).

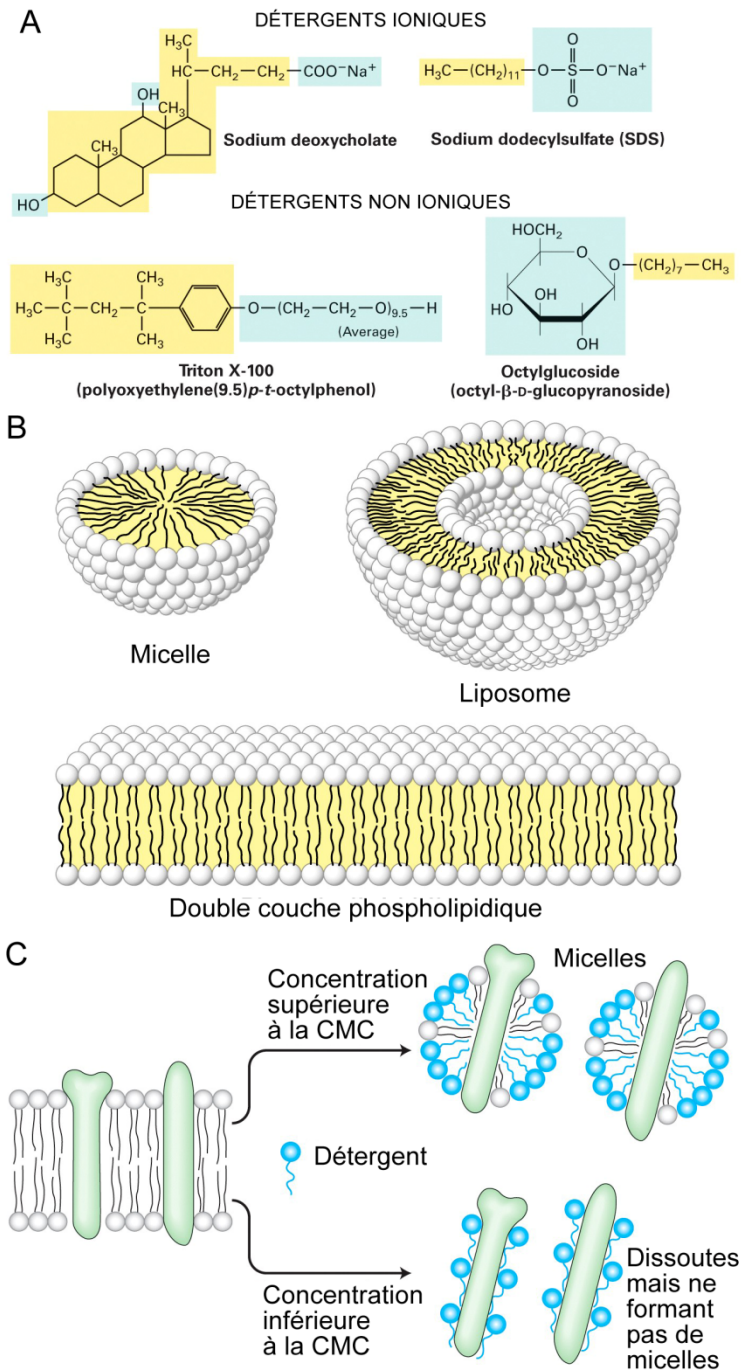


Figure 18 : Principes de la solubilisation par les détergents

A) La structure de quatre détergents courants (La partie hydrophobe de chaque molécule est en jaune, la partie hydrophile, en bleu) B) Représentation des trois regroupements des molécules de lipides induits par leur tête hydrophile et leur queue hydrophobe lorsqu'ils sont dans un milieu aqueux : la micelle, le liposome et la double couche phospholipidique C) La solubilisation des protéines membranaires intrinsèques par des détergents non ioniques (adapté de Lodish, 2003)

3.4.4.1.2 Immunobuvardage

Le moyen le plus classique d'analyser les protéines, après les avoir extraites, est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE pour *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) suivie de l'immunobuvardage (*Western blot*). Cette technique présente de nombreux avantages (peu coûteuse, simple et rapide), mais aussi de gros désavantages (ne permet de vérifier la présence que de quelques protéines à la fois, dépend de la disponibilité des anticorps spécifiques pour les protéines à tester). La meilleure voie de contournement du tâtonnement par immunobuvardage est l'analyse systématique du contenu protéique des DRMs par la méthode plus directe de la spectrométrie de masse.

3.4.4.1.3 Spectrométrie de masse

Le principe de la spectrométrie de masse réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse (MS pour *Mass Spectrometer*) consiste en quatre modules : un système d'introduction de l'échantillon (souvent associé à une méthode séparative), une source d'ionisation qui vaporise et ionise l'échantillon, un analyseur qui sépare les ions selon leur ratio m/z et un détecteur qui transforme le courant ionique en courant électrique et amplifie le signal pour qu'il soit traité de façon informatique (figure 19). L'utilisation du MS en protéomique a permis une révolution dans l'analyse du contenu protéique des organelles. Les méthodes traditionnelles de microscopie permettant d'observer des protéines marquées ont permis d'étudier les organelles de la levure, mais ne suffisent pas pour analyser les systèmes plus complexes des cellules de mammifères (Yan et al., 2009).

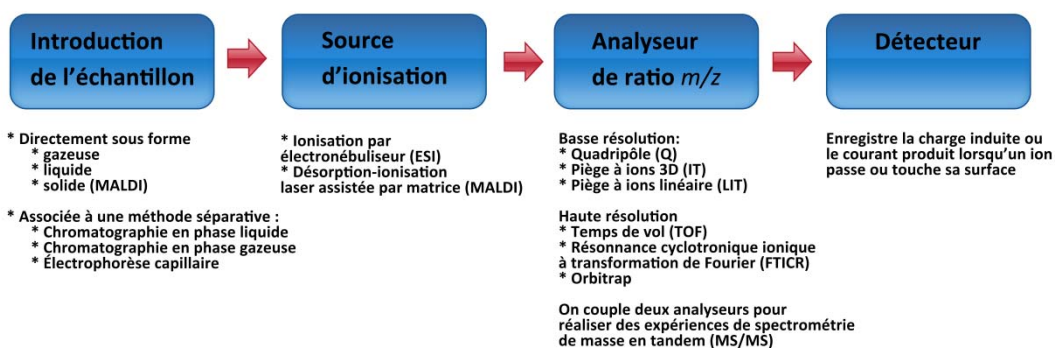


Figure 19 : Principales composantes d'un système de spectrométrie de masse

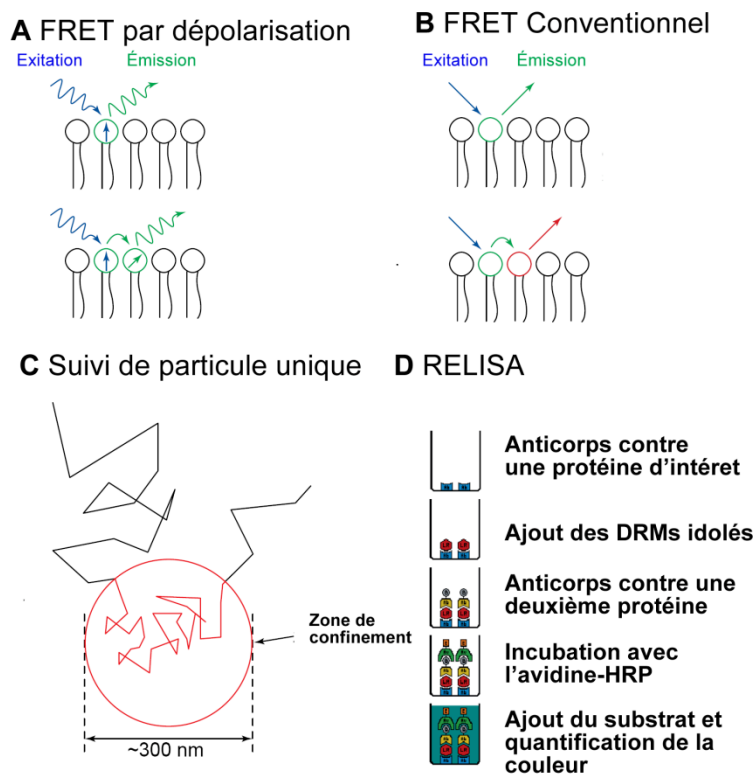


Figure 20 : Quelques méthodes d'analyse des radeaux lipidiques

A) FRET par dépolarisation B) FRET conventionnel C) Suivi de particule unique (adapté de Jacobson and Dietrich, 1999) D) Schématisation des étapes du RELISA (adapté de George et al., 2006)

3.4.4.2 Isolation sans détergent

Une méthode alternative basée sur la sonication des cellules a été développée pour isoler les radeaux membranaires sans les biais de la méthode avec le détergent (Smart et al., 1995; Song et al., 1996). Un protocole plus rapide et d'une plus grande reproductibilité a été développé en remplaçant la sonication par le passage dans une seringue (Macdonald and Pike, 2005). La pureté de l'isolation a aussi été améliorée grâce au remplacement de l'EDTA par un tampon contenant du calcium et du magnésium. Cependant, ce protocole n'a jamais obtenu la popularité de la méthode originale avec le TX-100.

3.4.4.3 Microscope photonique

L'observation directe des radeaux membranaires n'est pas possible par microscopie photonique, car sa résolution (> 100 nm) est trop petite. Cependant, des techniques spécialisées ont permis d'évaluer le rayon des radeaux à 26 ± 13 nm (Pralle et al., 2000). Cette pratique de la microscopie étant la plus accessible, on l'a souvent utilisée pour confirmer la présence de certaines protéines dans les radeaux membranaires. Malgré la résolution insuffisante, le microscope confocal utilisé en conjonction avec la microscopie à fluorescence a permis de démontrer la localisation plus ségréguée de certaines protéines par rapport à d'autres. Cette méthode a souvent été utilisée pour confirmer la localisation de deux protéines dans des sous-domaines distincts de la membrane (Dermine et al., 2005; Malinska et al., 2003). Cette approche est aussi un moyen permettant de démontrer qu'un certain stimulus provoque la translocation d'une protéine vers les microdomaines (Janes et al., 1999; Stauffer and Meyer, 1997).

3.4.4.3.1 Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

Une méthode alternative développée plus récemment est devenue très populaire pour caractériser les radeaux membranaires : le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET pour *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Le FRET

permet d'observer la distribution de molécules à une échelle inférieure à celle de la microscopie confocale (< 300 nm). Cette méthode est basée sur le transfert d'énergie entre un fluorophore donneur à l'état excité vers un accepteur à l'état basal (figure 20B). Ce transfert ne nécessite pas de contact direct, mais l'efficacité est relative à la proximité entre le donneur et l'accepteur (1-10 nm). La technique du FRET permet donc de détecter si la distribution entre deux molécules est complètement aléatoire ou si elle ne l'est pas (ce qui arrive lorsque ces molécules sont ségréguées dans des microdomaines). Il y a deux principales façons d'utiliser ce transfert d'énergie dans l'étude des microdomaines : i) mesurer la diminution de fluorescence par désactivation (*quenching*) du donneur ou ii) mesurer l'augmentation de fluorescence de l'accepteur. Les conclusions obtenues par ces méthodes peuvent être validées en photoblanchissant (*photobleaching*) l'accepteur, ce qui va changer son spectre d'absorption et libérer le donneur de sa désactivation.

Une des premières démonstrations de la présence de microdomaines dépendant du cholestérol ayant été faite par FRET est celle de Nichols en 2003 (Nichols, 2003). Il a démontré qu'un regroupement se produit entre les molécules de GM1 étiquetées avec la sous-unité B de la toxine de choléra (GM1-CTB) et la protéine fluorescente verte (GFP pour *Green Fluorescent Protein*) couplée à une ancre GPI (GPI-GFP) tandis que le récepteur de la transferrine (Tf-R) (un marqueur classique des non-radeaux) ne se regroupe pas en microdomaines.

Le FRET a aussi été utilisé pour examiner la taille des microdomaines et a permis d'évaluer que chacun contient aussi peu que 3-4 protéines à ancre GPI (Sharma et al., 2004). Un problème dans l'analyse spatio-temporelle d'une molécule cible par FRET est que la seconde molécule utilisée pour le transfert d'énergie (le biosenseur) est elle-même soumise à une diffusion dans la membrane. Très récemment et en utilisant une méthode de FRET permettant d'éliminer l'effet de la diffusion du biosenseur, une équipe a démontré qu'après l'activation par EGF, les protéines Src de la membrane sont relocalisées et se regroupent dans les radeaux membranaires (Lu et al., 2008).

3.4.4.3.2 Suivi de particule unique

Le suivi de particule unique (SPT pour *Single Particle Tracking*) est une autre méthode de microscopie photonique permettant de franchir la limite de la résolution optique restreinte par la diffraction. Des informations sur l'hétérogénéité des membranes cellulaires peuvent être obtenues par cette technique et ses variantes en caractérisant le mouvement d'une molécule par rapport au mouvement causé par le mouvement Brownien (Saxton and Jacobson, 1997). Les études de SPT détectent ce qu'on appelle des zones transitoires de confinement (figure 20C) qui ont été évaluées à 200-300 nm. Cette méthode a permis de supporter l'hypothèse des radeaux en montrant que 35-37% de la protéine à ancre GPI Thy-1 et du lipide GM1 sont ainsi confinés (Sheets et al., 1997).

3.4.4.3.3 Autres méthodes de microscopie photonique

D'autres méthodes ont été utilisées durant les dix dernières années, mais avec moins de succès que celles présentées plus haut. Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP pour *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) est une méthode établie depuis longtemps pour examiner la mobilité translationnelle des molécules fluorescentes dans les membranes cellulaires. Une des études les plus exhaustives des radeaux membranaires par cette approche démontre que le FRAP n'est pas adéquat pour fournir une conclusion définitive sur l'existence et la nature des microdomaines membranaires (Kenworthy et al., 2004).

3.4.4.4 Microscope électronique

Une étude sur la taille des radeaux membranaires par microscopie électronique a évalué à 20-22 nm le rayon des zones contenant des billes d'or rattachées au marqueur de radeaux GFP-th (Prior et al., 2003), ce qui situerait le diamètre des radeaux membranaires entre 15 et 44 nm en tenant compte de la longueur des anticorps et du rayon des particules d'or (Parton and Hancock, 2004). D'autres études de localisation de deux marqueurs de radeaux (Thy-1 + LAT, FcεRI ou la protéine du prion) montrent la présence de domaines élémentaires d'environ 50 nm pouvant fusionner pour former

des super-rafts excédant parfois 500 nm (Madore et al., 1999; Wilson et al., 2004). Fait intéressant : plusieurs de ces études démontrent que le lipide GM1 se retrouve dans des microdomaines différents des marqueurs protéiques, ce qui suggère la présence de différents types de microdomaines dans une même membrane (Lagerholm et al., 2005).

3.4.4.5 Cytométrie en flux

Matkó et collaborateurs ont développé une technique basée sur la cytométrie en flux pour identifier des protéines associées aux radeaux membranaires. En utilisant des anticorps fluorescents contre les protéines à tester, ils vérifient la variation de fluorescence après un traitement au détergent (Gombos et al., 2004). Les protéines ayant la moins grande sensibilité au traitement sont considérées comme les protéines de DRMs. Un contrôle fait avec la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) permet de vérifier que cette insolubilité est bel et bien induite par l'association à un microdomaine riche en cholestérol et non pas à un ancrage au cytosquelette. Cette méthode a été utilisée par Wolf et collaborateurs pour comparer l'association aux radeaux des principaux antigènes de la membrane plasmique des monocytes au repos par rapport aux monocytes activés. Ils ont pu ainsi confirmer les résultats qu'une autre équipe avait obtenus par la méthode du FRET, ces résultats étant que CD14, CD32 et CD55 sont constitutivement associés aux DRMs, CD81 l'est suite à l'activation au LPS tandis que CD71 est soluble (Pfeiffer et al., 2001).

Dernièrement, Morales-García et collaborateurs ont utilisé le cytomètre en flux pour analyser l'hétérogénéité des radeaux membranaires (Morales-Garcia et al., 2008). Leur but était de développer une méthode pour identifier deux molécules ou plus dans un radeau en particulier afin de comparer l'ensemble de ces sous-domaines et de confirmer que différents radeaux ont une composition différente comme l'ont suggéré plusieurs équipes (Pike, 2004). Cette méthode consiste premièrement à fractionner les membranes des cellules par un procédé d'extraction des radeaux sans détergent (Macdonald and Pike, 2005), et deuxièmement à utiliser des anticorps fluorescents

contre les molécules ciblées pour analyser le tout dans le cytomètre. Le GM1 étant utilisé comme marqueur des radeaux, cette méthode a permis à Morales-Garcia et collaborateurs de distinguer, par exemple, des populations de radeaux GM1+/CD14+ et d'autres GM1+/CD14-.

3.4.4.6 ELISA

Une autre approche permettant d'observer l'hétérogénéité des radeaux membranaires est basée sur la technique de dosage immunoenzymatique sur support solide (ELISA pour *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (George et al., 2006). Il est de plus en plus clair que l'activation des lymphocytes T provoque une coalescence de radeaux membranaires comprenant les récepteurs des cellules T (TCR pour *T-Cell Receptor*) et les protéines adaptatrices nécessaires à la transduction du signal. Cependant, les méthodes d'isolation des DRMs et d'analyse par SDS-PAGE (ou même par MS) ne permettent pas de distinguer si les protéines sont à l'intérieur d'un même radeau membranaire ou dans deux sous-domaines semblables mais distincts. Le RELISA (pour *Raft ELISA*) a donc été développé pour remédier à cette lacune (figure 20D). D'abord, un anticorps contre une protéine spécifique des radeaux membranaires est fixé au fond d'une plaque de microtitration. Puis, des DRMs sont ajoutées et, après lavage des membranes non liées, sont incubées avec un anticorps biotinylé détectant une seconde protéine des radeaux membranaires (ou une protéine qui s'y trouve potentiellement). L'étape suivante est l'ajout de l'avidine-HRP qui lie spécifiquement la biotine de l'anticorps et permet un dosage grâce à l'activité enzymatique de la partie HRP (*HorseRadish Peroxidase*). Il suffit ensuite d'ajouter un substrat chromogénique qui change de couleur sous l'action du HRP en présence de H₂O₂. Ce changement de couleur est finalement dosé dans un spectrophotomètre. L'étude réalisée en utilisant cette méthode a démontré que, même si la majorité des DRMs des cellules T comprennent la protéine à ancre GPI Thy-1, elles diffèrent pour ce qui est des protéines de signalisation telles que CD3-ε (George et al., 2006).

3.5 Fonctions des radeaux membranaires

3.5.1 Plateforme de signalisation

Une protéine qui se partitionne dans les radeaux membranaires est, par le fait même, généralement concentrée. En effet, certaines kinases sont présentes à 20-80% dans ces microdomaines qui couvrent une surface d'environ 10-20% de la membrane totale. Le fait d'avoir en si grande proportion une protéine dans des domaines aussi restreints explique qu'elles y sont concentrées. Ceci peut s'avérer un phénomène important pour une protéine qui doit s'associer pour induire une cascade de signalisation, par exemple. Un grand nombre de récepteurs sont connus pour être dirigés vers les microdomaines à un moment ou un autre de leur cycle (exemple : certains récepteurs à 7 domaines trans-membranaires couplés aux protéines G). Ces récepteurs ainsi que leurs effecteurs sont majoritairement palmitoylés à différents degrés. On a aussi démontré que ces microdomaines contiennent plusieurs protéines acylées comme les kinases de la famille Src (ex : Fyn, Lck) (Simons and Ikonen, 1997). Cette compartimentalisation de la membrane permet aussi d'autres mécanismes cellulaires importants dont un des mieux décrits est la synapse immunologique (Miyoshi et al., 1999).

3.5.2 Synapse immunologique

La synapse immunologique est définie comme étant l'interface stable et aplatie formée entre un lymphocyte activé et la cellule qu'il est en train de reconnaître (Huppa and Davis, 2003). Il a été démontré que les molécules clés de la signalisation des lymphocytes T, le TCR et l'intégrine LFA1 (abréviation de *Leukocyte Function Associated antigen 1*), ne sont pas seulement présentes à l'interface de la synapse immunologique, mais qu'elles sont groupées en zones grandement organisées. Ces zones sont appelées complexes d'activation supra-moléculaires (SMACs pour *Supra-Molecular Activation Complexes*). Le centre des SMACs est enrichi du TCR et d'un de ses effecteurs, la protéine kinase θ (PKC- θ). Les protéines impliquées dans

l'adhésion cellulaire (LFA1, taline) sont, quant à elles, situées dans la région périphérique des SMACs tandis que les plus grosses molécules impliquées dans la synapse (CD43, CD45) sont encore plus distales (Huppa and Davis, 2003). La localisation spatio-temporelle de ces protéines est le facteur clé permettant les activités de signalisation entre les cellules participant à la synapse immunologique. L'hypothèse selon laquelle les radeaux membranaires sont impliqués dans cette organisation a été corroborée quand il a été découvert que l'acylation de Lck et la palmitoylation de LAT sont nécessaires à la transmission du signal émanant du TCR. En effet, ces deux modifications déterminent fréquemment la localisation des protéines dans les domaines enrichis de cholestérol. Par la suite, cette idée a été à nouveau renforcée par des expériences montrant que la déprivation de cholestérol membranaire, qui déstabilise les radeaux membranaires, permet de moduler la signalisation du TCR (Kabouridis and Jury, 2008).

3.5.3 *Fusion membranaire*

L'eau est exclue des microdomaines ordonnés, car il y a peu d'accepteurs ou de donneurs de ponts hydrogène disponibles pour les molécules d'eau, puisqu'un fort réseau de liaisons hydrogène existe entre les différents lipides. Ceci permet à deux membranes de se rapprocher plus que la normale et favorise leur fusion (Tatulian and Tamm, 2000). Cette fonction potentielle des radeaux lipidiques est révélée par l'étude protéomique des DRMs. Par exemple, dans les DRMs des vésicules du transporteur de glucose (Glut4) et de la membrane plasmique des adipocytes qui fusionnent ensemble, on retrouve des v et des t-SNAREs, qui sont des protéines bien connues pour leur implication dans la fusion membranaire (Chamberlain and Gould, 2002; Hanzal-Bayer and Hancock, 2007). Lors de l'infection des cellules par un grand nombre de virus, la fusion avec la membrane plasmique est dépendante des sphingolipides et du cholestérol (Brugger et al., 2006; Nguyen and Hildreth, 2000).

3.5.4 Endocytose

Il y a quatre types distincts d'endocytoses qui ont été décrits : les vésicules enveloppées de clathrine, indépendantes des radeaux, ainsi que trois autres processus qui eux impliquent les radeaux lipidiques (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007). Le premier de ceux-ci, l'endocytose médiée par les cavéoles, est hautement régulé, nécessite la phosphorylation d'au moins une protéine (potentiellement la cavéoline) et forme une organelle au pH neutre nommée cavéosome (Kirkham and Parton, 2005; Parton et al., 2006). Le deuxième de ces processus, l'internalisation des récepteurs de l'interleukine 2 (IL-2R), est le résultat d'un type d'endocytose qui dépend de la dynamine et qui implique probablement les radeaux membranaires puisqu'elle coïncide avec le recrutement d'IL-2R dans les DRMs (Lamaze et al., 2001). Et finalement le troisième, l'endocytose impliquée dans le recyclage des protéines à ancre GPI des DRMs de la membrane plasmique qui achemine les GPI-APs dans les endosomes de recyclage sans passer par les endosomes précoces (Sabharanjak et al., 2002).

3.5.6 Interactions avec les agents pathogènes

Dans les dernières années, de nombreuses études sur les agents pathogènes (bactéries, virus, parasites et prions) ont montré que ceux-ci ont développé des moyens d'infecter les mammifères en se servant des propriétés des radeaux membranaires (figure 21). La bactérie *Neisseriae gonorrhoeae* utilise les radeaux membranaires formés à la surface des macrophages activés pour les infecter (Hauck et al., 2000). Les études montrent aussi que les radeaux membranaires sont importants pour l'internalisation de la bactérie *Escherichia coli*, dont l'adhésine FimH lie CD48 des cellules épithéliales, une GPI-AP (Shin et al., 2000). Les *E. coli* ainsi internalisées peuvent survivre et se répliquer en inhibant la fusion de leur vésicule avec les lysosomes. Un prétraitement des cellules avec des drogues réduisant le taux de cholestérol membranaire diminue significativement l'internalisation de *E. coli*, ce qui indique le rôle important des radeaux membranaires dans cette infection. *Pseudomonas aeruginosa* est un autre

exemple de bactérie qui utilise les radeaux membranaires comme porte d'entrée dans les cellules des mammifères. À l'instar de *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* stimule l'activité de la sphingomyélinase acide, ce qui dérégule l'apoptose et permet au parasite de survivre plus longtemps dans la cellule (Manes et al., 2003). *Shigella flexneri* provoque son entrée par macropinocytose dans la cellule en sécrétant des antigènes du plasmide d'évasion (Ipa pour *Invasion plasmid antigens*). L'interaction entre IpaB et le récepteur CD44 de la cellule dépend du partitionnement de CD44 dans les radeaux pour activer le remodelage de l'actine nécessaire aux étapes subséquentes de l'engouffrement de la bactérie (Lafont et al., 2002). Les mycobactéries sont phagocytées par les macrophages et peuvent aussi survivre en empêchant la fusion des phagosomes qui les contiennent avec des lysosomes. Cette inhibition est possible grâce au recrutement à la membrane du phagosome de la protéine associée aux radeaux TACO/Coronine-1 (Gatfield and Pieters, 2000).

Les prions sont une classe de protéines qui causent des maladies dégénératives des neurones telles que la maladie de Creutzfeldt–Jakob, l'encéphalite spongiforme bovine, la tremblante du mouton et le kuru. Les prions (PrP pour *Prion Protein*) sont des composants normaux des cellules de mammifères, mais un changement de conformation vers la forme PrP^{sc} (*Prion Protein scrapie-isoform*) provoque la maladie. Les radeaux membranaires sont nécessaires pour la conversion des PrP en PrP^{sc} et la diminution de sphingolipides ou de cholestérol dans les membranes inhibe cette conversion (Baron et al., 2002).

L'entrée dans la cellule du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est aussi inhibée lorsqu'on détruit les radeaux membranaires. La protéine gp 120 de VIH se lie à CD4 qui est constitutivement localisé dans les DRMs de la cellule. Cette liaison semble provoquer une coalescence des radeaux membranaires qui permet au virus d'interagir en plus avec ses co-récepteurs CCR5 et CXCR4 (Jolly and Sattentau, 2005; Popik et al., 2002). La composition de l'enveloppe du virus a, de plus, mis en évidence que les radeaux membranaires sont aussi impliqués dans le bourgeonnement du virus (Brugger et al., 2006).

Certains parasites intracellulaires utilisent aussi les radeaux membranaires au cours de leur pathogénicité, notamment *Plasmodium falciparum*, qui envahit les érythrocytes causant la malaria. L'extraction du cholestérol des érythrocytes empêche le parasite de causer son infection. Le rôle des radeaux membranaires dans l'infection de *P. falciparum* est aussi confirmé par le fait que les interactions entre le pathogène et les érythrocytes produisent la dissociation de flotilline-1 des DRMs (Nagao et al., 2002). Finalement, sans qu'un lien n'ait été établi entre l'internalisation du parasite *Leishmania donovani* et les radeaux membranaires, il a été démontré que la molécule de surface LPG (lipophosphoglycan) de ce pathogène lui permet de désorganiser les radeaux membranaires du phagosome qui le contient. Cette désorganisation des DRMs du phagosome permet au parasite de survivre et de se répliquer dans une vésicule qui ne peut plus fusionner avec les endosomes et lysosomes (Dermine et al., 2005).

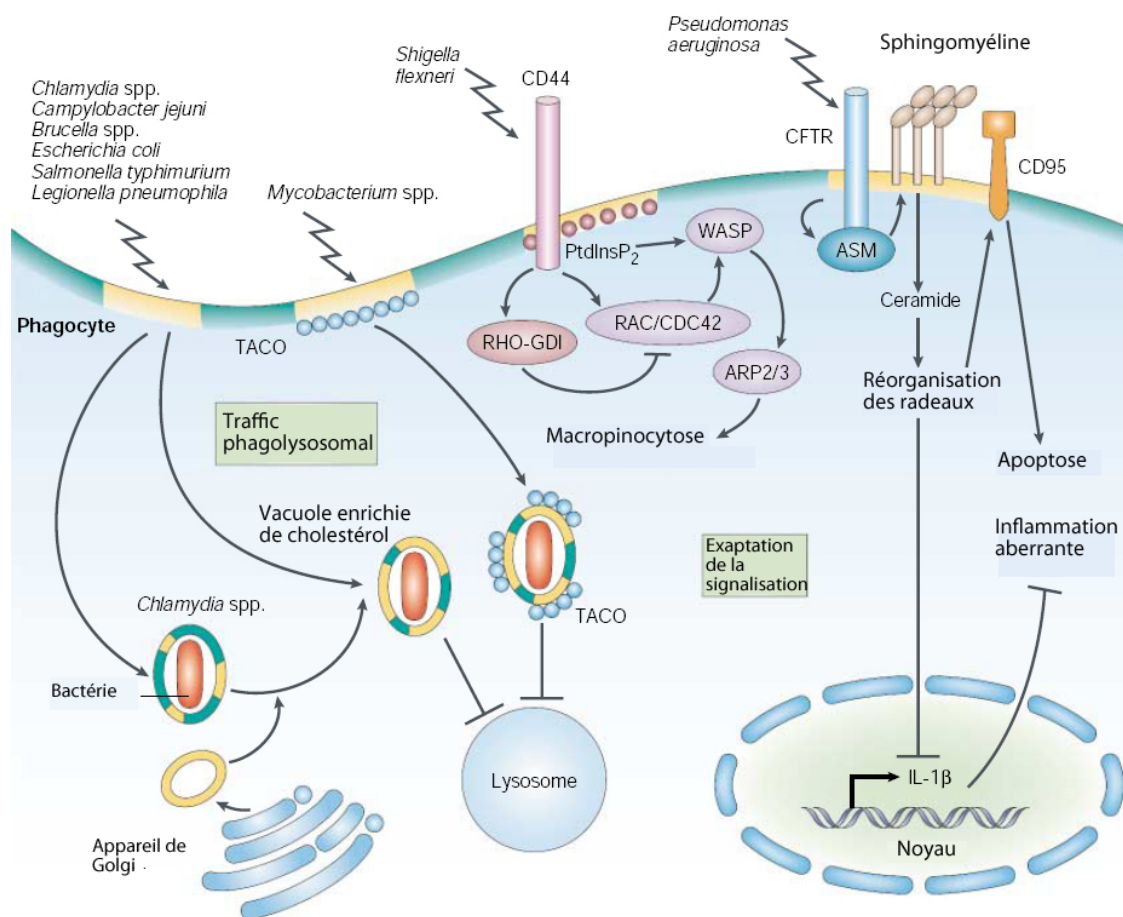


Figure 21 : De nombreuses bactéries utilisent les propriétés des radeaux membranaires pour infecter les cellules de mammifères (addapté de Manes et al., 2003).

**CHAPITRE II. INTRODUCTION. TRAVAUX DE
DOCTORAT**

Buts, données préliminaires et hypothèses de travail

Le premier but de ce travail de doctorat était de décrire l'implication de la molécule LPG de *L. donovani* dans l'inhibition de certaines fonctions du phagosome. Au moment d'élaborer mon projet, la capacité de *L. donovani* à bloquer la maturation du phagosome en inhibant la fusion avec les endosomes était déjà connue (Desjardins and Descoteaux, 1997). Plus particulièrement, il avait été démontré que cette inhibition était un processus actif médié par la molécule LPG du parasite (Dermine et al., 2000). Par la suite, une étude protéomique a révélé que flotilline-1 fait partie des protéines du phagosome, indiquant la présence possible de radeaux lipidiques sur cette organelle (Garin et al., 2001). En démontrant que les radeaux lipidiques enrichis de flotilline-1 et du lipide GM1 sont bel et bien présents sur les phagosomes, mes prédécesseurs du laboratoire du D^r Desjardins ont observé que *L. donovani* empêche l'arrivée de flotilline-1 sur la majorité des phagosomes, et que cette inhibition est causée, elle aussi, par le LPG. En effet, un mutant déficient pour le LPG (*lpg2-*) affecte moins le recrutement de flotilline-1 sur le phagosome (Dermine et al., 2001). L'hypothèse formulée pour cette première partie du projet de doctorat est donc :

La molécule lipophosphoglycan (LPG) de Leishmania donovani est directement responsable des effets inhibiteurs du parasite sur certaines des fonctions cruciales des phagosomes (fusion, acidification) qu'elle cause en ciblant les radeaux membranaires, ce qui permet au parasite de survivre à la phagocytose.

Pour tester cette hypothèse, nous avons provoqué la phagocytose de *Leishmania* de type sauvage ou *lpg2-* puis nous avons observé le comportement de marqueurs spécifiques pour les radeaux lipidiques par microscopie confocale, microscopie électronique et immunobuvardage sur les phagosomes de *Leishmania*.

Le second but de ce travail était d'effectuer une caractérisation approfondie des radeaux lipidiques du phagosome au niveau protéomique et lipidomique, mais plus

particulièrement au niveau protéomique. L'identification des protéines composant ces sous-domaines constituait la première étape logique qui a permis par la suite de mieux comprendre et d'analyser les fonctions spécifiques des radeaux lipidiques sur le phagosome.

Les radeaux membranaires ont été décrits comme des sous-domaines de la membrane enrichis de certaines protéines dont le rapprochement leur permet d'exercer leurs fonctions. Notre groupe a été le premier à démontrer la présence de radeaux lipidiques sur le phagosome et très peu de choses sont actuellement connues sur la composition protéique et la dynamique d'acquisition de ces sous-domaines au cours de la biogenèse des phagosomes. Nous avons émis l'hypothèse suivante :

Les radeaux membranaires du phagosome et leur équivalent biochimique (DRMs) contiennent un sous-ensemble spécifique de protéines, tout comme les radeaux de la membrane plasmique décrits par d'autres équipes. Nous allons plus loin en suggérant que la composition protéique des radeaux membranaires varie au cours de la maturation du phagosome.

Pour tester cette hypothèse, nous avons fractionné de façon biochimique les microdomaines (DRMs et DSMs) de phagosomes purifiés à trois moments clés de leur maturation (0, 30 et 240 minutes de chasse). Nous avons séparé les protéines sur un gel de polyacrylamide avant de soumettre les protéines ainsi récoltées au spectromètre de masse. Une analyse bio-informatique approfondie des spectres de masse a ensuite été effectuée afin d'identifier et de comparer les protéines présentes dans les DRMs et/ou les DSMs en fonction de la maturation des phagosomes. Pour affiner notre analyse du protéome de cette organelle, nous avons aussi procédé à une étude des phospholipides du phagosome pour tenter de déterminer si la modulation des protéines des microdomaines coïncide avec un changement au niveau des phospholipides.

Les chapitres suivants (III et IV) présentent les études réalisées dans le but de vérifier ces hypothèses.

CHAPITRE III. RÉSULTATS ARTICLE 1

Goyette, G., Dermine, J-F., Houde, M., Turco, S.J., Desjardins, M. (2005)
Leishmania donovani lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774
macrophages. *Cell Microbiol* 7(9), 1263-1270

***Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages**

Guillaume Goyette ^{1†}, Jean-François Dermine ^{1†}, Mathieu Houde ¹, Salvatore J. Turco ² and Michel Desjardins ^{1,3 *}

[†] These authors contributed equally.

1 Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, C. P. 6128, Succ. Centre ville, Montreal, H3C 3J7, Canada.

2 Department of Biochemistry, University of Kentucky, Medical Center, Lexington, KY 40536, USA.

3 Caprion Pharmaceuticals Inc., Montreal, Canada

Summary

Clearance of pathogens by phagocytosis and their killing in phagolysosomes is a key aspect of our innate ability to fight infectious agents. *Leishmania* parasites have evolved ways to survive and replicate in macrophages by inhibiting phagosome maturation and avoiding the harsh environment of phagolysosomes. We describe here that during this process *Leishmania donovani* uses a novel strategy involving its surface lipophosphoglycan (LPG), a virulence factor impeding many host functions, to prevent the formation or disrupt lipid microdomains on the phagosome membrane. LPG acts locally on the membrane and requires its repetitive carbohydrate moieties to alter the organization of microdomains. Targeting and disruption of functional foci, where proteins involved in key aspects of phagolysosome biogenesis assemble, is likely to confer a survival advantage to the parasite.

Introduction

Phagocytosis plays a key role in our innate ability to restrict the spread of infectious diseases. Microorganisms internalized by phagocytosis are sequestered in phagosomes, which are initially inapt at killing and degrading pathogens. They acquire their microbicidal properties through a complex maturation process, involving sequential fusion with endocytic organelles, leading to the formation of phagolysosomes (Desjardins, 2003). The complexity of this process is only beginning to be deciphered, as it encompasses the coordinated activity of hundreds of proteins (Garin *et al.*, 2001). Through evolution, pathogens have developed strategies to adapt and survive in their hosts by avoiding the harsh environment of phagolysosomes. Sets of evidence indicate that the strategy used by the intracellular pathogen *Leishmania* to survive in mammalian macrophages relies on the use of its cell surface lipophosphoglycan (LPG) to alter some of the functional properties of the host phagosomes where they reside. Indeed, LPG has been shown to inhibit the ability of phagosomes to fuse with late endocytic organelles and lysosomes (Desjardins and Descoteaux, 1997; Dermine *et al.*, 2000; Spath *et al.*, 2003). In addition to its effect on

membrane fusion, LPG is known to have pleiotropic deleterious effects on host cells, altering functions as diverse as signal transduction, the oxydative burst and actin organization (Descoteaux and Turco, 2002). The mechanism by which a single molecule like LPG can interfere with a variety of key host functions is puzzling. We showed recently that unlike LPG^{-/-} mutants, wild-type *Leishmania donovani* reside within phagosomes not displaying flotillin-1-enriched microdomains, suggesting that this parasite might target these structures for its survival in macrophages (Dermine *et al.*, 2001). As microdomains have been shown to play key roles in various cellular functions, including signal transduction (Simons and Vaz, 2004), targeting of these structures in phagosomes by pathogens might confer a survival advantage. We show here that *Leishmania* promastigotes use LPG to directly alter the formation of phagosome lipid microdomains and/or disorganize these structures after phagocytosis. This process is likely to explain the multiple effects of LPG on macrophage functions, and to be beneficial to the parasite because phagosome microdomains contain proteins involved in important aspects of phagolysosome biogenesis.

Results and discussion

Multiple microdomains on the phagosome membrane

Identification of flotillin-1 in latex bead-containing phagosomes by proteomics analysis (Garin *et al.*, 2001) led to the finding that microdomains are present on the membrane of this organelle but absent from phagosomes containing the intracellular parasite *L. donovani* (Dermine *et al.*, 2001). The present study shows that various types of microdomains assemble on phagosomes. Indeed, although both the (cholera toxin B subunit) CTB-FITC-labelled ganglioside GM1, delivered to phagosomes from the cell surface, and flotillin-1, acquired by phagosomes during maturation from an internal source (Dermine *et al.*, 2001), display a punctate pattern of labelling on the phagosome membrane, these two molecules do not colocalize (Fig. 1). This indicates that instead of being made of a membrane where lipids and proteins are randomly distributed, phagosomes display specialized regions where specific functions could take place, providing an additional level of organization to the organelle (Fig. 1E).

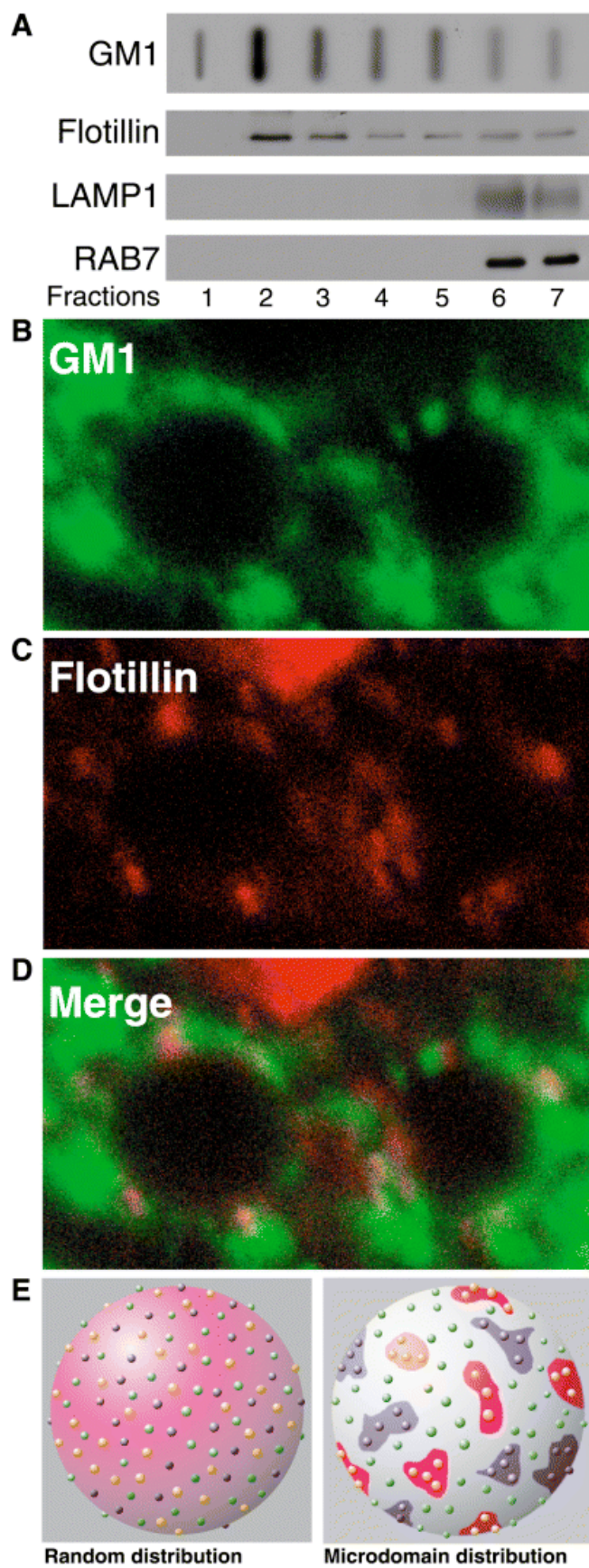


Fig. 1. Multiple domains on the phagosome membrane.

A. Lipid microdomains were isolated from purified phagosomes based on their insolubility in Triton X-100 and floatation on OptiprepTM gradients. GM1 and flotillin-1 are enriched in fractions 2 and 3 where lipid microdomains are expected, while LAMP1 and Rab7, soluble in Triton X-100, remain in the bottom.

B. Latex bead phagosomes in J774 macrophages were able to receive GM1 (labelled with CTB-FITC) from the cell surface which accumulates in a dotted pattern on the phagosome membrane.

C. Flotillin-1, revealed by immunofluorescence, also presents a punctate pattern.

D. The distinct localization of these 2 raft markers indicates that instead of being made of lipids and proteins randomly distributed, the phagosome membrane displays multiple microdomains, as shown in E.

Leishmania promastigotes use their surface LPG to prevent the assembly of GM1-enriched microdomains on phagosomes

In contrast with latex bead-containing phagosomes, *L. donovani* promastigotes, the form that initiates infection in mammals, is able to prevent the phagosomal recruitment of GM1 from the cell surface (Fig. 2A). Insights into the molecular mechanisms allowing this parasite to prevent the assembly of microdomains on phagosomes came from the use of a genetic approach taking advantages of mutants defective for the synthesis of glycoconjugates. The first mutant used here was defective for the Golgi GDP-Man transporter (*lpg2^{-/-}*) (Descoteaux *et al.*, 1995), a condition characterized by the lack of all phosphoglycan-containing glycoconjugates, including alkaline phosphatase and LPG. In contrast to wild type-containing phagosomes, cell surface GM1 assembled on the membrane of phagosomes containing this mutant (Fig. 2B), indicating that glycoconjugates was contributing to the ability of wild-type parasites to interfere with the assembly of phagosome microdomains. The fact that similar results were obtained when a second mutant that affects specifically the synthesis of LPG (*lpg1^{-/-}*) was used, strongly suggested the involvement of that molecule in the process. The role of LPG was confirmed when it was shown that opsonization of mutant parasites with purified LPG, prior to phagocytosis, conferred the ability to inhibit the recruitment and/or assembly of GM1-enriched microdomains, as observed for wild-type parasites (Fig. 2C and D).

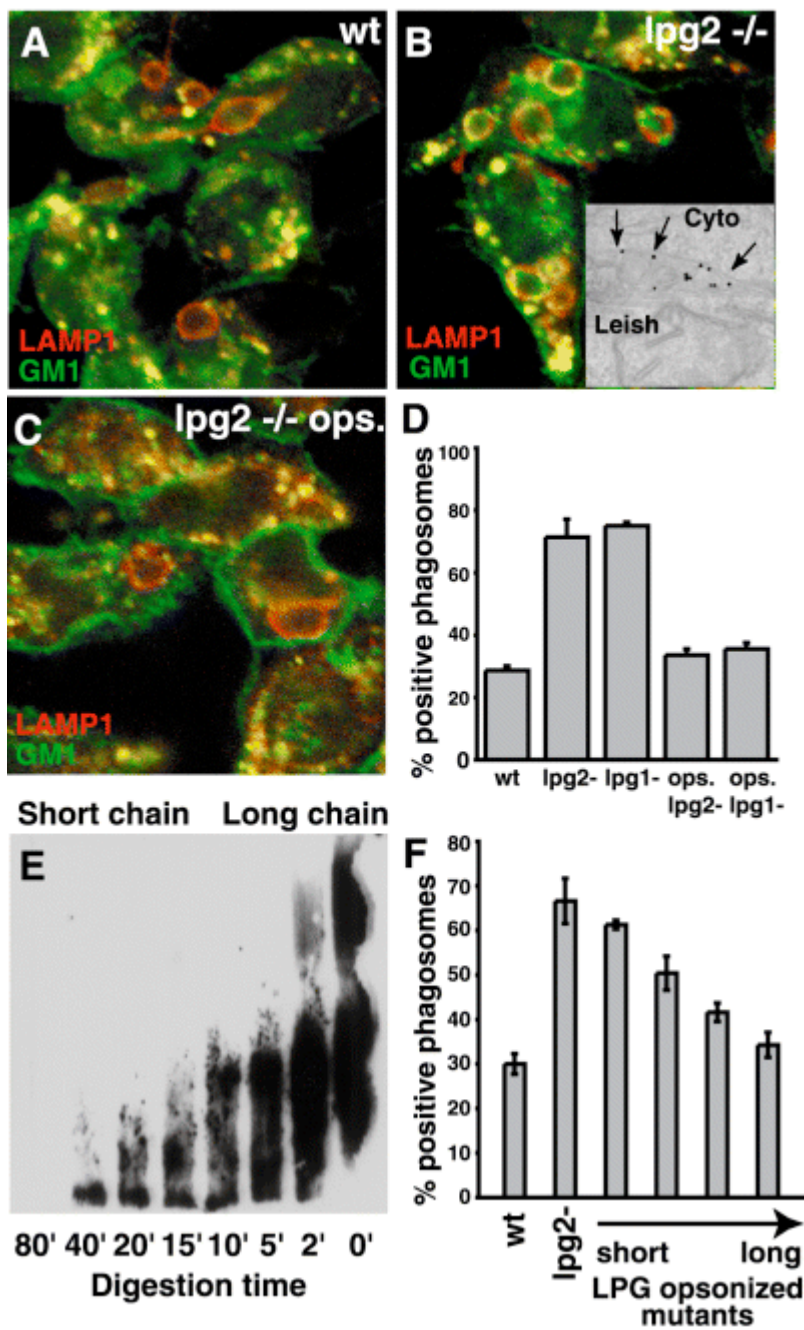


Fig. 2. LPG prevents the recruitment/formation of GM1-enriched microdomains.

J774 cells were exposed to wild-type *L. donovani* promastigotes (A), *lpg2*^{-/-} mutants lacking LPG (B), or *lpg2*^{-/-} mutants opsonized with purified LPG (C) for 30 min followed by a 30 min chase. The plasma membrane GM1 was then labelled with CTB-FITC as in Fig. 1B. The cells were then labelled for LAMP1 (red labelling) to identify phagosomes.

A. Wild-type parasites prevent the phagosomal acquisition of surface GM1 as shown by the exclusion of CTB-FITC labelling from the phagosome membrane.

B. In contrast, several GM1-enriched microdomains are formed on phagosomes containing *lpg2*^{-/-} mutants. Insert) At the electron microscope, the use of CTB-gold to label surface GM1 indicates that GM1-enriched microdomains are present within the phagosome membrane and not in vesicles surrounding phagosomes, as shown by the presence of the gold particles on the luminal side of phagosomes. Arrows indicate the phagosome membrane surrounding a parasite (Leish).

C. Phagosomes containing opsonized mutants display a labelling similar to the one observed for wild type.

D. Quantitative analysis of the percentage of phagosomes displaying GM1-enriched microdomains. Bars: mean standard error.

E. Acid hydrolysis of LPG generated molecules with shorter chains of disaccharidic repeating units, as shown by Western blotting using anti-LPG antibody.

F. *Lpg2*^{-/-} mutants were opsonized with the various shortened LPG molecules and used to infect cells. Plasma membrane GM1 was labelled with CTB-FITC as in A. The results show a direct relation between the length of LPG and its ability to inhibit GM1 recruitment from the cell surface. Bars: mean standard error.

Lypophosphoglycan is a polymer of repeating Gal(β 1,4)Man α 1-PO₄-6 β units, attached via a glycan core of 6 sugars to a 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(myo)inositol anchor, terminated with an oligosaccharide containing galactose and mannose residues. As *lpg1* and *2^{-/-}* mutants still display the lipid anchor and the glycan core at their surface (Descoteaux *et al.*, 1995), these parts of the molecule are unlikely to be directly involved in the prevention of GM1 delivery to phagosome microdomains. To assess, rather, if the polymer of disaccharidic repeating units is required per se, *lpg1* and *2^{-/-}* parasites were opsonized with purified LPG displaying chains of various lengths, obtained by partial depolymerization of the repeating units by mild acid hydrolysis (Fig. 2E). The various opsonized parasites were phagocytosed and tested for their ability to inhibit the recruitment of GM1 to phagosomes. These results demonstrate that the ability to prevent GM1 delivery to phagosome microdomains is related to the length of the LPG chain (Fig. 2F).

Lypophosphoglycan prevents the recruitment of GM1-microdomains to phagosomes by a direct action on the membrane

Evidence for a direct action of LPG on the phagosome membrane came from experiments where purified LPG was added to cultured cells, already containing phagosomes, in order to allow its internalization by endocytosis and its delivery to phagosomes through early endosomes–phagosome fusion. In such conditions, in contrast to phagosomes without LPG where GM1 accumulates (Fig. 3A), delivery of LPG to phagosomes containing *lpg^{-/-}* parasites conferred the ability to prevent the accumulation of surface GM1 on microdomains (Fig. 3B and C). Remarkably, when delivered to phagosome by endocytosis, LPG was not observed in all phagosomes or, in some cases, evenly distributed in the phagosome lumen. However, at sites where LPG was present, the subsequent accumulation of cell surface GM1 was prevented. Indeed, GM1 could still accumulate at sites where LPG was not present. When LPG was present all around the phagosome membrane, the cell surface GM1 was not

incorporated and remained in vesicles around the phagosome (Fig. 3C, lower panel).
Vesicles containing cell surface

GM1 (labelled with cholera toxin-gold) were also observed around some phagosomes in similar conditions at the electron microscope level (Fig. 3D). These results indicate that LPG exerts a direct action on the phagosome membrane to modify its properties and alter its ability to assemble or acquire membrane microdomains.

Lypophosphoglycan disrupts assembled phagosome microdomains without altering their protein composition

We investigated next if LPG could also disrupt microdomains already assembled on phagosomes. Accordingly, we started sets of experiments with phagosomes containing $lpg^{-/-}$ mutants that acquired CTB-FITC-labelled GM1 from the cell surface and displayed a typical dotted labelling for GM1 (Fig. 4A, - LPG). The subsequent endocytosis of exogenous LPG and its delivery to phagosomes, through endosomes-phagosome fusion, resulted in the loss of the dotted GM1 labelling (Fig. 4A, + LPG), which was replaced by a dim labelling around the whole surface of the phagosome membrane (inserts in Fig. 4A, + LPG). These results indicate that LPG can also affect the properties of preexisting microdomains on the phagosome membrane. Addition of LPG to latex bead phagosomes also led to the disorganization of GM1-enriched microdomains (not shown). Moreover, addition of LPG to phagosomes containing either $lpg^{-/-}$ mutants (not shown) or latex beads (Fig. 4B), resulted in the inability to detect flotillin-1 on these organelles. Western blot and slot blot analysis of purified latex bead phagosomes indicated that despite the loss of the fluorescent signal after LPG delivery, the relative level of flotillin-1, as well as GM1, was unchanged (Fig. 4B, right panel). These results indicate that the loss of fluorescent signal is caused by a redistribution of the molecules in the phagosome membrane following LPG delivery rather than their removal.

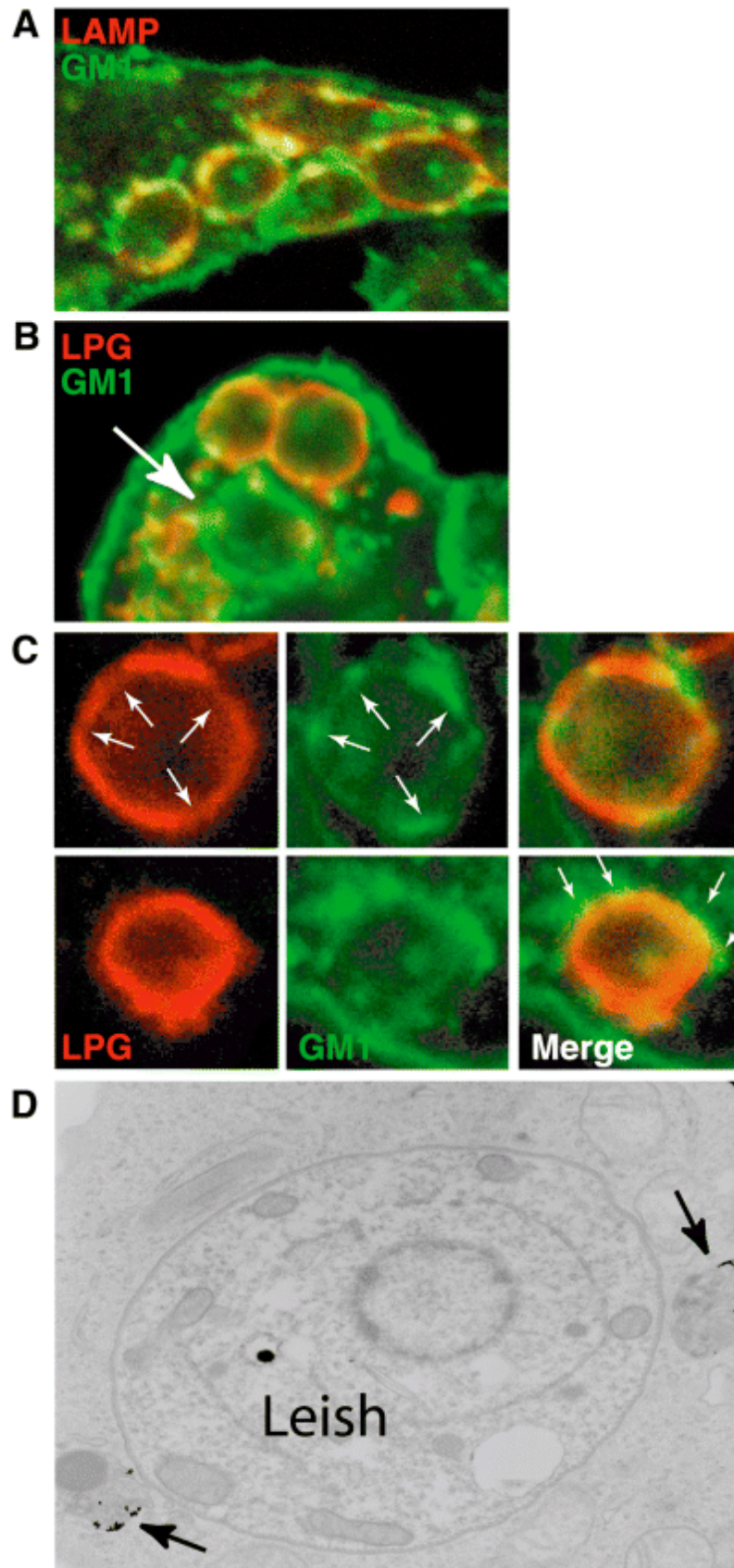


Fig. 3. *LPG prevents the recruitment of GM1 to phagosomes by a direct action on the membrane.*

A. Cells infected with *lpg2^{-/-}* mutants and labelled for GM1 display phagosomes with several GM1-enriched microdomains, as shown in Fig. 2B.

B. In contrast, when purified LPG was added to *lpg2^{-/-}* phagosomes by endocytosis (endosome–phagosome fusion), the recruitment of surface GM1 was inhibited specifically at sites where LPG was present (no yellow overlay). In the cases where LPG did not reach phagosomes (large arrow), the recruitment of GM1 was not prevented.

C. Two examples taken from experiments like in B are shown. In the upper panels, GM1 is observed only at sites where LPG is absent (small arrows). When LPG is present all around the phagosome membrane, GM1 is not incorporated and remains in vesicles around phagosomes (arrows in lower panel).

D. An example of GM1 (CTB-gold) in vesicles (arrows) around a phagosome is shown.

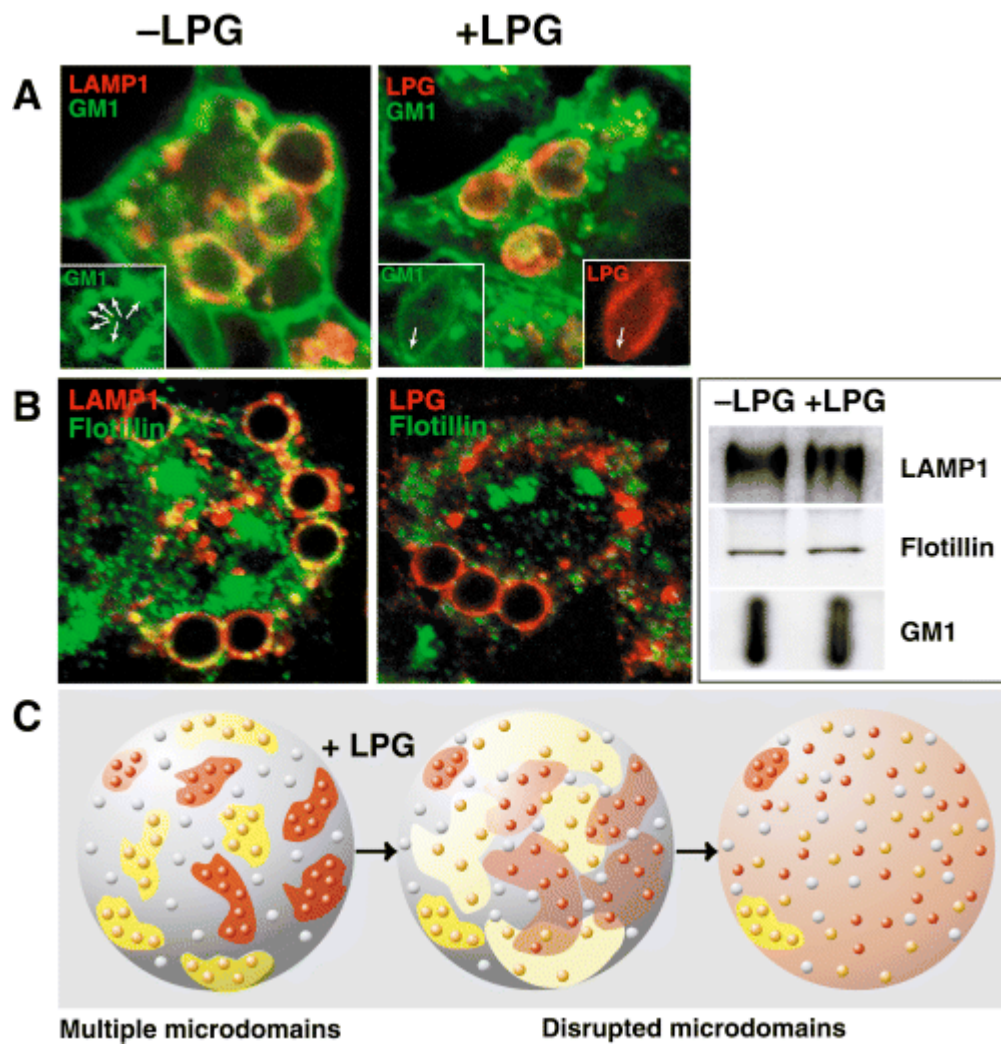


Fig. 4. LPG disrupts preexisting phagosome microdomains by promoting their disassembly rather than by altering their protein composition.

A. Phagosomes formed by the internalization of *lpg2*^{-/-} mutants were allowed to receive surface GM1 (see 2B). Purified LPG was then added in the culture medium (+IPG) or not (-IPG), a process that allows the transfer of LPG to phagosomes (see 3B). Phagosomes were then identified using antibodies against LPG or LAMP1. Before the addition of LPG, phagosomes displayed several GM1-enriched microdomains (white arrows in insets), the subsequent delivery of LPG to phagosomes resulted in the loss of the dotted signal replaced by a faint CTB-FITC signal all around the phagosome membrane (the left inset in the +IPG panel), except in one region where LPG is not detected (arrow).

B. While late phagosomes containing latex beads normally display a punctate pattern for flotillin-1 (-IPG), the delivery of LPG to this compartment also disrupts flotillin-1-enriched microdomains (loss of yellow overlay). Interestingly, Western and dot blot analysis for LAMP1, flotillin-1, and GM1 indicates that the delivery of LPG has no effect on the relative amounts of these molecules on phagosomes.

C. When LPG is added to phagosomes and, in the context of the infection when it is released by promastigote parasites after their internalization by macrophages, microdomains dissolve and their components either lipids or proteins are redistributed to the whole surface of the organelle, leading to potential functional losses.

Although the precise functions of phagosome membrane microdomains are poorly understood, proteomics analyses indicate that they might be involved in signal transduction, membrane fusion, actin organization, and the oxidative burst (Dermine *et al.*, 2001; G. Goyette and M. Desjardins, unpubl.). As these processes play key roles in phagolysosome biogenesis, alteration of phagosome microdomains could thus represent a relevant strategy for the establishment of a replicative niche in host cells. Interestingly, the first reports of a deleterious effect of LPG on host cells described an attenuation of the oxidative burst and an inhibition of signalling through protein kinase C (PKC) activity (McNeely and Turco, 1990; Descoteaux *et al.*, 1992). LPG was also shown to inhibit phagosome–lysosome fusion, a key process for the killing and degradation of *Leishmania* (Desjardins and Descoteaux, 1997; Dermine *et al.*, 2000). The NADPH oxidase, involved in the oxidative burst, various PKC isoenzymes, and several proteins involved in membrane fusion were recently shown to be present in lipid microdomains (Chamberlain *et al.*, 2001; Lang, 2002; Becart *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2003; Vilhardt and Van Deurs, 2004).

Further links exist between LPG and the disruption of cellular functions associated to membrane microdomains. Infection of CD4⁺ T cells by HIV, a process involving membrane fusion and lipid microdomains (Manes *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2001), is inhibited by LPG (Easterbrook *et al.*, 1995). When introduced in erythrocyte ghost membranes, LPG blocks binding, as well as fusion, of Sendai and influenza viruses (Miao *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 2003), a process occurring in lipid microdomains (Liao *et al.*, 2001).

Insights into the molecular mechanisms by which LPG could alter phagosome membrane microdomains at the onset of infection come from the life cycle of the parasite and the physicochemical properties of this glycoconjugate. LPG is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored glycolipid present within lipid microdomains at the surface of the promastigote form of the parasite (Denny *et al.*, 2001), the flagellated developmental stage transmitted by sandflies to the mammalian

host. After internalization in macrophages by phagocytosis, LPG is shed from the parasite surface (Kaneshiro *et al.*, 1982; Denny *et al.*, 2001) and inserted in host cell membranes (Tolson *et al.*, 1990), modifying their physical organization (Miao *et al.*, 1995). This points to a possible mechanism by which the negatively charged sugar chain of LPG directly interferes with the clusterization of molecules into microdomains. In this regard, it has recently been proposed that a phase transition of membrane components from a liquid to a solid crystalline phase could be central to the functional role of membrane microdomains (Joly, 2004). According to this concept, the disrupting action of LPG could be resulting from the capacity of the heavily charged head of LPG to interfere with the assembly of such structures, or even to cause their disassembly, as observed for the GM1 containing structures.

Experimental procedures

Cell culture

The J774 murine macrophage cell line and the *L. donovani* wild types and mutant *lpg2^{-/-}* and *lpg1^{-/-}* strains (kind gift from A. Descoteaux) were cultured as described previously (Duclos *et al.*, 2000). Briefly, *L. donovani* parasites (strain 1S) were grown at 26°C in modified M199 medium, pH 7.3 and used in stationary phase as described previously (Desjardins and Descoteaux, 1997). The choice of this type of parasite was motivated in order to reproduce the conditions in which LPG was originally shown to inhibit phagosome membrane fusion (Desjardins and Descoteaux, 1997).

GM1-rafts labelling and immunofluorescence

J774 cells grown on coverslips were infected with *L. donovani* strain 1S, with LPG-mutants (*lpg2^{-/-}* and *lpg1^{-/-}*) lacking the surface glycolipid lipophosphoglycan (LPG), or fed 3 µm latex beads (Polyscience) for 30 min followed by a 30 min chase without bead or parasite. The cell surface GM1 was then labelled by incubating cells with 5 µg ml⁻¹ of CTB-FITC (Sigma) in culture medium at 4°C to prevent internalization of the toxin. After washing unbound CTB, cells were further incubated for 2 h in normal medium, a time period sufficient to allow the delivery of cell surface GM1 to

phagosomes. Cells were then fixed and processed as described (Dermine *et al.*, 2001). To reveal phagosomes, cells were incubated with the rat anti-LAMP1 1D4B for 1 h. In some experiments, phagosomes were also doubly labelled for flotillin-1 and either LAMP1 or cholera toxin as described previously (Dermine *et al.*, 2001).

Effect of purified LPG on phagosome lipid microdomains

The effect of purified LPG on phagosome microdomains was tested in two distinct conditions, to (i) see if LPG can inhibit the phagosomal acquisition of GM1 from the cell surface (as well as flotillin-1 from an internal source) and (ii) see if LPG can alter the organization of microdomains already present on phagosomes. In the first case, J774 cells displaying phagosomes containing either LPG-deficient *Leishmania* or latex beads were allowed to internalize purified LPG (1 mg ml⁻¹ in PBS) by endocytosis for 30 min, followed by a further incubation of 30 min without LPG, allowing the delivery of LPG to phagosomes through endosomes-phagosome fusion. The cell surface GM1 was then labelled as described in the previous section, and cells observed at the confocal microscope (Leica Microsystems model DM IRBE) to determine if GM1-enriched microdomains were present on phagosomes. In the second case, phagosomes were formed by the internalization of LPG-deficient *Leishmania* as above. The cell surface GM1 was then labelled with CTB-FITC and cells incubated to allow the formation of CTB-FITC-labelled GM1-enriched microdomains on phagosomes. Purified LPG was then internalized as above.

Western and slot blotting

Western blotting for flotillin-1, LAMP-1 and Rab7 was performed using the 1D4B rat monoclonal antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) directed against LAMP1, a polyclonal antibody specific for flotillin-1 (kind gift from G. van der Goot) and a polyclonal antibody against Rab7 (Santa Cruz). To detect the lipid ganglioside GM1, slot blotting with CHTX-HRP was used.

Lypophosphoglycan purification and digestion, and opsonization of the L. donovani mutants

Lypophosphoglycan from promastigote cultures was extracted in solvent E as previously described (Orlandi and Turco, 1987). To shorten the length of LPG, 15 µg of purified LPG from *L. donovani* was cleaved at acid-labile phosphodiester bridges by incubation in 0.01 N HCl for the indicated time points at 60°C. The samples were then treated with 0.01 N NaOH to neutralize acidity and put on ice. To verify the proper digestion of LPG, SDS-PAGE separation of the fragments on 12% gels was performed prior to Western blotting with the CA7AE antibody, which recognizes the repeating units of LPG (Tolson *et al.*, 1989).

To opsonize LPG-deficient parasites, 1.0×10^6 *lpg2*^{-/-} and *lpg1*^{-/-} *L. donovani* were incubated for 30 min at room temperature in 15 µl of 1 mg ml⁻¹ of full length or digested LPG in PBS.

Isolation of phagosome microdomains

Lipid microdomains were isolated from phagosomes made as described previously (Desjardins *et al.*, 1994). Briefly, the phagosome pellet was resuspended in 0.3 ml of TNE-Triton buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, complete protease inhibitor (Boehringer), pH 7.4 and 1% Triton X-100), transferred to an Eppendorf tube and shaken gently 30 min at 4°C to solubilize phagosomal membranes. Latex beads were then pelleted twice by centrifugation and the final supernatant containing the solubilized and insoluble phagosome components was added to 0.6 ml 60% OptiprepTM to obtain a final concentration of 40% which was then poured at the bottom of an Ultraclear centrifuge tube (Beckman). Finally, 2.4 ml of 30% OptiprepTM and 0.9 ml of TNE buffer (with protease inhibitors) were layered on top. After a 4 h centrifugation at 40 000 r.p.m. (SW60 rotor) to float the insoluble rafts, 7 fractions of 0.6 ml were collected from the top. Proteins were then precipitated with methanol/chloroform and resuspended in Laemmli buffer for Western blotting. Ten

microlitres of each fraction were collected prior to precipitation for GM1 slot-blot analysis.

Acknowledgements

We thank E. Joly, I. Jutras and A. Descoteaux for their comments. S.J.T. is supported by NIH Grant AI20941. This work was supported by grants from the CIHR and Genome Québec/Canada.

References

Becart, S., Setterblad, N., Ostrand-Rosenberg, S., Ono, S.J., Charron, D., and Mooney, N. (2003) Intracytoplasmic domains of MHC class II molecules are essential for lipid-raft-dependent signaling. *J Cell Sci* 116: 2565–2575.

Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D., and Gould, G.W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5619–5624.

Denny, P.W., Field, M.C., and Smith, D.F. (2001) GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett* 491: 148–153.

Dermine, J.-F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A., and Desjardins, M. (2000) *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* 1: 19–32.

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.

Descoteaux, A., and Turco, S.J. (2002) Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect* 4: 975–981.

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

Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (1995) Specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 269: 1869–1872.

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

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

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

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.

Easterbrook, M.D., Levy, M.H., Gomez, A.M., Turco, S.J., Epand, R.M., and Rosenthal, K.L. (1995) Inhibition of HIV-1-induced syncytia formation and infectivity by lipophosphoglycan from *Leishmania*. *J Acquir Immune Defic Syndr* 10: 496–505.

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

Joly, E. (2004) Hypothesis: could the signalling function of membrane microdomains involve a localized transition of lipids from liquid to solid state? *BMC Cell Biol* 5: 3.

Kaneshiro, E.S., Gottlieb, M., and Dwyer, D.M. (1982) Cell surface origin of antigens shed by *Leishmania donovani* during growth in axenic culture. *Infect Immun* 37: 558–567.

Lang, M.L. (2002) IgA Fc receptor (FcalphaR) cross-linking recruits tyrosine kinases, phosphoinositide kinases and serine/threonine kinases to glycolipid rafts. *Biochem J* 364: 517–525.

Liao, Z., Cimasky, L.M., Hampton, R., Nguyen, D.H., and Hildreth, J.E. (2001) Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 1009–1019.

McNeely, T.B., and Turco, S.J. (1990) Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol* 144: 2745–2750.

Manes, S., del Real, G., Lacalle, R.A., Lucas, P., Gomez-Mouton, C., Sanchez-Palomino, S., et al. (2000) Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep* 1: 190–196.

Miao, L., Stafford, A., Nir, S., Turco, S.J., Flanagan, T.D., and Epanand, R.M. (1995) Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry* 34: 4676–4683.

Orlandi, P.A., Turco, S.J. (1987) Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 262: 10384–10391.

Shao, D., Segal, A.W., and Dekker, L.V. (2003) Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett* 550: 101–106.

Simons, K., and Vaz, W.L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33: 269–295.

Spath, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2003) The role (s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9536–9541.

Takeda, M., Leser, G.P., Russell, C.J., and Lamb, R.A. (2003) Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14610–14617.

Tolson, D.L., Turco, S.J., Beecroft, R.P., and Pearson, T.W. (1989) The immunochemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 35: 109–118.

Tolson, D.L., Turco, S.J., and Pearson, T.W. (1990) Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 58: 3500–3507.

Vilhardt, F., and Van Deurs, B. (2004) The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *EMBO J* 23: 739–748.

CHAPITRE IV. RÉSULTATS ARTICLE 2

Goyette, G., Carruthers, N., Jutras, I., Boulais, J., Duclos, S., Laplante, A., Landry C.R., Thibault, P., Michnick, S.W., Lajoie, G., Desjardins, M. (2009)
Molecular characterization of the spatio-temporal modulation of phagosome functions during phagolysosome biogenesis (en preparation)

Molecular characterization of the spatiotemporal modulation of phagosome functions during phagolysosome biogenesis

Guillaume Goyette¹, Nicholas J Carruthers², Isabelle Jutras¹, Jonathan Boulais¹, Sophie Duclos¹, Annie Laplante¹, Christian R Landry^{3,4}, Stephen W Michnick³, Pierre Thibault⁵, Gilles Lajoie⁴, and Michel Desjardins^{1**}

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

²Department of Biochemistry, University of Western Ontario, Siebens-Drake Research Institute, London, ON, N6A 5C1, Canada

³Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ centre ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

⁴Département de Biologie et Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, G1V 0A6, Canada

⁵Institute for Research in Immunology and Cancer, C.P. 6128, Succ centre ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

**Address correspondence to: Michel Desjardins, Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ centre ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

Abstract

The killing of microorganisms and the processing of peptides for presentation at the cell surface require specific conditions established in phagosomes during phagolysosome biogenesis. However, nascent phagosomes formed at the cell surface are unable to perform most of their functions related to innate and adaptive immunity. These are acquired through phagosome maturation, a process involving interaction with series of organelles, modulating the fine composition of phagosomes. In the present study, we use proteomics and lipidomics approaches, as well as a protein-fragment complementation assay in yeasts, to define novel protein-protein interactions and characterize the nature of the changes occurring at phagosomes as they mature into fully functional organelles. Our data indicate that the membrane of phagosomes is modified in complex ways by the acquisition and loss of sets of proteins and lipids, enabling the sequential establishment of specific functional properties. We were able to identify 124 different species of lipids and characterize their modulation on maturing phagosomes. Furthermore, we showed that several groups of proteins shuffle from and into membrane microdomains, supporting the concept that modulation of the functional properties of phagosomes during phagolysosome biogenesis occurs by a reorganization of the organelle through time and space.

Introduction

Phagocytosis, the mechanism by which large particles are internalized, leads to the formation of phagosomes, a specialized organelle in which the engulfed material is degraded^{1, 2}. In mammals, various cells including macrophages, neutrophils and dendritic cells display remarkable phagocytic activities, rapidly eliminating microorganisms, foreign inert particles, and apoptotic cells. The killing of microorganisms by professional phagocytes precludes the emergence of infectious diseases. This innate immune process is followed by the degradation of microbes in a highly concentrated mixture of hydrolases, activated by the acidic pH generated in the phagosome lumen, generating antigenic peptides displayed at the cell surface, hence enabling their recognition by T lymphocytes³. The peptides not loaded on MHC molecules are further degraded in phagolysosomes, the end products likely recycled from phagosomes by transporters whose identity is largely unknown¹. The establishment of these functional properties involves a complex reorganization of phagosomes through time, referred to as phagolysosome biogenesis^{4, 5}. This highly regulated process involves the fusion of nascent phagosomes with *trans* Golgi-derived vesicles, early endosomes, late endosomes and ultimately lysosomes^{1, 2}. These fusion events profoundly alter the proteome of phagosomes during phagolysosome biogenesis⁶ and hence regulate the functional properties of phagosomes.

The capacity to kill and degrade microbes is only one of the many functions that phagosomes acquire during phagolysosome biogenesis. In a previous study, we identified more than 140 proteins associated with phagosomes⁷, leading to the description of novel phagosomal functions such as antigen cross-presentation⁸. This proteomics study also highlighted the presence on phagosomes of proteins known to segregate into lipid rafts at the cell surface, such as flotillin-1 and prohibitin, leading to the proposal that membrane microdomains might also assemble on phagosomes. Membrane microdomains are enriched in cholesterol and sphingolipids and are biochemically defined by their insolubility in non-ionic detergents. At the plasma membrane, these structures may constitute foci of specialized functions, notably for

signal transduction. Further biochemical and morphological analyses confirmed the presence of membrane microdomains on phagosomes⁹. Recent data indicated that two phagosomal protein complexes, V-ATPase and NADPH oxidase, may use membrane microdomains as assembly platforms¹⁰. The significance of membrane microdomains in phagosome functions was highlighted by the finding that at least two unrelated pathogens, the gram negative bacteria *Brucella* and the intracellular parasite *Leishmania donovani*, target lipid rafts as a strategy to evade the defence mechanisms of their hosts^{11, 12}. Altogether, these data indicate that the functional properties of the phagosome are regulated by a complex remodelling of its proteome both through time, during phagolysosome biogenesis, and space, through the spatial segregation of proteins into membrane microdomains. The molecular characterization of the spatiotemporal remodeling of phagosomes should provide unique insights into the mechanisms used by pathogens to alter the functional properties of this organelle.

In the present study we used quantitative proteomics and lipidomics approaches to characterize for the first time the spatiotemporal modifications of both proteins and lipids occurring during the biogenesis of an intracellular organelle. Our data indicate that segregation of sets of proteins in sub-regions of the phagosome membrane is an important aspect of phagolysosome biogenesis.

Materials and Methods

Cell Culture and Phagosome Isolation

The murine macrophage-like cell line J774 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 1% glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were grown to 80% confluence in Petri dishes prior to each experiment. To form phagosomes, J774 macrophages were fed with 0.8 µm blue dyed latex beads (Estapor® Microsphères) diluted 1:50 in culture medium without serum. Cells were allowed to internalize beads for 15 or 30 min at 37 °C. Cells were then washed two times for 5 min at room temperature with PBS to remove non-internalized beads, and were further incubated for increasing periods of time (0 min, 30 min, 240 min) to obtain early and late phagosomes. Phagosomes were then isolated on sucrose step gradients as described previously⁹. Purified phagosomes were resuspended in TNE buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA), transferred to an Eppendorf tube and frozen at -20°C. Samples were identified as 30/0, 30/30 or 30/240 phagosomes, referring to the 3 time-points (pulse/chase periods) analyzed. Phagosomes were also isolated at 15/0 for lipidomics analysis.

Isolation of phagosome microdomains

Isolated phagosomes (0.15 ml suspension of phagosomes purified from 1.4×10^8 cells) were equilibrated to 1% Triton X-100 on ice by adding an identical volume of TNE buffer containing 2% Triton X-100, and shaken gently 30 min at 4°C to solubilize phagosomal membranes. Latex beads were then pelleted twice by microcentrifugation (5 min at 15 000 rpm), and the final supernatant containing both the solubilized and the detergent-resistant phagosome components brought to a final concentration of 40% Optiprep™, by adding 0.6 ml of 60% Optiprep™ stock in TNE buffer. This was poured at the bottom of an Ultraclear centrifuge tube (Beckman). Finally, 3.0 ml of 30% Optiprep™ and 0.6 ml of TNE buffer were layered on top. After 4 h of centrifugation at 40 000 rpm (SW60 rotor), to float the insoluble membranes, 7 fractions of 0.6 ml were collected from the top. Proteins were then precipitated with

methanol/chloroform according to established protocols¹³ and resuspended in Laemmli buffer for Western blotting. To measure the lipid distribution in the raft gradient, 10ml of each fraction was collected prior to precipitation for slot-blotting.

Western and slot blotting

For Western blot analysis, an identical amount of phagosomes from each sample was used, based on the latex-bead concentration. 10 μ L of the purified phagosome sample resuspended in TNE buffer was diluted in 2 ml of distilled water, and the absorbance at 750 nm was measured in an Ultrospec™ 2100 pro spectrophotometer (GE Healthcare). The phagosome samples were adjusted to have the same absorbance by volume and then pelleted by microcentrifugation (5 min at 15 000 rpm). The protein concentration in the total cell lysate (TCL) and total membranes (TM) was evaluated using the EZQ assay ([Molecular Probes](#)) and identical amounts of protein were loaded for Western blot. The mouse anti-Flotillin-1 mAb and the mouse anti-Nicastrin IgG2a were from BD Bioscience, the rabbit anti-Rab5a polyclonal antibody was from Santa Cruz. The 1D4B rat anti-LAMP1 monoclonal antibody was from the Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa. NaK ATPase α mouse monoclonal IgG1 was from ABR Affinity BioReagents. RGS19 chicken polyclonal antibody and the Gp91phox was from ABCAM. Monoclonal antibody directed against the N-terminal peptide of human stomatin was a kind gift from Dr. R. Prohaska¹⁴. To detect the lipid ganglioside GM1, we used slot blotting with HRP-conjugated cholera toxin subunit B (CHTX-HRP) from Sigma.

Sample preparation for Protein Mass Spectrometry and Data Analysis

Two fractions of the Optiprep™ gradient (Fig.1B) were processed for protein identification by mass spectrometry. The proteins in fraction 1, which contained detergent resistant membranes (DRMs), and the proteins in fraction 7, which contained the bulk of solubilized phagosome membranes (or detergent soluble membranes; DSMs), were precipitated with methanol/chloroform, resuspended in Laemmli buffer and loaded on a NuPage 12% Bis-Tris pre-cast gel (Invitrogen) for a 3 cm migration. After a silver nitrate or a Coomassie blue staining, the resulting 3 cm gel was cut in

1mm bands irrespective of band positioning. Gel bands were subjected to reduction, alkylation and in-gel tryptic digestion by automation in a MassPrep Workstation (Micromass, Manchester, UK) as previously described¹⁵. The mass spectrometer was a QTOF Micro from Waters Micromass equipped with a Nanosource modified with a nanospray adapter (New Objective, Woburn, MA) to hold the PicoFrit column tip near the sampling cone. Mass spectrometric data were acquired by employing the Data Directed Analysis feature available on MassLynx (Micromass) operating software with a 1, 1, 4 duty cycle (1 second in MS mode 1 peptide selected for fragmentation, maximum of 4 seconds in MS/MS acquisition mode). A total of 6 experimental conditions were analysed, namely fraction 1 (DRM) and fraction 7 (DSM) of phagosomes isolated at 3 different time-points (30/0, 30/30 and 30/240). For each condition, samples generated from 3 independent experiments were analyzed in the mass spec (n=3).

MS/MS raw data were transferred from the QTOF Micro computer to a 50 terabyte server and automatically manipulated for generation of peak lists by employing Distiller version 1.1 (<http://www.matrixscience.com/distiller.html>) software with peak picking parameters set at 20 as for Signal Noise Ration (SNR) and at 0.7 for Correlation Threshold (CT). This reduced noise and produced a list of distinct peptide peaks in which all members of the isotopic clusters were collapsed into an equivalent monoisotopic peak. The peak listed data was then searched against a copy of the Universal Protein Resource (UniProt) (<http://www.pir.uniprot.org/>) data base by employing Mascot (<http://www.matrixscience.com>) version 1.9.03, and restricting the search to a maximum of 1 missed (trypsin) cleavage, fixed carbamidomethyl alkylation of cysteines, variable oxidation of methionine, ± 0.5 mass unit tolerance on parent and fragment ions. The search was limited to the *Mus musculus* taxonomy (51635 sequences; 21798332 residues). Mascot results for each sample (based on spectra assigned to tryptic peptide sequences at the 95% confidence level) generated peptide identifications were then linked to the proteins and sorted by protein to produce an initial list of protein identifications. However, this list was quite redundant since about 5% of the spectra match more than one peptide and 40% of the peptides

identified occur in more than one protein. Consequently, the protein lists were processed by a grouping algorithm¹⁶ to generate a list of proteins defined by distinct sets of proteins i.e. the minimum number of protein sequences needed to explain the peptides observed. The 1365 proteins of this preliminary list were then annotated manually using public databases to assign them the most accepted names (consensus); Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>), GeneCard (<http://www.genecards.org/>). By keeping only the proteins identified at least in 2 of the 3 repeat samples for a given condition, we came to a total of 921 proteins. These were further annotated with tools that predict transmembrane domains (TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), protein function (Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>), and Expasy (<http://us.expasy.org>) and literature search. Data mining of the final list was conducted in a MySQL database using Navicat 8 (<http://navicat.com/>) as graphical user interface.

Protein relative abundance was determined using a redundant peptide counting approach^{17,18}. The average value of the redundant peptide counts (RPC) from the three identification cycles was determined at each time-point in fractions 1 and 7. The average RPC values were used to generate heat maps representing the abundance of the identified proteins at the different time-points, either in the total phagosome (average of fraction 1 and fraction 7) or specifically in DRMs (average in fraction 1). Heat maps were generated with MatLab (Mathworks). Proteins were grouped into three temporal clusters according to the following parameters: proteins with average RPC values that decreased with time (decreased cluster), proteins with average RPC values that increased with time (increasing cluster), proteins with an average RPC value at the 30/30 time-point corresponding to more than 66% of the values at the 30/0 and the 30/240 time-points (transient cluster). The relative enrichment of proteins in DRMs was estimated as the ratio of the average RPC value in fraction 1 to the sum of the average RPC values in fractions 1 and 7. In order to test whether the peptide count profiles were reproducible within time-points and protein fractions (DSMs, DRMs), while being distinct among fractions, we examined the patterns of correlation of the peptide profiles (RPC across all proteins). We correlated the profiles of peptide counts

of all of the 18 different protein samples with each other (non-parametric Spearman correlation coefficient, ρ). The correlation coefficients (varying from 0 to 1) are represented as a heatmap (Figure 2B). This matrix was then clustered by the complete aggregation method for hierarchical clustering using distances derived from the correlation coefficient ($1 - \rho$). All these analyses were performed in R¹⁹.

Protein-protein interaction networks

To highlight potential protein-protein interactions, the 921 phagosomal proteins were submitted to STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins <http://string.embl.de>) version 8, using the mouse database (Jensen et al. 2009). The STRING analysis generated a network of 726 proteins involved in 3293 interactions with a minimal confidence score of 0.400. We also considered protein-protein interactions data from a recent experiment on the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We previously established a genome-wide map of the yeast protein interaction using a Protein-fragment complementation assay (PCA), with proteins endogenously tagged²⁰. We therefore examined whether the mouse proteins identified as being associated with the phagosome in this study had yeast orthologs that have been shown to interact by PCA. Using yeast-to-mouse orthologies obtained from Ensemble (<http://www.ensembl.org/>), we found interactions among yeast proteins orthologous to the set of phagosome proteins identified by MS. These data were used to generate a protein-protein interaction network map with Cytoscape 2.6.0²¹.

Lipid extraction

Total lipids were extracted from purified phagosomes or post nuclear supernatant (PNS). PNS were extracted after scraping 5 Petri dishes of J774 macrophages grown to 80% confluence, followed by 3 washes in 4°C PBS and one wash in 1 mL HB (8.55% W/W sucrose, 1% imidazole, pH 7.4) and finally resuspended in 1 mL HB. Cells were then disrupted in a Potter-Elvehjem homogenizer and centrifuged 5 min @ 2000 rpm. The 1 mL upper phase, which constitutes the PNS was finally collected, washed once with PBS and subjected to chloroform/methanol extraction as described below.

The phagosome samples were adjusted to have the same absorbance by volume as explained above and then pelleted by microcentrifugation (5 min at 15 000 rpm). Phagosomes were resuspended in 50 μ l PBS and internal standards were added in proportion to the phagosome absorbance. Specifically, 1 nmol of phosphatidyl glycerol (14:0/14:0), 10 nmol of phosphatidyl choline (14:0/14:0), 5 nmol of phosphatidyl ethanolamine (17:0/17:0) and 10 nmol of reserpine were added per 200 absorbance units. Lipids were extracted using a variant of the Bligh and Dyer method²². 300 μ l of chloroform/methanol (1:2, vol/vol) was added to the resuspended phagosomes along with 30 μ l of water for 380 μ l of chloroform/methanol/aqueous at a ratio 1:2:0.8. The phagosomes were sonicated on ice for 30 minutes with occasional vortexing. The latex beads were removed by centrifugation at 5000 RCF for 5 min, and the supernatant was taken for analysis. 125 μ l of chloroform followed by 125 μ l of water were added, followed by vortexing and centrifugation at 5000 RCF for 5 min to induce bilayer formation. The lower fraction was taken, dried by speed-vac and resuspended in 100 μ l of chloroform/methanol/water 7:2:1 (vol/vol), and stored at -80°C.

FTMS analysis of Lipids

Phagosome lipid extracts were analyzed by direct infusion nano-electrospray ionization into a QFT 12T Fourier Transform mass spectrometer (FTMS; Varian Inc, Palo Alto, CA). Lipid extracts were diluted 1:10 in chloroform/methanol/water (7:2:1) containing 0.1% formic acid for analysis of cationic phospholipids and sphingomyelin or 0.1% ammonium hydroxide for anionic phospholipids. Each sample was sprayed into the mass spectrometer for 5 minutes at a flow rate of 0.5 μ l/min. The triple quadrupole was set to RF only mode to pass all ions into the trapping hexapole, which accumulated ions for 1-2 seconds before passing them into the FTMS cell. The instrument parameters were set so that the resolution of all ions of interest exceeded 300K. At this resolution, isotope peaks do not interfere with neighboring lipid species. Using Omega FTdoc software (Varian), each transient was converted to a mass spectrum using a Blackman window and one zero fill, and then calibrated internally on reserpine and phosphatidyl inositol (38:4) in negative ion mode and on phosphatidyl

choline (30:3) and phosphatidyl choline (36:4) in positive ion mode. Spectra were then summed for each sample using a m/z tolerance of 5 ppm. Peak detection was done automatically in the FTdoc software, and a list of masses and intensities was exported to a text file for analysis.

Lipid Quantification

Mass/intensity tables were imported into R¹⁹ where they were compared against a lipid library with a tolerance of 0.5 ppm. The lipid library was generated by searching the lipid MAPS consortium's online databases (<http://www.lipidmaps.org>) against mass spectra from representative phagosome samples. These were converted to a table containing the elemental composition, m/z value and lipid class for each lipid species identified. The intensities for each lipid species were normalized to the total ion intensity for their sample with the internal standards removed. There was no significant change in the ratio of overall signal intensity to the intensity of internal standards across different phagosome maturities. The median coefficient of variation for the intensity of lipid species that were found in all samples was 15%.

Results

Proteomics and lipidomics approaches were used to carry out a large-scale characterization of the spatio-temporal modifications occurring to phagosome proteins and lipids during phagolysosome biogenesis. We analyzed phagosomes at three different steps of maturation including early phagosomes (30 min of latex bead internalization), maturing phagosomes (30 min pulse of bead and 30 min chase), and phagolysosomes (30 min pulse and 240 min of chase). Western blot analyses were performed to assess the maturation of phagosomes within the three time points chosen for our study (Fig. 1A). As expected, the late endosomal/lysosomal markers LAMP1 and Flotillin-1 both increased during phagosome maturation⁹, while the cell surface marker Na,K-ATPase α subunit and the NADPH oxidase gp91phox subunit both decreased with time²³. The proteins present in distinct phagosomal membrane microdomains were separated into a Triton X-100-soluble fraction and a Triton X-100-resistant membrane fraction for each time point. This procedure led to the flotation of detergent resistant membranes (DRMs) in fractions 1 and 2 (see Fig. 1B), as assessed by the enrichment of Flotillin-1 and the ganglioside GM1 (Fig.1C). In contrast, Rab5a and Lamp1, two abundant proteins of phagosomes, were not enriched in these fractions and remained with the bulk of detergent soluble membranes (DSMs) at the bottom of the gradient in fraction 6 and 7 (Fig.1C).

To identify proteins associated with DRMs, the first fraction of the OptiprepTM gradient was analyzed by mass spectrometry, while fraction 7 was used to identify proteins associated with DSMs. To be included in the list, a protein had to be identified in at least 2 of the 3 repeat samples for a given condition (for example 2 out of 3 in the early phagosome DRMs). This approach ensured the selection of highly representative proteins for each sample. Thus, a total of 921 proteins were identified by LC-MS/MS in a Q-TOF (Suppl. Table 1). Of these, 352 proteins were found in DRMs at some point during phagosome maturation (Suppl. Table 2). Grouping of proteins based on their identification in the different phagosome preparations indicated that a majority of proteins are present in all time points studied, limiting the possibility

to highlight changes occurring during phagosome maturation (Fig. 2A). However, measurement of the relative abundance of each phagosomal protein allowed us to determine at which time point and in what part of the membrane any protein reached its maximum abundance level during phagolysosome biogenesis. To measure the relative abundance of proteins, we favored a redundant peptide counting approach¹⁷ used previously to assess maturation events along the biosynthetic pathway¹⁸. This approach is well suited to compare a high number of conditions and/or samples in a high dynamic range²⁴. Redundant peptide counting compares the number of tryptic peptides detected in the mass spectrometer for any given protein in all of the samples. Thus, the presence of a protein in a given sample can be coupled with a value of its relative abundance and compared to the other samples. A correlation matrix (Fig. 2B) and a hierarchical clustering analysis of the 18 samples (Fig 2C) were used to assess the efficiency of the redundant peptide counting approach. The latter analysis, which groups samples according to their level of similarity, led to the efficient clustering of the phagosome preparations according to their time point and their position in the membrane (DRMs vs DSMs), highlighting the reproducibility and specificity of each group of samples. Furthermore, the validity of the peptide counting approach was highlighted by the fact that several known early and late markers of phagosome maturation were more abundant in the early or late phagosome time point respectively. For example, we observed increasing levels of lysosomal markers, such as LAMP1, LAMP2, LIMP2, Niemann Pick type C2, prosaposin, and Rab7, over time (Suppl. Table I). These markers are indeed expected to be recruited to phagosomes during phagolysosome biogenesis²⁵. Several established lipid rafts protein markers, such as Flotillin-1, Stomatin, the Src-family kinase Lyn, CD44, and heterotrimeric G proteins²⁶ were identified in fraction 1. Moreover Flotillin-1, Flotillin-2, and Stomatin were predominantly identified at the 30/240 time-point, in agreement with previous results showing that the recruitment of Flotillin-1 to phagosomes occurs late during the maturation process, when measured by both Western blotting and immunofluorescence microscopy⁹.

The relative abundance values obtained with the spectral count analyses allowed us to generate "heat maps" highlighting three distinct temporal behaviours (Fig. 3). Proteins showing their peak of abundance at the 30/0, the 30/30, or the 30/240 time-point were respectively grouped in the decreasing, transient, or increasing clusters. When considering the entire phagosome proteome, proteins appeared to be distributed almost equally between the decreasing (33%), transient (38%), and increasing clusters (27%) (Fig. 3A). In contrast, the phagosomal proteins associated with DRMs displayed important variations between the different temporal clusters, as only 5% of the proteins present in DRMs were maximal at the 30/0 time-point, while 32% were maximal at the 30/30 time-point, and 61% were maximal at the 30/240 time-point (Fig. 3B). These data provide the first indication that DRMs are either recruited and/or formed on the phagosome membrane during maturation, pointing out that membrane microdomains may specifically regulate the functional properties acquired during phagosome maturation (Suppl. Fig. 1). Western-blot analysis of a representative set of proteins from different temporal and spatial clusters validated the results obtained by the proteomics analyses (Suppl. Fig. 2).

Our study provides the first large scale analysis of the dynamic modulation of an organelle proteome during its biogenesis through time and space. Fig. 4 shows the complex potential interaction map (STRING database) occurring between proteins grouped according to their peak of abundance during phagolysosome biogenesis and their distribution in specific microdomains of the phagosome membrane. This representation indicates that very few of the proteins present on early phagosomes are sequestered in DRMs (Fig. 4A). In contrast, a large number of proteins are present in DRMs on phagosomes isolated at later stages of maturation, clearly showing that the assembly of proteins in membrane microdomains is a key feature of the maturation process. We also considered protein-protein interactions data from a recent experiment on the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We established a genome-wide map of the yeast protein interaction using protein-fragment complementation assay (PCA), with proteins endogenously tagged²⁰. This study uncovered many interactions among proteins involved in autophagy and among vacuolar proteins. We therefore examined

whether the mouse proteins identified as being associated with phagosome had yeast orthologs that were part of the published interactome. Using mouse-to-yeast orthology obtained from Ensembl (23 November 2007), we looked for yeast orthologues of our 921 representative phagosomal proteins. Of the 483 yeast orthologs, 87 formed a network of 118 interactions according to the PCA database. Converting this network back to mouse proteins gave us 94 proteins involved in 160 hypothetical protein-protein interactions that we added on top of the STRING network using Cytoscape. These include, for example, interaction between the yeast vacuolar Ca²⁺ ATPase PMC1 and the vacuolar ATPase VMA13, which have as mouse orthologs ATP2B1 and ATP6V1H. Another example is the interaction between ARC40, a subunit of the ARP2/3 complex, and the β subunit of the capping protein (CP) CAP2, which are orthologous to the ARPC1B and CAPZB that are part of the ARP2/3 and Capping complex respectively. These interactions inferred by orthology with yeast proteins are represented with red edges in Fig. 4B. Annotation of the proteins present on DRMs, based on literature searches and data available in UniProt, provided valuable insights regarding the modulation of phagosome functional properties during phagolysosome biogenesis, and the significance of spatial modulation in this process. Key functional properties modulated by the assembly of proteins in membrane microdomains, including signal transduction, the movement of molecules through various transporters, and the sequestration of molecules involved in membrane fusion, are highlighted in Figure 4C. Altogether, these data allowed us to draw the first molecular model of phagosome maturation that considers the modulation of the phagosome proteome during phagolysosome biogenesis, and the dynamic spatial reorganization of the proteome through the grouping of selected proteins in organized membrane microdomains (Fig. 5 and Suppl. Fig 3). A possible link between the proteins present in DRMs and the alteration of phagosome functions by the intracellular parasite *Leishmania* is also presented in Supp. Fig. 4.

We extended the present study to lipidomics analyses in order to generate the first characterization of lipid changes occurring during the biogenesis of an organelle. In addition to the three time points analysed by proteomics, we added an earlier time

point to determine as closely as possible the original lipid composition of nascent phagosomes (15 min of latex bead internalization). After the extraction of lipids from purified phagosomes, we performed analyses in a Fourier Transform mass spectrometer in both positive and negative ion mode (Fig 6A). In negative mode, we were able to detect and quantify 4 different classes of phospholipids, namely phosphatidyl glycerol (PG), phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl inositol (PI) and phosphatidyl serine (PS). In the positive mode, we measured phosphatidyl choline (PC) and sphingomyelin (SM) content. Altogether, our study revealed 6 classes of phospholipids, each of them including a wide range of molecules with different fatty acid tail length and saturation levels, for a total of 124 phospholipid species. For comparison, we included analyses of whole macrophage extracts to measure the total lipid content of the cell. Overall, when classes of lipids were considered, minor differences were observed between the total lipids of macrophages and those present in the phagosome membrane (Fig. 6B). However, striking differences were observed when specific forms of lipids were compared (Fig. 6C). Indeed, the main species identified on phagosomes were not necessarily the most abundant in the cell. Notably, the most abundant PC species found on phagosomes (30:3) is the twelfth in importance in the macrophage extract. Some variations were also observed for PE.

Our results indicate that the lipid composition of phagosomes vary with time, most notably for PS, going from 25% of the total ion intensity on early phagosomes to 19% on mature phagolysosomes, PE, decreasing from 12% to 7%, and PG, that increased from 4% to 15% (Fig. 7A). Important variations were also observed when specific species of a given lipid were compared. For all species of PI and PS, a slight decrease was observed during maturation, with the exception of PI(34:1) and PS(35:0) that increased.

Discussion

The study of the biogenesis of membrane organelles is hampered by the difficulty to isolate these cellular structures at various stages of their formation. Phagosome are particularly well-suited for this type of study because these organelles are formed de novo after the internalization of large particulate materials at the cell surface. A method of choice has been to use latex particles to form phagosomes in a variety of cells, and take advantage of the low buoyant density of this material to isolate highly enriched preparations of phagosomes on sucrose gradients²⁷. Considering the key roles played by phagosomes in both innate and adaptive immunity²⁸, their thorough characterization is part of a strategy to gain unique insights into the molecular mechanisms regulating immune functions. The functional properties of phagosomes are acquired through a complex maturation process by which nascent phagosomes, formed at the cell surface, are transformed into phagolysosomes. Phagolysosome biogenesis has initially been described as a process occurring through time. Accordingly, different sets of proteins have been assigned to early or late phagosomes^{4, 5, 29}. More detailed analyses using proteomics led to the identification of a large group of proteins on phagosomes from different species and model organisms^{6, 7, 23, 30-34}, providing unique insights into the potential functions of this organelle. One of the early novel concepts derived from these studies was the fact that phagosomes display membrane microdomains where specific proteins assemble^{7, 9, 12}. This finding indicated that rather than being an organelle where lipids and proteins are randomly distributed, the phagosome membrane displays microdomains where specialized functions occur. Hence the regulation of phagosome functions during phagolysosome biogenesis occurs not only on a temporal basis, but also at a spatial level. The data presented here characterize, for the first time, the complex changes and reorganization of both phagosome proteins and lipids occurring through time and space during phagolysosome biogenesis.

Our data indicate that the phagosome proteome is extensively modified through time. Specific modifications of the phagosome composition during phagolysosome

biogenesis have been described in previous studies, highlighting, for example, the acquisition of proteins linked to the ability of phagosomes to kill and degrade microorganisms for antigen presentation^{25, 34, 35}. As expected, phagolysosome biogenesis is accompanied by the acquisition of various hydrolases. Our data indicate that cathepsin B, D, L and Z increased throughout phagolysosome maturation, while cathepsin C and S reached their maximal level in intermediate phagosomes, suggesting that these enzymes are transferred to phagosomes from different sources. The proton pump V-ATPase involved in the acidification of the phagosome lumen and the activation of hydrolases is also accumulating on maturing phagosomes. The eight subunits of the V1, as well as three of the four subunits of the V0, were shown to increase with time. V-ATPases may have an additional function during phagosome maturation. It has been proposed that the V0 domain plays a direct role in membrane fusion³⁶. The identification of *trans*-complexes between V0 domains in adjacent membranes showing the same dependence on inhibitors and activators as the fusion process itself led to the proposition that, after SNARE mediated docking, these *trans*complexes promote the mixing of the lipid bilayers by virtue of the highly hydrophobic proteolipid subunits³⁶. Furthermore, the role of the lipid environment as regulator of V-ATPase activity was addressed by Lafoucade and colleagues who concluded that the DRMs association increased the pump activity by promoting V1-V0 coupling³⁷. Their results also indicated that the V1/V0 ratio increased during endosome maturation. Our data indicate that the V1/V0 ratio also increases during phagosome maturation, as well as the enrichment of both complexes in lipid microdomains, suggesting that the pumping activity of the V-ATPase preferentially takes place in DRMs (Suppl. Table 4).

Contrary to our data showing that similar amounts of proteins reach their maximum level at the three time points of phagosome maturation that we studied, very few proteins are present in DRMs in early phagosomes. Instead, the relative amount of most of the proteins present in these structures either increase and then decrease, or continually increase during maturation. It is still poorly understood whether DRMs form *de novo* on phagosomes or are acquired already assembled through fusion events

with other organelles like endosomes and lysosomes. Our results showing that sets of proteins present at high levels in DRMs of phagolysosomes are initially observed in soluble parts of the membrane suggest that functional microdomains do assemble from within the membrane of phagosomes. This is the case for a group of SNARE proteins composed of Syntaxin 8, vti1b, vti1a, VAMP7 and VAMP4, and known to interact during membrane fusion³⁸⁻⁴⁰. All of these proteins reach a maximal level at 30/30 in DSMs but peak in DRMs at 30/240 (Suppl. Table 5). In some cases, interacting proteins present in DRMs (e.g. MCT1, Basigin (CD147), Sialophorin (CD43), Integrin β -2 (CD18), Integrin α -5 (CD49e), CD5, and CD9⁴¹⁻⁴⁴) were subsequently detected in soluble parts of the phagosome membrane, suggesting that modulation and/or termination of protein activity might also occur through spatial reorganization. Our study reveal that a large proportion of the phagosome proteins will shuffle between DSMs and DRMs at some point during phagolysosome biogenesis, suggesting that complex modulation of the phagosome functions occurs through spatial organization of its membrane components. This trend is observed for proteins involved in signalling such as the heterotrimeric G α subunit, 14-3-3 zeta, Lyn, and Unc-93B. Unc-93B, which interact with TLR-3, 7, and 9, is needed for TLRs signalling⁴⁵. These proteins were shown to first interact in the ER before being transferred to endocytic organelles where they play their nucleotide sensing functions⁴⁶. Our data indicate that TLR-7 and Unc-93B are recruited simultaneously to DRMs from DSMs during phagosome maturation, suggesting that their transfer from the ER occurs in a soluble region of the membrane.

In the case of VAMP7, this protein has been shown to regulate the fusion between late endosomes and lysosomes⁴⁷. Since phagosomes initially fuse with early endosomes, and then with late endosomes and lysosomes⁴⁸, VAMP7 is likely to be functional at a late point during phagosome maturation, when it is present within DRMs. Fusion of phagosomes with late endocytic organelles is inhibited by the intracellular parasite *Leishmania donovani*⁴⁹. Inhibition of this process, which requires the parasite surface molecule lipophosphoglycan (LPG), is one of the multiple deleterious effects of *Leishmania* on phagosome functions. LPG is also known to alter the generation of

oxygen superoxides, and the integrity of the actin network surrounding phagosomes⁵⁰. Interestingly, our data indicate that proteins involved in all of these functions, including the NADPH oxidase subunits p22phox and gp91phox, as well as protein involved in actin remodelling (e.g. actin, cofilin 1, profiling 1, formin-like 1, CapZ α -1, actinin- α 4) are present on DRMs at some points during phagosome maturation (see Fig. Suppl. 4). Hence, it is conceivable that *Leishmania* disrupts multiple functions at once by altering the integrity of membrane microdomains.

The nature of the phospholipid composition of phagosomes, as well as the changes occurring to lipids during phagolysosome biogenesis are poorly characterized²⁹. Our data indicate that the phagosome membrane displays a complex set of lipids, with more than 120 species identified. Two interesting observations can be highlighted from our results. First, the most abundant form of a given lipid in the cell is not necessarily the predominant species present on the phagosome membrane. For example, the major form of PC in the phagosome membrane (PC 30:3) is only the 12th most abundant in the cell. Considering that the plasma membrane (PM) and the endoplasmic reticulum (ER) constitute the large majority of the membrane present in eukaryotic cells, these data suggest that phagosomes are unlikely to be formed from a major contribution of a single organelle. Rather, multiple organelles including the PM, a variety of endocytic organelles, as well as the ER are likely to contribute membrane to some extents²⁸. Second, the ratio of the various lipids present on phagosomes vary considerably during phagolysosome biogenesis, indicating that the functional properties associated with this process are likely to be modulated by lipid molecules. The influence of the lipid environment on the molecular mechanisms regulating phagosome functions is a wide pan of the biology of this organelle that needs to be addressed in the future.

Figures

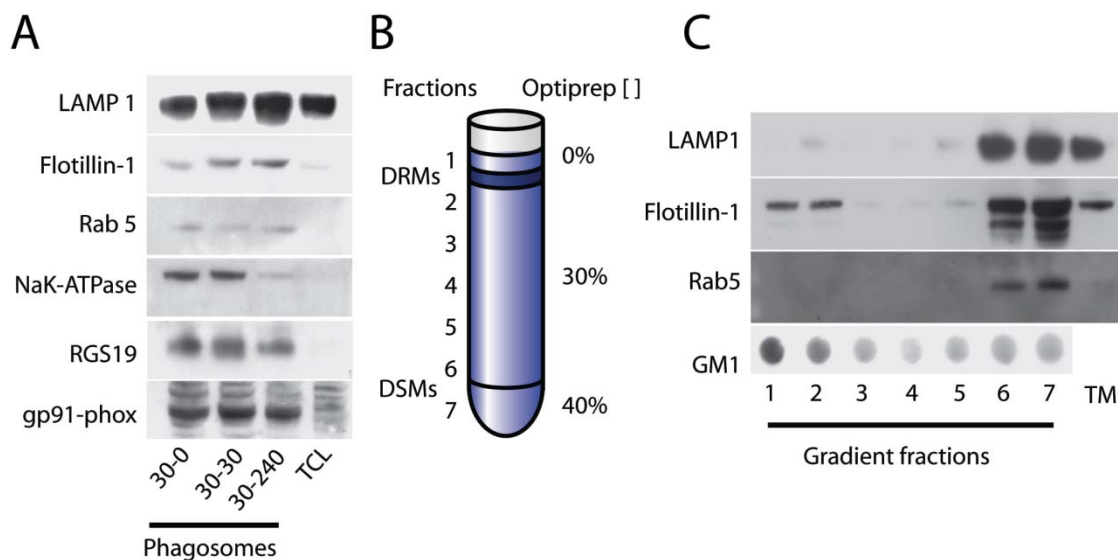


Figure 1. The phagosome proteome differ not only with maturation but also between different membrane subdomains

(A) J774 macrophages were fed latex beads for 30 min and chased for the indicated periods prior to phagosome isolation. Equivalent amounts of phagosomes from each time point were separated by SDS-PAGE. Western blotting was performed for the indicated proteins. LAMP1 and Flotillin-1 are protein markers that increase during phagolysosome biogenesis, while the α subunit of Na,K-ATPase and gp91phox are decreasing. (B) DRMs were extracted from purified phagosomes with 1% Triton X-100 and isolated on an OptiprepTM-step gradient. Seven fractions were collected from the gradient and the total proteins in each fraction were separated by SDS-PAGE, prior to Western blotting for the indicated proteins. (C) A similar amount of proteins from isolated total membranes (TM) was also loaded. An identical volume from each fraction was used for the slot-blotting of ganglioside GM1. Proteins associated with DRMs are enriched in fractions 1 and 2, as demonstrated by the enrichment in this fraction of Flotillin-1 and GM1, two established markers of DRMs. LAMP1 and Rab5a are not enriched in fraction 1. Representative blots are shown using DRMs from 30/240 phagosomes. Similar results were obtained with phagosomes from 30/0 and 30/30 time-points.

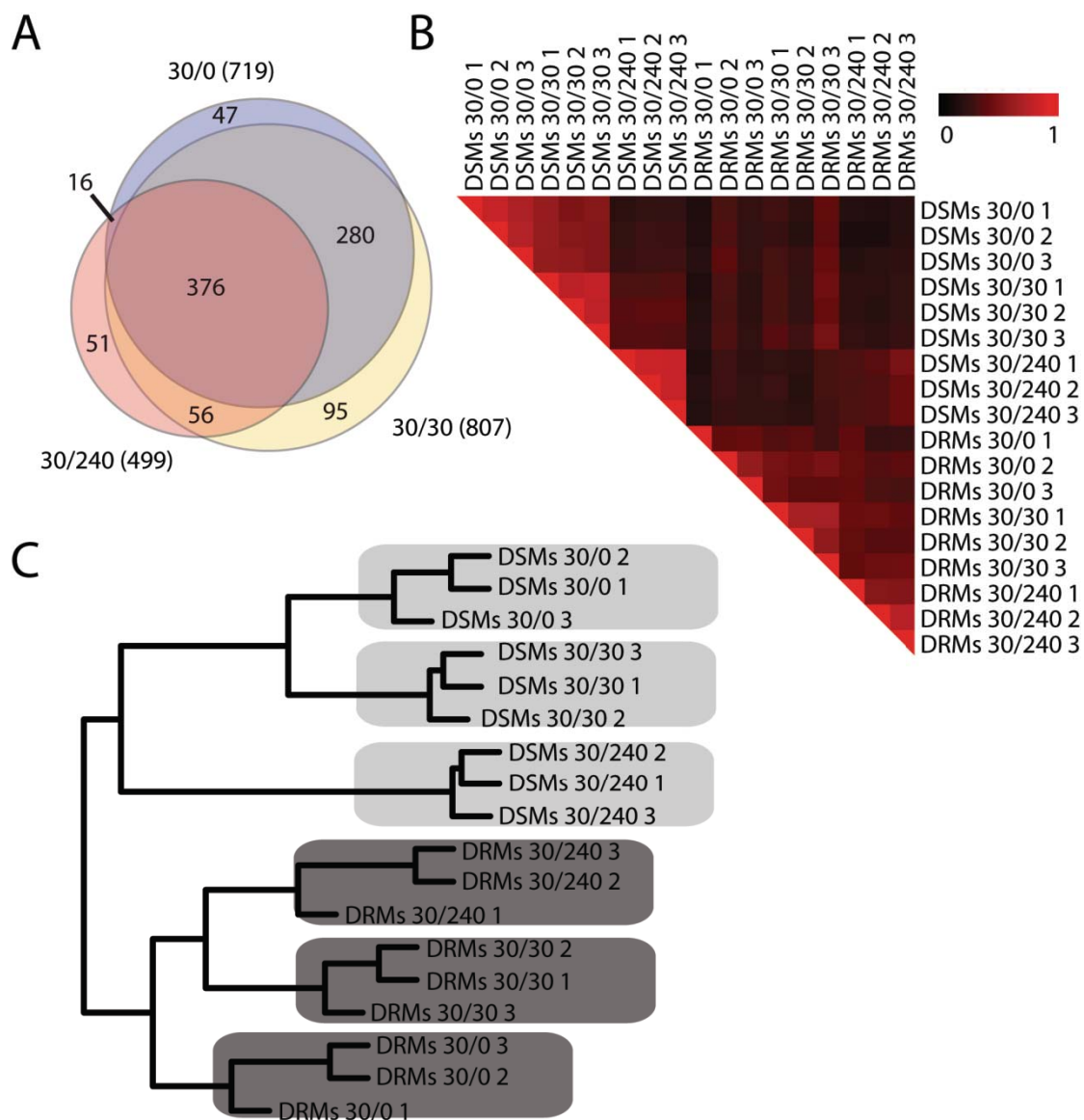


Figure 2. Validation of the peptide counting approach

A) An area-proportional Venn diagram shows the overall distribution of phagosome proteins in the tree time points studied. B) Correlation matrix of the protein abundance from the 18 different samples. Each entry of the matrix represents the Spearman correlation coefficient between the vectors of protein abundances from two samples. As for the PCA analysis (data not shown), replicates of the same conditions are more similar to each other than there are to other samples. Also, DRMs and DSMs samples represent the largest contrast. C) Hierarchical clustering analysis confirms that replicate samples have the most similar protein abundance profiles, followed by time-

points and DRMs and DSMs samples. The proteomic profiles of the raft and non-raft samples at different time points are distinct and reproducible. In both B and C, protein abundance was estimated from peptide counts from the MS/MS analyses.

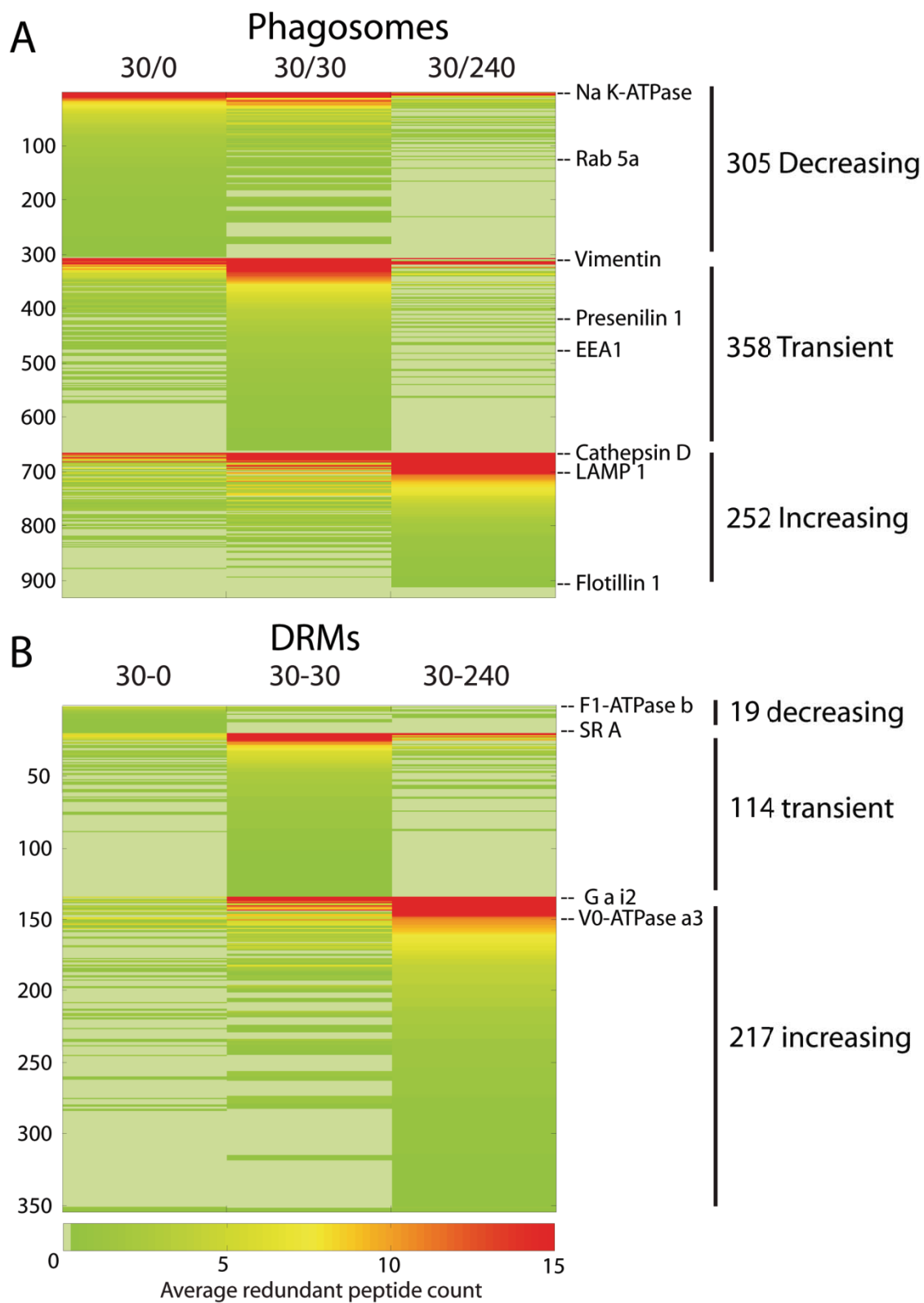


Figure 3. Spatio-temporal profiling of phagosome proteins.

(A) Heat map representing the abundance of the 931 proteins identified in phagosomes (y-axis) at the 3 time-points analyzed (30/0, 30/30, 30/240). Protein abundances correspond to the average RPC values in fractions 1 and 7, of the 3 separate identification cycles performed per time-point. Increasing average RPC values are represented in a gradual color scale from green (low protein abundance) to yellow to red (high protein abundance). The identified proteins were grouped in 3 temporal clusters: 305 proteins displayed decreasing average RPC values (decreased cluster), 358 proteins displayed a transient increase of their average RPC value at the 30/30 time-point (up-and-down cluster), and 252 proteins displayed increasing average RPC values (increased cluster). The localization of 6 maturation markers is shown (Rab5a is decreasing, Presenilin and EEA1 are transiently increasing, Cathepsin D, LAMP 1 and Flotillin-1 are increasing). (B) Heat map representing the abundance of the 354 proteins identified in DRMs at the 3 time-points analyzed (30/0, 30/30, 30/240) as in (A). Protein abundances correspond to the average RPC values in fraction 1, of the 3 separate identification cycles performed per time-point. 19 proteins were grouped in the decreased cluster, 114 were grouped in the up-and-down cluster, 217 proteins were grouped in the increased cluster.

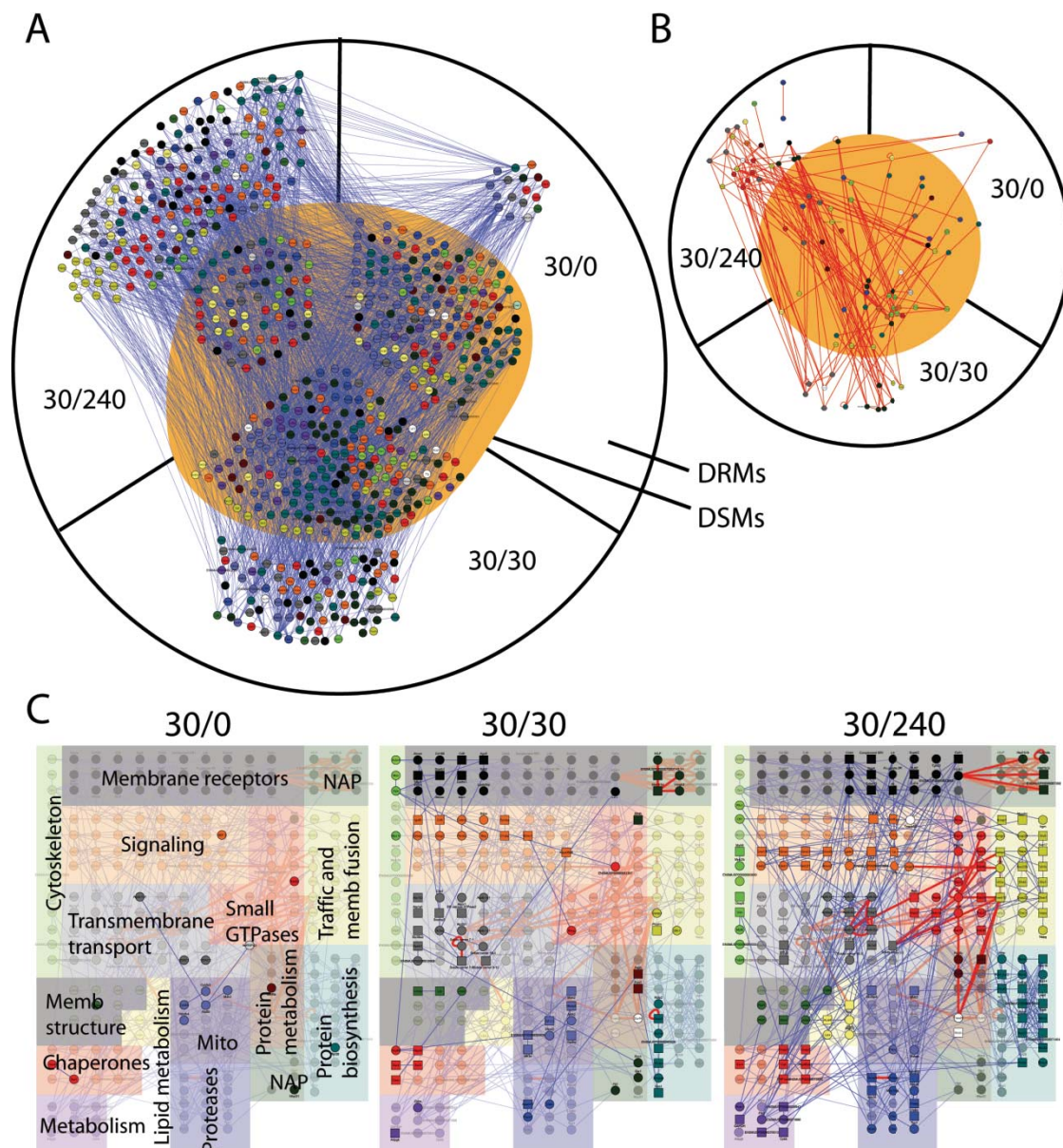


Figure 4. Dynamics of the lipid-raft interactome during phagosome maturation.

(A) A network of high-confidence predicted protein-protein interactions between 726 proteins identified on the phagosome at the three different time-points examined was generated using the STRING database (blue edges). (B) New potential interactions discovered for 94 phagosomal proteins after a protein-fragment complementation assay (PCA) on the yeast *S. cerevisiae* (red edges). For A and B, the proteins are drawn only in the time point where they reach their maximum expression. The proteins located in the yellow central core are the one identified only in the DSMs

fraction of the phagosome. The proteins were clustered in functional sub-groups, represented by dots of different colors (light green; cytoskeleton, black; membrane receptors, green; nucleus-associated proteins [NAP], orange; signaling, red; small GTPases, yellow-green; trafficking and membrane fusion, grey; transmembrane transport, brown; protein metabolism, turquoise; protein biosynthesis, dark green; membrane structure, yellow; lipid metabolism, blue; proteases, purple; metabolism, white; unknown.

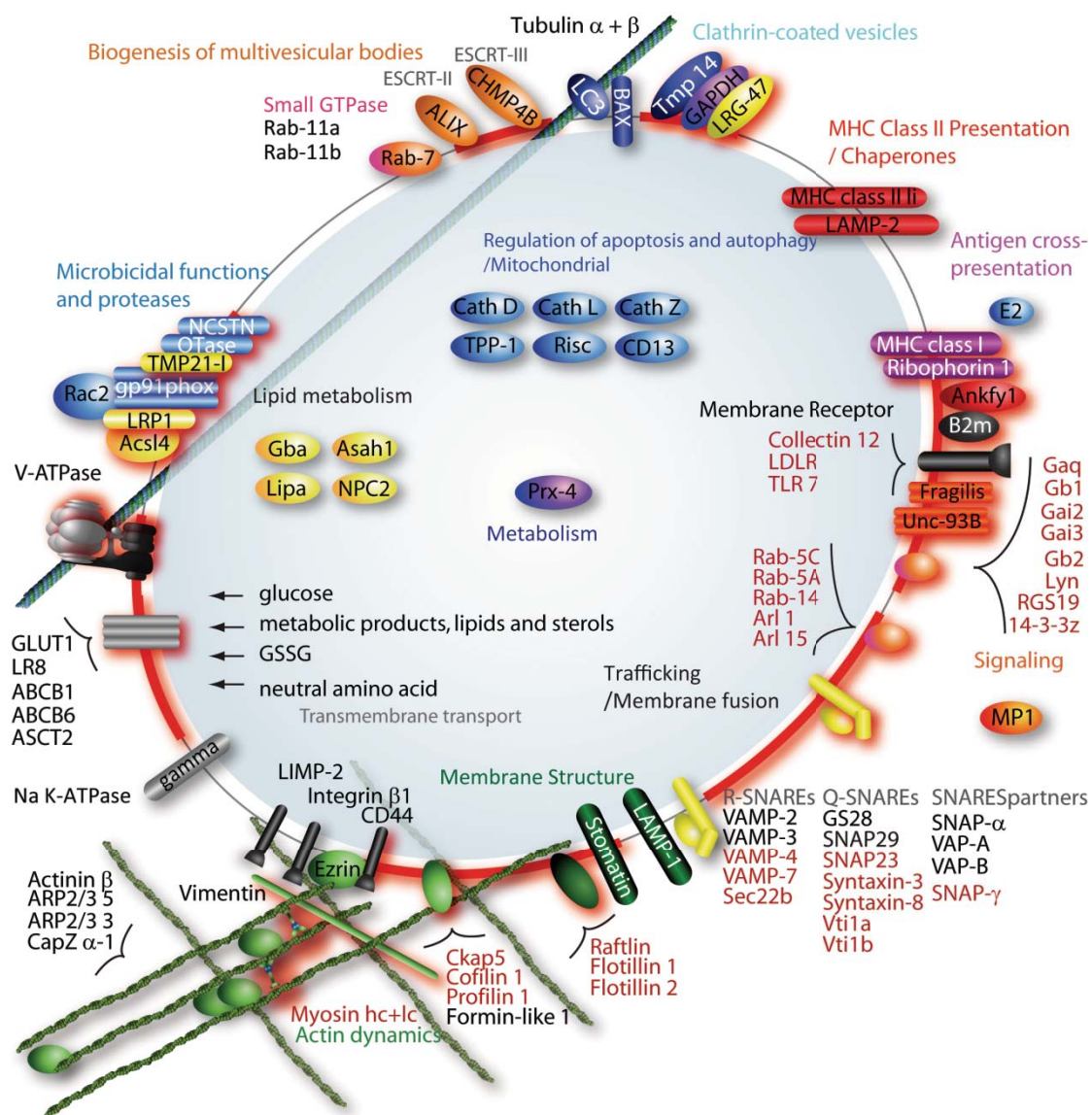


Figure 5. Virtual phagosome.

Model of the phagosome after a maturation of 240 min. The proteins which were identified with maximal intensity in the late phagosome are presented in this model. The big blue circle represents the phagosome lumen, surrounded by the phagosomal membrane which is constituted of DSMs (black thin line) and DRMs (red thick line). DRMs association of the proteins is illustrated by a red shadow or the use of a red font for its name. The proteins are grouped by functional groups, distinguishable by a color code (orange ; biogenesis of multivesicular bodies, pink ; small GTPases, green ;

membrane structure, dark blue ; clathrin-coated vesicles, blue ; regulation of apoptosis, autophagy and mitochondrial, light blue ; microbicidal functions and proteases, red ;MHC Class II Presentation and chaperones, purple ; antigen cross presentation, black ; membrane receptors, orange-red ; signaling, yellow ; trafficking and membrane fusion, light green ; actin dynamics, gray ; transmembrane transport) ABC transporter: ATP-binding cassette transporter; GLUT1: Glucose transporter type 1 ;LRP1: Lipoprotein receptor-related protein; TLR7: Toll-like receptor 7.

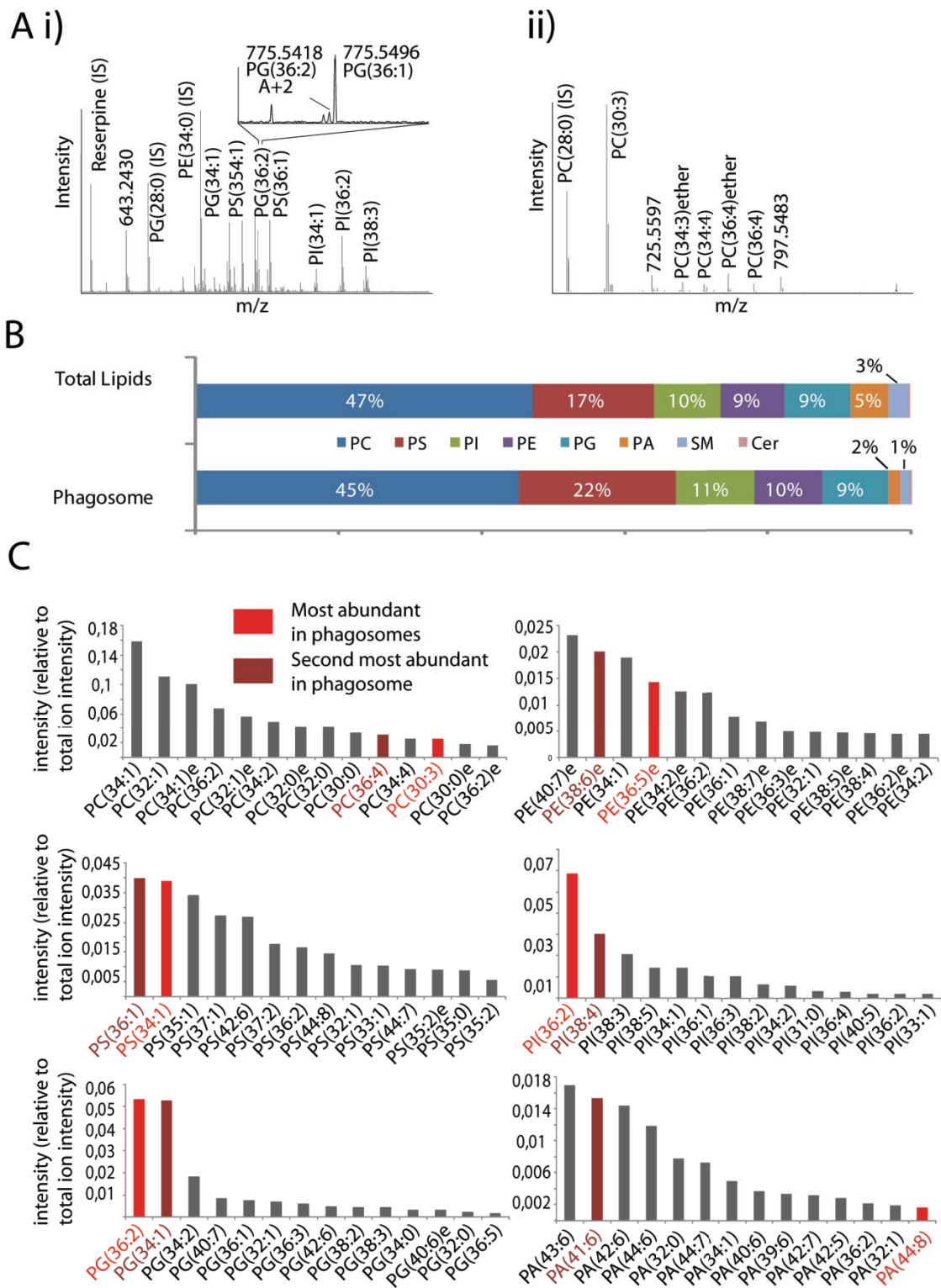


Figure 6. Lipidomics analysis of the total cell lipids (TCL).

(A) MS spectra generated by the negative (i) or positive (ii) ionisation mode. (B) Comparison of the relative phospholipid quantitation by class between TCL and phagosome average; Phosphatidyl Choline (PC), Phosphatidyl Ethanolamine (PE), Phosphatidyl Serine (PS), Phosphatidyl Inositol (PI), Phosphatidyl Glycerol (PG), Phosphatidic acid (PA) and Sphingomyelin (SM). (C) Absolute phospholipid quantitation for the 14 most abundant species of each phospholipid class for TCL. Red and brown bars represent most and second most abundant species in the phagosome membranes.

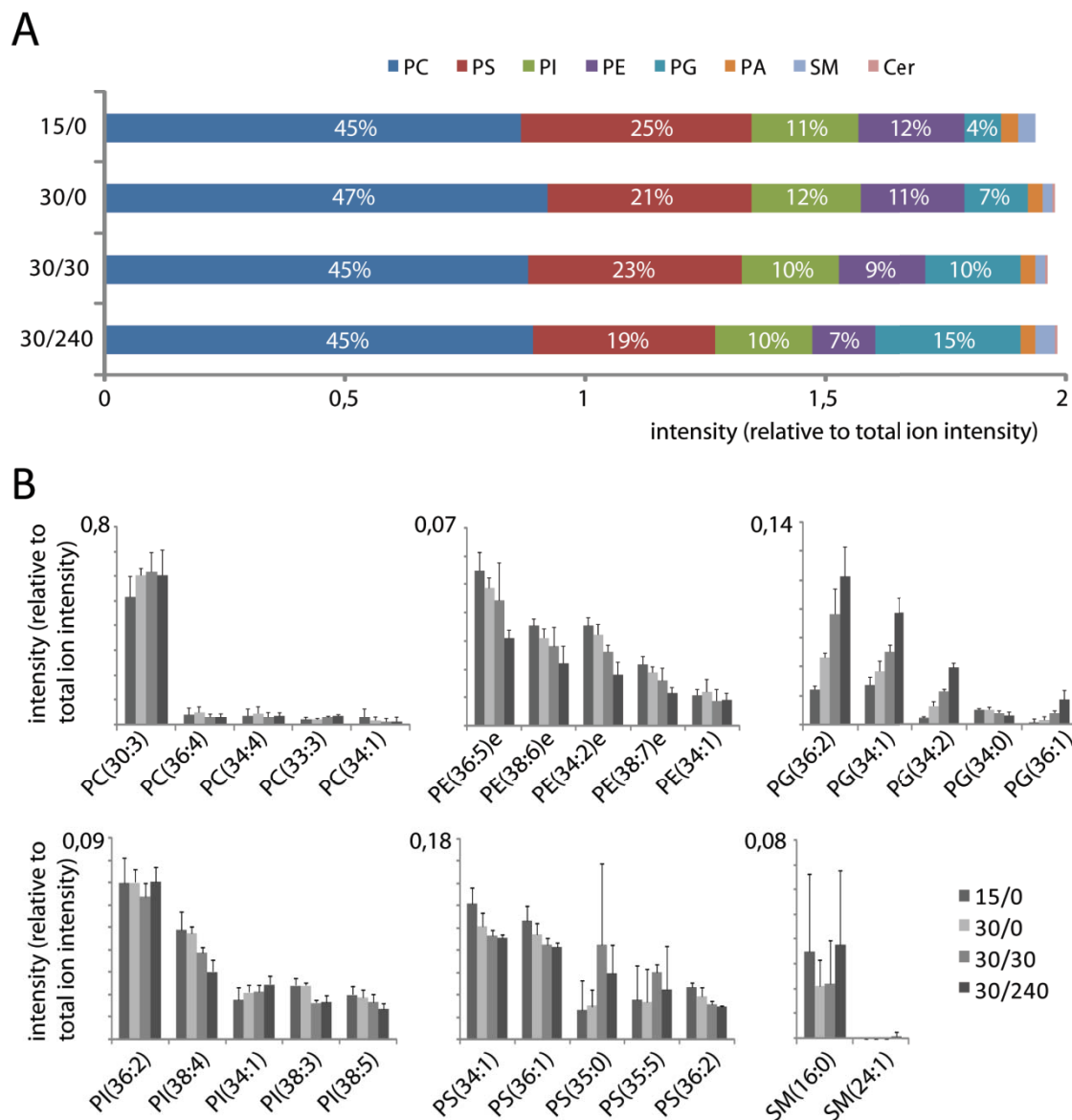


Figure 7. Lipidomics analysis of the phagosome maturation.

(A) Relative phospholipid quantitation by classes for 15/0, 30/0, 30/30 and 30/240 phagosomes (B) Intensities for the 5 most abundant species of Phosphatidyl Choline (PC), Phosphatidyl Ethanolamine (PE), Phosphatidyl Serine (PS), Phosphatidyl Inositol (PI) and Phosphatidyl Glycerol (PG) during phagosome maturation.

References

1. Haas, A. The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**, 311-330 (2007).
2. Jutras, I. *et al.* Gamma-secretase is a functional component of phagosomes. *J Biol Chem* **280**, 36310-36317 (2005).
3. Vyas, J.M., Van der Veen, A.G. & Ploegh, H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* **8**, 607-618 (2008).
4. Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. & Griffiths, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* **124**, 677-688 (1994).
5. Pitt, A., Mayorga, L.S., Stahl, P.D. & Schwartz, A.L. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest* **90**, 1978-1983 (1992).
6. Gotthardt, D. *et al.* Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics* **5**, 2228-2243 (2006).
7. Garin, J. *et al.* The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**, 165-180 (2001).
8. Houde, M. *et al.* Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-406 (2003).
9. Dermine, J.F. *et al.* Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* **276**, 18507-18512 (2001).
10. Vilhardt, F. & van Deurs, B. The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *EMBO J* **23**, 739-748 (2004).
11. Arellano-Reynoso, B. *et al.* Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**, 618-625 (2005).
12. Dermine, J.F., Goyette, G., Houde, M., Turco, S.J. & Desjardins, M. Leishmania donovani lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol* **7**, 1263-1270 (2005).

13. Wessel, D. & Flugge, U.I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry* **138**, 141-143 (1984).
14. Hiebl-Dirschmied, C.M., Adolf, G.R. & Prohaska, R. Isolation and partial characterization of the human erythrocyte band 7 integral membrane protein. *Biochim Biophys Acta* **1065**, 195-202 (1991).
15. Wasiak, S. *et al.* Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J Cell Biol* **158**, 855-862 (2002).
16. Kearney, R. *et al.* Elimination of redundant protein identifications in high throughput proteomics. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **5**, 4803-4806 (2005).
17. Blondeau, F. *et al.* Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3833-3838 (2004).
18. Gilchrist, A. *et al.* Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* **127**, 1265-1281 (2006).
19. R-Team, R.D.C. (ed. R.F.f.S. Computing) Vienna, Austria; 2009).
20. Tarassov, K. *et al.* An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* **320**, 1465-1470 (2008).
21. Cline, M.S. *et al.* Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* **2**, 2366-2382 (2007).
22. Bligh, E.G. & Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917 (1959).
23. Jutras, I. *et al.* Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics* **7**, 697-715 (2008).
24. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* **389**, 1017-1031 (2007).
25. Kinchen, J.M. & Ravichandran, K.S. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 781-795 (2008).
26. Pike, L.J. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* (2008).

27. Desjardins, M. & Griffiths, G. Phagocytosis: latex leads the way. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 498-503 (2003).
28. Jutras, I. & Desjardins, M. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 511-527 (2005).
29. Desjardins, M. *et al.* Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* **269**, 32194-32200 (1994).
30. Burlak, C., Whitney, A.R., Mead, D.J., Hackstadt, T. & Deleo, F.R. Maturation of human neutrophil phagosomes includes incorporation of molecular chaperones and endoplasmic reticulum quality control machinery. *Mol Cell Proteomics* **5**, 620-634 (2006).
31. Okada, M. *et al.* Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* **4**, 827-831 (2005).
32. Rogers, L.D. & Foster, L.J. The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18520-18525 (2007).
33. Stuart, L.M. *et al.* A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature* **445**, 95-101 (2007).
34. Trost, M. *et al.* The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* **30**, 143-154 (2009).
35. Ramachandra, L., Simmons, D. & Harding, C.V. MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Curr Opin Immunol* (2009).
36. Peters, C. *et al.* Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* **409**, 581-588 (2001).
37. Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J. & van der Goot, F.G. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS ONE* **3**, e2758 (2008).
38. Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. & Schneider, T.R. Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol* **9**, 107-111 (2002).

39. Flowerdew, S.E. & Burgoyne, R.D. A VAMP7/Vti1a SNARE complex distinguishes a non-conventional traffic route to the cell surface used by KChIP1 and Kv4 potassium channels. *Biochem J* **418**, 529-540 (2009).
40. Mallard, F. *et al.* Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* **156**, 653-664 (2002).
41. Kleene, R. *et al.* Prion protein regulates glutamate-dependent lactate transport of astrocytes. *J Neurosci* **27**, 12331-12340 (2007).
42. Khunkaewla, P. *et al.* LFA-1-mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of CD43 with LFA-1 and CD147. *Mol Immunol* **45**, 1703-1711 (2008).
43. Kishimoto, H. & Sprent, J. Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. *J Exp Med* **190**, 65-73 (1999).
44. Toyooka, K. *et al.* Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *Int Immunol* **11**, 2043-2052 (1999).
45. Brinkmann, M.M. *et al.* The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* **177**, 265-275 (2007).
46. Nishiya, T. & DeFranco, A.L. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**, 19008-19017 (2004).
47. Pryor, P.R. *et al.* Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep* **5**, 590-595 (2004).
48. Desjardins, M., Nzala, N.N., Corsini, R. & Rondeau, C. Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* **110** (Pt **18**), 2303-2314 (1997).
49. Desjardins, M. & Descoteaux, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185**, 2061-2068 (1997).
50. Lodge, R. & Descoteaux, A. Leishmania invasion and phagosome biogenesis. *Subcell Biochem* **47**, 174-181 (2008).

51. Stow, J.L., Manderson, A.P. & Murray, R.Z. SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* **6**, 919-929 (2006).
52. Kanehisa, L. in The KEGG PATHWAY database(2009).
53. Hay, J.C., Chao, D.S., Kuo, C.S. & Scheller, R.H. Protein interactions regulating vesicle transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in mammalian cells. *Cell* **89**, 149-158 (1997).
54. Bao, Y., Lopez, J.A., James, D.E. & Hunziker, W. Snapin interacts with the Exo70 subunit of the exocyst and modulates GLUT4 trafficking. *J Biol Chem* **283**, 324-331 (2008).
55. Steegmaier, M. *et al.* Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *J Biol Chem* **273**, 34171-34179 (1998).
56. Su, Q., Mochida, S., Tian, J.H., Mehta, R. & Sheng, Z.H. SNAP-29: a general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14038-14043 (2001).
57. Tsui, M.M. & Banfield, D.K. Yeast Golgi SNARE interactions are promiscuous. *J Cell Sci* **113 (Pt 1)**, 145-152 (2000).
58. Dilcher, M., Kohler, B. & von Mollard, G.F. Genetic interactions with the yeast Q-SNARE VTI1 reveal novel functions for the R-SNARE YKT6. *J Biol Chem* **276**, 34537-34544 (2001).
59. Wickner, W. & Schekman, R. Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 658-664 (2008).
60. Tani, K. *et al.* Mapping of functional domains of gamma-SNAP. *J Biol Chem* **278**, 13531-13538 (2003).

CHAPITRE V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Discussion générale

Hétérogénéité des radeaux membranaires du phagosome

Notre équipe avait déjà démontré la présence de microdomaines enrichis sur les phagosomes (Dermine et al., 2001). Ces microdomaines se distinguent du reste de la membrane du phagosome, car ils contiennent seulement certaines protéines spécifiques comme la flotilline-1, à l'instar des radeaux membranaires décrits par Simons et Ikonen (Simons and Ikonen, 1997). Étant donné que ces microdomaines présentent les mêmes caractéristiques que les radeaux lipidiques, c'est-à-dire : i) ils sont distribués en motifs ponctués sur la membrane lorsqu'observés en microscopie confocale; ii) ils peuvent être purifiés biochimiquement grâce à leur insolubilité au TX-100 à 4°C; et iii) ils contiennent une des protéines les plus caractéristiques des radeaux membranaires (flotilline-1), nous avons vérifié qu'ils étaient aussi enrichis en GM1. Le marquage par la sous-unité B de la toxine du choléra liée à un fluorophore (CTB-FITC) nous a permis de constater que le GM1 s'accumule lui aussi en motifs ponctués sur le phagosome. Provenant de la membrane plasmique, le GM1 est livré tôt au phagosome par les endosomes précoces, contrairement à flotilline-1 qui arrive plus tard et d'une source externe (Dermine et al., 2001). Une autre disparité entre ces deux marqueurs de radeaux membranaires est qu'ils ne colocalisent pas sur le phagosome, ce qui laisse supposer la présence de plusieurs types de radeaux lipidiques sur le phagosome (chapitre III, figure 1D-E). Ce n'est pas la première mention d'une telle hétérogénéité des radeaux membranaires (Pike, 2004).

Le LPG empêche le recrutement des radeaux membranaires sur le phagosome

Lorsque *L. donovani* est phagocytée, le phagosome qui la contient est incapable d'acquérir le GM1, tout comme il a déjà été démontré pour flotilline-1 (Dermine et al., 2001). Le mutant *lpg2*^{-/-}, ayant un défaut dans l'assemblage des chaînes contenant du

mannose, ne peut pas accomplir cet effet. Celui-ci est donc attribuable aux molécules de polysaccharides de surface du parasite. Puisque l'arrivée des marqueurs de radeaux est inhibée à un niveau très similaire chez le mutant *lpg1*^{-/-}, où seule la molécule LPG est manquante, nous déduisons que LPG est essentiel à cette action de *L. donovani*. Nous avons renforcé cette conclusion en démontrant que le LPG opsonisé sur le parasite mutant (*lpg1*⁻ ou *lpg2*⁻) permet de récupérer l'inhibition du recrutement des radeaux sur le phagosome. Fait intéressant, cette approche avec le parasite mutant opsonisé nous a permis de vérifier l'hypothèse voulant que la longueur de la molécule LPG soit proportionnelle à son effet sur le phagosome. Cette action de LPG sur les membranes du phagosome est très localisée puisque dans la situation où cette molécule est absente sur une partie du phagosome, le GM1 peut y être recruté.

Le LPG désorganise les radeaux lipidiques préexistants

Nous avons aussi montré que la livraison de LPG dans des phagosomes déjà formés et marqués par GM1 permet de déstabiliser les radeaux membranaires de ces phagosomes. En effet, suite à l'arrivée par endocytose de LPG, la distribution de GM1 passe du motif ponctué classique à une répartition uniforme de faible intensité. Une vérification par immunobuvardage montre que les constituants des radeaux lipidiques ne sont pas enlevés des phagosomes, mais seulement répartis sur toute la surface. Ceci nous a emmenés à proposer un modèle dans lequel les microdomaines des phagosomes sont dissous par l'action du LPG (chapitre III, figure 4C).

Une étude similaire à la nôtre a montré que la bactérie *Brucella abortus* était aussi dotée d'une molécule de surface capable de déstabiliser les radeaux membranaires du phagosome pour empêcher la fusion phagosome-lysosome (Arellano-Reynoso et al., 2005). Dans le cas de *B. abortus*, la molécule virulente est le *cyclic β-1-2-glucan* (CβG) de l'enveloppe de la bactérie. Le CβG n'a vraisemblablement pas le même mode d'action sur les radeaux que le LPG puisque sa structure s'apparente plutôt à celle des cyclodextrines utilisées pour extraire le cholestérol membranaire. Cependant, l'existence de ces deux cas, où un parasite vise les radeaux membranaires pour

survivre, amène à constater que ces microdomaines ont une importance capitale au bon fonctionnement du phagosome.

Mode d'action du LPG sur les radeaux membranaires

Nous savons que la membrane de *Leishmania* contient elle-même des radeaux membranaires où se partitionnent spécialement les molécules à ancre GPI dont fait partie le LPG et d'autres facteurs de virulence comme le GP63 (Denny et al., 2001). Plus précisément, chez la *Leishmania* promastigote procyclique, le GP63 est associé aux DRMs tandis que le LPG se trouve dans la partie non radeau ou DSMs. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'ancre GPI du LPG comprend une liaison de type lyso-alkyl plutôt qu'une liaison acyl/alkyl de GP63, et que le type, la longueur et le nombre des ancres GPI font partie des critères sensibles pour l'association aux DRMs (Benting et al., 1999). Nous avons mentionné dans la section 2 du chapitre I que la métacyclogenèse de *Leishmania donovani* est accompagnée de changements dans la molécule LPG. Il se trouve que ces changements permettent le recrutement du LPG métacyclique (mLPG) dans les DRMs du parasite (Denny et al., 2004). Étrangement, ceci ne s'explique pas par une modification de l'ancre GPI, qui est identique pour les deux formes du parasite (McIntosh et al., 1992). Il se peut que ce soit le nombre d'ancres GPI par molécule qui augmente, ou bien que les LPG s'oligomérisent pour s'associer aux DRMs comme on l'a observé chez certaines GPI-APs (Cunningham et al., 2003), ou encore qu'ils s'associent à d'autres molécules des DRMs comme la protéine B (Denny et al., 2001; Pimenta et al., 1994a).

De plus, la capacité du LPG à s'insérer dans les membranes du macrophage a été démontrée il y a longtemps (Tolson et al., 1990). Il a été suggéré que *Leishmania* pouvait se dépouiller activement de ses molécules LPG (Kaneshiro et al., 1982; Pimenta et al., 1994a) comme c'est le cas pour d'autres molécules à ancre GPI (Thomas et al., 1990) au cours du processus d'infection. Ceci nous amène à proposer que lorsque la *Leishmania* promastigote se retrouve dans le phagosome, elle sécrète des LPG qui vont s'insérer dans les radeaux membranaires du phagosome grâce à leurs ancres GPI. Selon toute vraisemblance, ce n'est pas simplement cette insertion qui

cause les effets délétères du LPG puisque les mutants *lpg1-* et *lpg2-* possèdent toujours cette ancre GPI et n'ont pas d'effets sur les radeaux. Les effets de LPG seraient donc attribuables aux unités répétitives de Gal(β 1,4)-Man α 1-PO₄, ce qui concorde avec une portée de moins en moins marquée lorsqu'on raccourcit le LPG par une hydrolyse acide (chapitre III figure 2E-F).

D'autres études sur les effets de LPG dans différents contextes pointent aussi vers la partie phosphoglycane (PG) du LPG. Par exemple, le PG, et non pas l'ancre GPI, serait responsable de l'inhibition de la fusion virale avec les membranes d'érythrocytes (Miao, 1995), de l'inhibition de la production d'IL-12 par les macrophages (Piedrafita et al., 1999) et de l'inhibition de l'activation des monocytes humains (Giorgione et al., 1996). À l'inverse, d'autres effets du LPG sur les cellules hôtes seraient imputables à la partie GPI, comme l'inhibition de la PKC α (McNeely et al., 1989) tandis que l'inhibition de la migration transendothéliale des monocytes semble nécessiter les deux parties (Lo et al., 1998). Dans le cas de l'interaction de LPG sur les phagosomes, il se peut très bien que l'ancre GPI ait un rôle à jouer, mais tout ce que nous savons pour l'instant c'est que la déstabilisation et l'inhibition du recrutement des radeaux lipidiques nécessitent obligatoirement la partie PG du LPG. Les effets du LPG que nous avons décrits pourraient être causés par les charges négatives qui sont distribuées sur la longue chaîne de polysaccharide du LPG. Cette chaîne encombrante et chargée a vraisemblablement des particularités lui permettant d'interférer avec l'assemblage des molécules en microdomaines.

Le mécanisme proposé du LPG concorde avec l'« hypothèse du champagne » proposée par Étienne Joly. À l'instar du champagne, qui a besoin de sites de nucléation pour libérer ses bulles, les membranes pourraient être maintenues dans la phase liquide désordonnée et avoir besoin d'un stimulus qui permette la formation des radeaux en phase cristalline solide (Joly, 2004). Selon cette théorie, l'encombrement stérique des molécules LPG empêcherait l'assemblage des molécules sous la forme de microdomaines ou causerait leur déstabilisation.

Le protéome du phagosome varie plutôt en quantité qu'en qualité

Les études précédentes sur la maturation du phagosome n'ont cherché à caractériser que quelques-uns des principaux marqueurs des phagosomes précoces et tardifs (Desjardins et al., 1994a; Desjardins et al., 1994b; Pitt et al., 1992). D'un autre côté, les études du phagosome utilisant la protéomique à grande échelle se sont limitées à décrire l'organelle d'un point de vue statique sans tenir compte de son évolution dans le temps (Burlak et al., 2006; Garin et al., 2001; Gotthardt et al., 2006; Jutras et al., 2008; Okada et al., 2005; Rogers and Foster, 2007; Stuart et al., 2007; Trost et al., 2009). Bien des questions à propos des mécanismes précis ayant lieu au cours des différentes étapes de la phagocytose sont donc restées en suspens. Notre approche, consistant à isoler des phagosomes après trois différentes périodes de maturation et à les analyser en parallèle par spectrométrie de masse, a été développée dans le but d'apporter les premières réponses à cette problématique fort complexe. Les phagosomes analysés dans notre étude (chapitre IV) sont tous issus d'une phagocytose de microbilles de polystyrène de 30 minutes, suivie d'un lavage et d'une chasse de 0, 30 ou 240 minutes, ce qui permet respectivement la formation de phagosomes précoces, de phagosomes intermédiaires et de phagolysosomes.

Nous ne pouvions pas simplement comparer les trois types de phagosomes en déterminant les protéines présentes ou absentes puisque moins du tiers des protéines sont uniques à un stade donné (figure 2A, chapitre IV). Nous avons donc choisi une méthode pour quantifier l'abondance relative des protéines pour chacune de nos conditions expérimentales. En plus des trois différentes phases, notre étude a caractérisé les protéines selon qu'elles sont associées ou non dans les microdomaines du phagosome, ce qui nous faisait un total de six conditions expérimentales à analyser. Les méthodes de protéomique quantitatives classiques comme le marquage métabolique (exemple : le SILAC pour *Stable isotope labelling with amino acids in cell culture*) ou le marquage des protéines/peptides (exemple : le ICAT pour *Isotope-coded affinity tags*) sont très précises, mais très complexes ou impossibles à utiliser

pour comparer directement plus de deux échantillons (Bantscheff et al., 2007). La méthode que nous avons utilisée, le compte de spectres (*spectral count*), aussi appelé compte redondant de peptides, est une des techniques dites « sans marquage » récemment développée (Liu et al., 2004) et qui a fait ses preuves en permettant la réalisation d'une étude complexe sur les composantes de la voie de sécrétion des protéines (Gilchrist et al., 2006). Cette technique tire avantage du fait que le nombre de peptides redondants du spectromètre de masse pour une protéine est proportionnel à la concentration de cette protéine. De plus, les méthodes de quantification sans marquage méritent d'être considérées pour plusieurs autres raisons. Au niveau technique, elles permettent d'éviter les étapes de marquage qui sont longues et coûteuses. Au niveau de la stratégie d'analyse, ces techniques n'augmentent pas la complexité des spectres de masse à analyser comme le font les techniques utilisant des isotopes, ce qui permet à l'appareil une meilleure profondeur d'analyse puisqu'on lui évite d'avoir à fragmenter chacune des formes du peptide marqué (Bantscheff et al., 2007). Il a aussi été démontré que les méthodes sans marquage offrent une plus grande portée dynamique, ce qui est un avantage certain lors de l'analyse de grands ensembles de protéines comme dans notre cas.

Les protéines du phagosome ont trois principaux comportements cinétiques

Puisque notre méthode de quantification permet d'assigner les quantités relatives des protéines pour chacune des phases de la phagocytose, nous avons généré une figure de type « carte thermique » (*heat map*) pour représenter les différents comportements cinétiques des 921 protéines (chapitre IV, figure 3A). Les protéines y sont d'abord classées selon leur maximum d'intensité, ce qui les classe en trois catégories : i) protéines dont la quantité relative augmente; ii) protéines dont le maximum est au temps intermédiaire (ou transitoires sur le phagosome); et iii) protéines qui diminuent. Comme on peut le voir par les protéines identifiées à la figure 3A, nos résultats confirment parfaitement les connaissances antérieures et regroupent les marqueurs précoces dans le premier groupe (Na-K ATPase, Rab5a), les marqueurs tardifs dans le

troisième groupe (Cathepsine D, LAMP1, Flotillin-1) tandis que les protéines transitoires suivent une cinétique déjà établie (Dermine et al., 2001; Desjardins et al., 1994a; Desjardins et al., 1994b; Jutras et al., 2008). Fait à noter, chacun de ces groupes cinétiques représente environ un tiers des protéines du phagosome, témoignant ainsi d'un certain équilibre dans le nombre de protéines différentes, et ce, malgré le grand dynamisme du phagosome. La distribution dans les trois groupes n'est pas répartie de la même façon lorsqu'on regarde seulement les protéines des DRMs (chapitre IV, figure 3B). Nous y reviendrons dans une prochaine section de ce chapitre.

Les fonctions du phagosome sont révélées sous un nouvel angle

La génération de cartes thermiques représentant les principales catégories fonctionnelles de notre liste de protéines permet de voir dans quel ordre ces protéines sont recrutées sur le phagosome. On apprend ainsi que les SNARES impliquées dans la fusion avec le RE (VAMP-3, Sec22b, Syntaxin 5) arrivent relativement tôt tandis que celles reconnues dans la fusion avec les endosomes tardifs (Vti1b, Syntaxin-8) arrivent plus tard (voir le chapitre VI, tableau supplémentaire 5). Ces résultats sont toutefois à prendre avec réserve puisque la majorité de ces SNAREs sont présentes à tous les stades de maturation et nécessitent un ou des partenaires ainsi que des protéines accessoires pour jouer leur rôle. Une analyse plus détaillée et fonctionnelle de ces protéines sur le phagosome serait une des suites intéressantes de mon projet.

Les petites GTPases les mieux connues sur le phagosome sont Rab5 et Rab7. Conformément à leur implication dans les mécanismes précoces et tardifs de la phagocytose, ces protéines se retrouvent respectivement au premier rang des GTPases qui diminuent et de celles qui augmentent. Spécifions que les protéines de chaque sous-groupe sont classées selon le nombre de peptides redondants, du plus grand au plus petit. On remarque aussi que Rab27a, impliquée dans la régulation de l'acidification afin de permettre la présentation d'antigènes (Jancic et al., 2007), fait partie des GTPases qui sont présentes de façon transitoire sur le phagosome. Rab21 et Rab22, impliquées dans la régulation du trafic membranaire des endosomes, sont aussi

à leur maximum à 30/30. Notre analyse a de plus permis d'identifier Rab14, pour laquelle on a établi un rôle de stimulation de la fusion entre les phagosomes et les endosomes précoces, mais pas avec les endosomes tardifs (Kyei et al., 2006). Ceci concorde avec sa décroissance dans le phagosome entre 30/30 et 30/240.

La catégorie fonctionnelle nommée « métabolisme » regroupe une grande variété d'enzymes dont celles impliquées dans la biosynthèse des protéines, dans la modification post-traductionnelle ou dans la dégradation. Le premier constat est que, contrairement à ce à quoi on pourrait s'attendre chez une organelle dont la fonction première est de dégrader différentes particules, les protéases ne sont pas les protéines les plus nombreuses dans cette catégorie. Une grande variété d'enzymes métaboliques est présente à chaque étape de la phagocytose. Cependant, la zone rouge regroupant entre autres Cathepsin B, D, Z en plus de Nicastrine indique que ce sont ces protéases qui sont les protéines du métabolisme qui augmentent le plus dans le temps sur le phagosome, ce qui n'est pas du tout étonnant.

Pour ce qui est des récepteurs sur le phagosome, on pourrait s'attendre à ce qu'ils fassent partie des principaux types de récepteurs de phagocytose et qu'ils soient présents principalement sur les phagosomes précoces puisqu'ils diminuent dans le temps suite à leur recyclage vers la membrane plasmique. On retrouve en effet les récepteurs de type éboueurs (*scavengers receptors*) ainsi que le récepteur du complément CR5 parmi les récepteurs qui sont surtout présents sur les jeunes phagosomes. Cependant, les récepteurs Fc γ arrivent étonnamment plus tardivement sur le phagosome, même que Fc γ RII est maximal au temps le plus tardif. La présence de *Toll-like receptor 7* (TLR7) dans les phagosomes plus tardifs n'est toutefois pas inattendue puisque ce récepteur est principalement exprimé de façon intracellulaire et qu'on lui attribue un rôle dans la reconnaissance d'agents pathogènes à l'intérieur du phagolysosome (Nishiya and DeFranco, 2004). On ne s'étonnera pas non plus de retrouver les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I H-2D, Beta-microglobuline, CMH I H-2K, CMH II li) plus tardivement associées au phagosome puisqu'il n'y a pas de peptides prêts à être chargés en début de phagocytose.

Il est fort intéressant de voir que les transporteurs transmembranaires sont présents en si grand nombre (63) sur le phagosome puisque les études protéomiques précédentes n'avaient pas ou peu rapporté de protéines dans cette catégorie importante. En effet, bien que peu décrits, les mécanismes de recyclage des éléments issus de la dégradation des particules sont importants pour le bon fonctionnement du phagosome. La tendance la plus notable est la prépondérance des sous-unités de la V-ATPase dans les transporteurs qui sont au maximum dans le phagolysosome. Ceci concorde avec la deuxième vague d'acidification du phagosome dont il était question dans l'introduction (Beyenbach and Wieczorek, 2006). Nos autres données indiquent que le transport des acides aminés (par SNAT2, ASC2, CD98) a principalement lieu chez les phagosomes intermédiaires tandis que les transporteurs de polypeptides (Sec61) et de protéines (SCAMP 3, Importin beta 1) sont présents sur les phagosomes précoces et tendent à diminuer ensuite. Cette cinétique d'expression des transporteurs transmembranaires sur les phagosomes concorde avec la disponibilité de peptides issus de la particule présente dans les jeunes phagosomes qui sont dégradés en acides aminés par la suite.

Les protéines associées aux DRMs sont distinctes du reste des protéines des phagosomes

Comme on peut le constater en comparant les figures 3A et 3B du chapitre IV, les protéines associées aux DRMs suivent les trois mêmes tendances cinétiques que celles du phagosome, mais pas du tout dans les mêmes proportions, comme le démontre la figure supplémentaire 1 en annexe. Chez les protéines des DRMs, la tendance principale est à l'augmentation, avec 61 % des protéines qui sont en nombre maximal au temps le plus tardif. Ceci montre que la composition en protéines de ces sous-domaines se forme graduellement au cours de la phagocytose. Il est peu probable que les radeaux membranaires soient présents tout au long de la maturation du phagosome et que les protéines qui y sont associées augmentent autant. Les radeaux membranaires sont vraisemblablement absents ou peu présents sur les phagosomes précoces, ce qui

nous laisse croire qu'ils ne proviennent pas de la membrane plasmique. Qu'ils soient formés directement sur le phagosome ou qu'ils soient recrutés lors des fusions avec les endosomes et lysosomes, leur fonction ne peut s'exercer que lorsque les machineries protéiques jouant ces rôles y sont réunies, soit après une maturation du phagosome.

Les fonctions spécifiques aux radeaux membranaires des phagosomes peuvent être déduites de nos données d'enrichissement des protéines concernant chacune des fonctions dans les DRMs (figure supplémentaire 2 en annexe). On voit alors que 8 des 19 fonctions répertoriées sur le phagosome sont plus représentées dans les DRMs. Parmi celles-ci, on retrouve les fonctions déjà envisagées pour les radeaux membranaires des phagosomes (signalisation, petites GTPases, cytosquelette) (Dermine et al., 2001). Les autres fonctions qui semblent majoritairement exercées par les radeaux sont assez surprenantes (Métabolisme, Transport transmembranaire). Il serait intéressant de refaire cette analyse avec le compte de peptides pour chaque groupe fonctionnel au lieu du nombre de protéines.

Le recrutement des protéines dans les DRMs est un aspect important de la maturation du phagosome

La figure 6A du chapitre IV donne un aperçu visuel des proportions des protéines pour lesquelles on a détecté ou non des peptides dans les DRMs. Il ne s'y trouve que les 708 protéines de notre liste qui étaient répertoriées dans la base de données d'interactions STRING. Ces protéines forment un réseau potentiel comprenant 3133 interactions protéine-protéine. En partant de midi et dans le sens horaire, chaque tiers de cette sphère représente les protéines dont le nombre maximum est respectivement à 0, 30 et 240 minutes de maturation du phagosome. La première tendance que l'on peut voir est que les protéines passent d'une minorité dans les DRMs initiaux à une majorité dans les DRMs tardifs (figure supplémentaire 3 en annexe). Il est intéressant de constater que les interactions des protéines des DRMs précoces et intermédiaires se font majoritairement avec des protéines situées hors des DRMs (barres bleues, rouges et vertes sont plus petites que les mauves, cyan et orange) tandis que ces interactions

sont équilibrées entre les DRMs et DSMs dans le phagolysosome. Autrement dit, pour les phagosomes précoces et intermédiaires (30/0 et 30/30), les protéines qui pourraient interagir ensemble sont partagées entre DRMs et DSMs et ne peuvent pas jouer leur rôle alors que dans les DRMs tardifs (30/240), un plus grand nombre d'interactions peuvent avoir lieu donc plus de machineries moléculaires sont actives.

Notre étude rapporte aussi de nombreuses interactions potentielles qui n'avaient pas encore été décrites (chapitre IV, figure 6B). La base de données d'interactions obtenue par nos collaborateurs grâce à un essai sur la levure nous donne de nombreuses pistes pour enquêter sur les mécanismes permettant aux protéines d'accomplir leurs fonctions sur le phagosome. Par exemple, l'interaction entre l'ATPase PMC1 l'ATPase VMA13 chez la levure aurait comme équivalent, chez la souris, une interaction entre la P-type ATPase et la sous-unité H de la V-ATPase.

En regardant plus spécifiquement les protéines associées aux DRMs, on constate à nouveau que leur nombre augmente beaucoup durant la formation du phagolysosome (chapitre IV, figure 6C). Les trois panneaux de cette figure comportent en arrière-plan toutes les protéines associées au DRMs répertoriées, par nos collaborateurs, dans la base de données STRING ou dans la banque d'informations d'interactions chez la levure. Les protéines affichées en plus foncé sont celles dont la quantité maximale est à cette étape de la maturation. Parmi ces protéines, seulement trois sont exprimées de façon constante (TRAP-delta, V-ATPase E, Malate déshydrogénase 2) et sont, par conséquent, présentes sur les trois panneaux. Parmi les autres, on retrouve 17 protéines précoces, 91 qui sont transitoires et 168 dont l'expression est maximale au dernier temps de maturation étudié. Fait intéressant, parmi les 17 protéines des DRMs initiaux, nous retrouvons 7 marqueurs habituellement attribués aux mitochondries (Cytochrome b5 A, Cytochrome b5 reductase, Malate déshydrogénase, NADH déshydrogénase 1 beta 4, F-ATPase beta et les transporteurs VDAC1 et 2). Ces résultats vont à l'encontre des conclusions récentes de Foster et collaborateurs qui déclarent que : i) les mitochondries ne contiennent pas de radeaux membranaires; et que ii) les protéines des mitochondries ne se retrouvent pas non plus dans des radeaux ailleurs dans la

cellule (Zheng et al., 2009). Le concept établissant que les mitochondries soient dépourvues de radeaux membranaires est généralement reconnu; cependant, plusieurs études protéomiques ont rapporté la présence des VDACs et de la F-ATPase dans les DRMs de différents types cellulaires (Bae et al., 2004; Man et al., 2005; McMahon et al., 2006). Les aspects négligés par l'équipe de Foster sont que les radeaux membranaires ne se retrouvent pas uniquement sur la membrane plasmique et que l'isolation d'organelles précédant la séparation des DRMs permet de détecter des protéines que la faible concentration relative ne permet pas de détecter dans une préparation de membranes cellulaires totales. Une des forces de notre approche est que nous effectuons l'isolation des phagosomes avec le même protocole pour les phagosomes précoces, intermédiaires ou tardifs. Les contaminants protéiques issus de l'imperfection de la méthode de purification des phagosomes (exemple : histones) ou causés par les étapes expérimentales (exemple : trypsine) sont généralement détectés en faibles quantités et avec un compte de peptides semblable pour les trois temps mesurés. Les protéines présentes en plus grande quantité dans les DRMs précoces représentent d'ailleurs un comportement qui est contre la tendance générale, ce qui est une autre indication que ce ne sont pas des contaminants. D'ailleurs, la sélection rigoureuse des protéines que nous avons effectuée pour obtenir notre liste finale de 921 protéines a éliminé 444 protéines, soit près du tiers des protéines initialement identifiées. Ces protéines éliminées comprennent la grande majorité des faux positifs, qu'ils soient induits par contamination ou par une identification erronée du spectre de masse.

La figure 6C du chapitre IV présente les protéines associées aux DRMs en tenant compte de leur mode de recrutement. En analysant les données de spectrométrie de masse, nous avons remarqué que les protéines qu'on retrouve dans les DRMs y sont recrutées soit après leur passage dans la partie DSM des phagosomes (carrés), soit directement d'une autre source (cercles). On voit donc, par cette figure, qu'il semble y avoir deux modes de recrutement des protéines dans les radeaux membranaires des phagosomes : i) un stimulus qui permet le passage d'une protéine de la membrane normale vers les microdomaines; ii) l'arrivée sur le phagosome de nouveaux radeaux

membranaires contenant des protéines qui s'ajoutent aux DRMs des phagosomes. La distinction entre ces deux modes de régulation est très importante puisqu'elle implique que ce n'est pas parce qu'une protéine est présente sur le phagosome à un moment précis qu'elle y joue son rôle à ce même moment. Ces résultats nous laissent effectivement croire que certaines protéines présentes au début de la phagocytose n'y jouent pas leur rôle avant d'être recrutées aux radeaux membranaires du phagosome. D'autres possibilités sont aussi envisageables à propos de ce passage des membranes solubles aux membranes insolubles. Il se peut aussi qu'une protéine y soit inhibée ou que son activité y soit modifiée. Un cas intéressant est la protéine RGS19 dont la quantité augmente dans les DRMs, mais qui reste stable dans les DSMs (chapitre IV, figure 5). Fait étonnant, la quantité totale de cette protéine associée aux phagosomes diminue dans le temps (figure supplémentaire 4 en annexe). Une étude cinétique de RGS19 sur le phagosome omettant la dimension spatiale (microdomaines) aurait pu avoir comme conclusion que cette protéine joue principalement son rôle au début de la maturation. Notre approche spatio-temporelle nous a permis de constater que la diminution globale de RGS19 est accompagnée d'un enrichissement dans les DRMs. Cette protéine qui est impliquée dans l'inhibition de certaines voies de signalisation augmente l'activité GTPase des sous-unités alpha des protéines G hétérotrimériques, ce qui les amène à leur état inactif lié au GDP. Le transfert de RGS19 de la partie soluble vers la partie insoluble du phagosome s'accompagne justement d'un transfert dans le même sens de quatre protéines G alpha. En effet, les protéines G alpha, G alpha 13, G alpha i2 ainsi que G alpha i3 augmentent dans la partie soluble pendant les 30 premières minutes de maturation puis diminuent ensuite, tandis qu'elles sont à leur expression maximale dans la partie insoluble à 240 minutes (table 1, en annexe). La G alpha i2 semble particulièrement abondante dans les radeaux membranaires du phagosome avec une moyenne de 85,2 spectres générés pour les trois répliques de l'expérience. Les G beta 1 et 2 suivent aussi cette cinétique tandis que les G gamma 2, 5 et 10 ont exclusivement été détectés dans la partie non-radeau des phagosomes.

Une autre population de protéines que nous avons observée lors de notre analyse est celle qui est recrutée dans les radeaux membranaires de façon transitoire. Sur les 114

protéines dont le compte de peptides dans les DRMs est à son maximum à 30 minutes de maturation, près de la moitié (54) sont aussi exprimées majoritairement dans la partie soluble (DSMs) des phagosomes. Ce sous-ensemble de protéines semble donc être en équilibre entre les deux différents sous-domaines du phagosome. Une quantité équivalente (49) des protéines transitoires des DRMs est en décroissance dans les DSMs. Ce sont donc des protéines qui sont majoritairement insolubles sur les phagosomes précoces, qui sont recrutées dans les radeaux des phagosomes intermédiaires et qui disparaissent ensuite du phagosome.

Nos résultats permettent de mettre à jour le phagosome virtuel

La grande quantité de nouvelles données générées lors de cette série d'analyses nous a permis de construire un nouveau modèle du protéome du phagosome. Nous avons donc fait une mise à jour du phagosome virtuel (chapitre IV, figure 7). Parmi les protéines que nous avons identifiées, nous avons pu en regrouper de nombreuses selon leurs rôles potentiels sur le phagosome.

Fonctions microbicides

La phagocytose des microbes conduit à leur mort rapide et le complexe de la NADPH oxydase y joue un rôle important. Les deux sous-unités membranaires de ce complexe (p22phox et gp91phox) ainsi que Rac1 et Rac2, qui sont des régulateurs connus de l'activité de la NADPH oxydase (Bokoch, 2005), ont été identifiés sur les phagosomes précoces, ayant une abondance maximale à 30/0 ou 30/30. La protéine kinase C δ (PKC δ), un régulateur important de l'activité de la NADPH oxydase, a aussi été identifiée sur les phagosomes précoces. PKC δ est en effet requis pour la phosphorylation de la sous-unité p47phox, ce qui provoque un accroissement de l'activité du complexe enzymatique (Bey, J. Immunol, 2004). La PKC δ a aussi une fonction dans le confinement de *Listeria monocytogenes* dans le phagosome (Schwegmann et al., 2007). Les composants p22phox et gp91phox ont tous deux été identifiés dans les DRMs, conformément à la proposition affirmant que les radeaux

membranaires jouent le rôle de plateforme d'assemblage du complexe de la NADPH oxydase. L'enrichissement de ces sous-unités dans les DRMs est maximal au temps 30/240, ce qui suggère que, malgré une diminution de leur quantité globale sur le phagosome, l'activité de la NADPH oxydase persiste sur les phagolysosomes. Les propriétés oxydatives du phagosome peuvent aussi être modulées par la protéine hème oxygénase-1 (HO-1), qui a été identifiée sur les phagosomes précoces. HO-1 possède des propriétés anti-oxydantes (Taille et al., 2004) et peut augmenter la phagocytose lors d'un choc septique microbien, et ce, en augmentant la production de monoxyde de carbone (Chung et al., 2008).

Fusion membranaire

La plus importante famille de protéines impliquées dans la fusion membranaire est probablement les SNAREs. Quelques SNAREs ont déjà été décrites comme étant associées aux DRMs (Lang, 2007). L'utilisation de différentes conditions expérimentales sur différents types cellulaires rend difficile l'élaboration de la liste des SNAREs qui sont associées ou non aux DRMs. On peut en avoir un bon aperçu en choisissant les SNAREs qui sont associées à plus de 50 % aux DRMs dans au moins une sorte de cellules (Syntaxin 3, Syntaxin 4, SNAP-23 et VAMP2) (Lang, 2007). Nos résultats montrent, pour la première fois, que 11 SNAREs sont associées aux DRMs des phagosomes, dont 10 ayant un ratio d'enrichissement dans les DRMs qui s'accroît durant la maturation (table supplémentaire 5, en annexe). Nous avons également identifié 4 protéines accessoires des SNAREs qui partagent le même comportement. Les 11 autres SNAREs et protéines partenaires identifiées sur le phagosome n'étaient présentes que dans la partie DSM du phagosome, ce qui suggère que différents sous-groupes de ces protéines de fusion sont distribués indépendamment sur le phagosome. Tel que Lang l'a proposé dans le cas de l'exocytose, cette ségrégation des SNAREs du phagosome sert peut-être à séparer spatialement les différents types d'événements de fusion (Lang, 2007).

Biogenèse des corps multivésiculaires

Notre analyse protéomique a permis de relever la présence de différents composants du complexe de triage endosomal requis pour les machineries de transport (ESCRT pour *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Ce complexe est nécessaire pour la formation des corps multivésiculaires (MVBs pour *MultiVesicular Bodies*) qui est accomplie par l'invagination des membranes endosomales (Williams and Urbe, 2007), ce qui suggère que ce processus peut aussi avoir lieu sur le phagosome. D'une façon qui concorde avec la dynamique connue d'assemblage du complexe ESCRT, les trois composants du complexe ESCRT-I (TSG101, VPS28 et VPS37) ont été identifiés tôt sur les phagosomes, avec une abondance maximale après 30 minutes de maturation. Un seul composant d'ESCRT-II a été identifié dans notre analyse (VPS25) et seulement dans les phagosomes 30/30, suggérant que le complexe ESCRT-II au complet peut être recruté dans un stade de maturation entre 30/30 et 30/240 minutes. D'un autre côté, la formation des MVBs pourrait peut-être avoir lieu indépendamment du complexe ESCRT-II puisqu'il a été suggéré qu'ESCRT-I recrute directement ESCRT-III grâce à ALIX (Odorizzi, 2006). Conformément à cette hypothèse, ALIX a été identifiée sur les phagosomes de tous les stades étudiés, avec un maximum à 30/30. Les composants du complexe ESCRT-III formant un lacis sur les membranes (CHMP4, CHMP5) ont été identifiés ainsi que BROX, une protéine dont l'interaction avec CHMP4 a récemment été découverte (Ichioka et al., 2008). Nous avons de plus identifié VPS4 qui est l'ATPase responsable du désassemblage ATP-dépendant du lacis d'ESCRT-III. Il est à noter que CHMP4, CHMP5 et ALIX sont associées aux DRMs avec une abondance maximale au temps 30/240.

Régulation de l'apoptose et de l'autophagie

Un stress cellulaire peut déclencher soit la voie apoptotique, soit la voie autophagique, selon la nature et l'intensité du stress impliqué (Maiuri et al., 2007b). Contrairement à l'apoptose, l'autophagie permet aux cellules de s'adapter au stress bien qu'une autophagie massive puisse aussi mener à la mort cellulaire. Différentes protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose ont été identifiées sur le phagosome, incluant Aven, BCL-X_L, BAD, BAX et BAK. Aven, un inhibiteur de l'apoptose qui

interfère avec l'activation des caspases (Chau et al., 2000), est présent sur les phagosomes précoces avec BCL-X_L, qui lui, restreint l'activité des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 (Youle, 2007). D'un autre côté, les protéines pro-apoptotiques BAD, BAK et BAX affichent une abondance maximale au temps 30/0, 30/30 et 30/240 respectivement. BAD agit comme un senseur du stress cellulaire et amorce l'oligomérisation de BAX et/ou BAK dans la membrane externe des mitochondries, où ils forment des canaux par lesquels les protéines mitochondriales traversent vers le cytoplasme. Cette étape cruciale est souvent décrite comme le point de l'engagement dans la voie de l'apoptose (Maiuri et al., 2007b).

En plus de leur rôle dans le déclenchement de l'apoptose, différents facteurs apoptotiques bien caractérisés tels que BAX/BAK, BAD et BCL-X_L peuvent aussi réguler l'autophagie (Maiuri et al., 2007b). Il a récemment été démontré que BAD est nécessaire pour l'autophagie induite par stress nutritif, probablement en empêchant l'interaction entre BCL-X_L et Becline-1, une protéine essentielle pour la formation des autophagosomes (Maiuri et al., 2007a). Becline-1 a été identifiée sur les phagosomes intermédiaires tandis que LC3, un marqueur des autophagosomes, est recruté à cette étape, mais montre un maximum d'abondance sur les phagolysosomes. Il a été rapporté que Becline-1 et LC3 s'associent à des phagosomes contenant des levures mortes ayant des cinétiques similaires et il a été suggéré qu'ils aient un rôle dans la maturation du phagosome (Sanjuan et al., 2007).

Cette dernière étude rapporte cependant que les phagosomes contenant des billes de latex sont dépourvus des marqueurs des autophagosomes. Nos observations de ces marqueurs sur nos phagosomes peuvent résulter du traitement que nous avons fait et qui est susceptible de déclencher l'autophagie. En effet, pour réduire la contamination de nos échantillons par les protéines du sérum, qui par leur abondance pourraient masquer l'identification par spectrométrie de masse des protéines de plus faible concentration, nous avons lavé les cellules dans du PBS avant leur incubation dans un milieu de culture sans sérum pour les étapes d'internalisation et de maturation. Le stress cellulaire résultant de cette déprivation de nutriments chez des cellules en

confluence peut avoir induit l'autophagie, ou plus spécifiquement la mitophagie, soit la dégradation sélective des mitochondries (Maiuri et al., 2007b). L'identification de protéines mitochondriales dans nos préparations de phagosomes peut donc résulter de la fusion entre les autophagosomes et les phagosomes précoces.

Présentation sur les CMH classe II

Notre analyse a permis d'identifier Cystatine C sur le phagosome, celle-ci ayant comme fonction d'inhiber les cathepsines et, par le fait même, de réguler la dégradation de la chaîne Ii du CMH classe II (aussi sur le phagosome) qui est dépendante de la cathepsine S (Kitamura et al., 2005). La cathepsine S est également présente sur le phagosome, avec un maximum dans les phagosomes intermédiaires, tout comme GILT (ou *Lysosomal thiol reductase*) qui est aussi impliqué dans la présentation d'antigènes exogènes sur le CMH classe II.

Présentation croisée sur les CMH classe I

De plus en plus d'indices suggèrent que les phagosomes pourraient être des organelles autosuffisantes pour accomplir la présentation de peptides exogènes sur les molécules du CMH de classe I, ce processus étant appelé la présentation croisée (Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003). Le translocon Sec61 et l'ATPase p97, qui sont des candidats pour jouer le rôle de la rétrotranslocation de protéines à partir de la lumière du phagosome vers le cytosol (Ackerman et al., 2006), ainsi que des sous-unités du protéasome, dont le rôle serait de dégrader les protéines rétrotransloquées, ont été identifiés sur les phagosomes précoces. Des composants du complexe de chargement des peptides sur le CMH-I tels que calréticuline, tapasine et la chaîne alpha du CMH-I sont également détectés en abondance sur les jeunes phagosomes puis leur quantité diminue durant la maturation. De plus, des enzymes impliquées dans la N-glycosylation, incluant les oligosaccharyltransférases ribophorine 1 et 2, ou impliquées dans le traitement des groupements N-glycan, comme la glucosidase 1, ont aussi été trouvées sur les phagosomes précoces. Ceci concorde avec la découverte récente que la machinerie de glycosylation du RE est recrutée au phagosome et que la machinerie

de dégradation qui y est associée participe à la présentation croisée (Ackerman et al., 2006).

Dans le cadre des travaux de Mathieu Houde sur la présentation croisée par les phagosomes, nous avons constaté, dans une expérience d'immunofluorescence, que le marquage des phagosomes pour les sous-unités du protéasome est discontinu (article III, figure 2C, annexe), ce qui ressemble à la distribution des protéines des radeaux membranaires comme flotilline-1 (chapitre III figure 1C). Nous avons donc vérifié la présence des sous-unités du protéasome dans les DRMs des phagosomes et constaté qu'ils n'y sont pas (annexe III article 3, figure 2D). Toutes les sept sous-unités du protéasome que mon analyse a révélé ont été détectées dans la partie soluble (DSMs) du phagosome, avec un maximum d'intensité à 0 minutes (26S non-ATPase sous-unité régulatrice 7, composant C9), 30 minutes (alpha 2, beta 3, beta 4) ou 240 minutes de maturation (26S non-ATPase sous-unité régulatrice 13, beta 2).

Vésicules recouvertes de clathrine (formation et bourgeonnement)

Nous avons trouvé plusieurs sous-unités de l'*adaptor protein complex* 1 et 2 (AP-1 et AP-2) ainsi que la dynamine sur les phagosomes. La *phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein* effectue le recrutement et l'assemblage de la clathrine et de l'AP-2 à la membrane. Nous avons, bien entendu, retrouvé la chaîne lourde de la clathrine, dont la quantité augmente avec la maturation du phagosome. Nos analyses ont aussi permis de découvrir l'association de CALM au phagosome, CALM étant une protéine d'assemblage de la structure de clathrine qui ressemble à AP180. Comme AP180, CALM a : i) un domaine ANTH (pour *AP180 N-terminal homology*) qui lui permet de lier les lipides de la membrane; et ii) des motifs spécifiques liant la clathrine et le complexe AP-2, qui sont les principaux composants des vésicules des clathrines (Harel et al., 2008).

Transport transmembranaire

Les protéines VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) sont bien connues pour leur localisation dans la membrane externe des mitochondries, où elles jouent leur rôle de canal transmembranaire sélectif pour certains ions et réagissent au potentiel membranaire. Dans la conformation ouverte (lorsque le potentiel membranaire est bas), les VDACs transportent des métabolites essentiels, notamment l'ATP, l'ADP, le phosphate inorganique et le cholestérol (Goncalves et al., 2008; Papadopoulos et al., 1997). Les petits ions tels que le K⁺, le Na⁺ et le Ca⁺ peuvent être échangés par ces canaux même dans leur conformation fermée (Lemasters and Holmuhamedov, 2006; Reymann et al., 1998). Notre analyse révèle la présence de VDAC-1 et VDAC-2 sur les phagosomes, principalement les phagosomes précoces avec un ratio important dans les DRMs.

Les VDACs ont aussi été trouvées chez les endosomes et on leur a attribué un rôle dans l'acidification puisqu'elles font le transport des ions Cl⁻, ce qui permet d'équilibrer les charges positives des ions H⁺ (Reymann et al., 1998). On a aussi démontré leur présence dans les cavéoles (Bàthori, 1999) et dans les radeaux lipidiques (Bahamonde et al., 2003) de la membrane plasmique où ils joueraient un rôle précédemment attribué aux canaux Maxi Cl⁻. Le relâchement de molécules dont le cytochrome c par les canaux VDACs est déclenché par la protéine pro-apoptotique BAX qui, comme nous l'avons mentionné précédemment, a aussi été trouvée sur le phagosome précoce. On retrouve un autre composant du pore de transition de la perméabilité (PTP pour *Permeability Transition Pore*) sur le phagosome, ANT2 (*adenine nucleotide translocator 2*) (Tsujimoto and Shimizu, 2007), qui est dans la membrane soluble des phagosomes précoces et passe aux DRMs durant la maturation. Le diamètre du pore des VDACs est de 2.5 à 3.0 nm, ce qui est suffisant pour laisser passer des nucléotides et de petites molécules, mais insuffisant pour laisser passer une protéine repliée comme le cytochrome c. La découverte de la capacité des VDACs à s'oligomériser a conduit Shoshan-Barmatz et confrères à proposer que ce sont les oligomères de VDACs qui permettent la relâche du cytochrome c (Shoshan-Barmatz et al., 2008). Constatant l'enrichissement de ces canaux dans les DRMs, il est tentant

d'aller plus loin et de proposer que cette oligomérisation des VDACs est régulée par leur recrutement dans les radeaux membranaires. Finalement, une autre protéine interagissant avec VCAC a été identifiée dans les phagosomes, soit la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). GAPDH déclenche l'ouverture du PTP par son interaction avec VDAC, ce qui lui confère un rôle possible dans l'oligomérisation du transporteur. GAPDH est présente sur les phagosomes des trois temps de maturation et sa quantité va en croissant dans les DSMs aussi bien que dans les DRMs.

La Na⁺,K⁺-ATPase est une protéine intégrale trouvée dans les cellules de tous les eucaryotes supérieurs et qui est responsable de la translocation des ions Na⁺ et K⁺ à travers la membrane en utilisant l'ATP comme source d'énergie. Pour trois ions Na⁺ éjectés de la cellule, 2 K⁺ sont pompés à l'intérieur (Lingrel and Kuntzweiler, 1994). Puisque nous avons trouvé les sous-unités alpha-1, alpha-3 et beta-3 principalement sur les phagosomes 30/0 et 30/30, nous pouvons supposer que La Na⁺,K⁺-ATPase est active et qu'elle transfère 3 Na⁺ vers le phagosome pour 2 K⁺ vers le cytoplasme et ce, dans les premières étapes de la maturation du phagosome. Leur rôle pourrait être l'établissement d'un potentiel membranaire au niveau du phagosome, potentiel semblable à celui de la membrane plasmique. À première vue, cet échange d'ions semble favoriser la mise en place d'un potentiel membranaire positif pour le phagosome, mais en regardant plus en détail le protéome du phagosome on peut déduire que les ions Na⁺ sont retournés au cytosol par SNAT-1 et 2 (*Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporter*) qui font le transport couplé de Na⁺ et d'acides aminés (Burkhalter et al., 2007). Les deux SNATs sont à leur maximum à 30/0, mais seul SNAT-2 a été détectée dans les DRMs, principalement à 30/30. Une autre protéine de transport couplée au Na⁺ a été trouvée sur la phagosome, le *Na⁺-dependent ascorbic acid transporter* (Slc23a2).

Parmi les transporteurs identifiés principalement sur les phagosomes intermédiaires, il y en a trois de la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette transporters*). ABCB1 et ABCB6 sont redirigés vers les radeaux des phagolysosomes tandis qu'ABCC1 est principalement associé aux membranes solubles du phagosome. Les

transporteurs ABC déplacent surtout des molécules vers l'extérieur de la membrane plasmique ou vers l'intérieur d'organelles comme le phagosome. ABCA1 a d'ailleurs déjà été observé dans les radeaux lipidiques des macrophages (Bared et al., 2004).

La sélectivité des transporteurs ABC est souvent assez large. ABCB1 transporte des produits métaboliques, des lipides et des stérols, en plus de drogues et d'autres xénobiotiques. ABCC1 est un transporteur important d'une variété de molécules organiques conjuguées, tels que des conjugués au glutathion, en plus d'être un facteur de résistance pour de nombreuses drogues anti-cancérigènes (Choudhuri and Klaassen, 2006). Certains de ces conjugués au glutathion sont impliqués dans la détoxification et la protection contre les stress oxydatifs (Leite et al., 2007a). ABCC1 serait aussi impliqué dans la relâche de médiateurs de l'inflammation (Leite et al., 2007a; Leite et al., 2007b).

Les principales protéines impliquées dans le transport transmembranaire qui sont enrichies sur les phagosomes tardifs sont les différentes sous-unités du complexe de la V-ATPase (chapitre IV, figure 4B). La V-ATPase est une enzyme hétéromultimérique composée d'un complexe catalytique V1 qui est périphérique (cytoplasmique) et attaché au complexe V0, un pore à protons transmembranaire. Les sous-unités A à H composent le complexe V1 tandis que les composants a, c, c', c'' et d forment le complexe V0. Notre analyse par spectrométrie de masse a pu identifier des isoformes de chacune des 8 composantes de la partie V1 ainsi que les sous-unités a et d de V0 (chapitre IV, table1). La grande hydrophobicité des sous-unités c, qui sont intégrales à la membrane peut expliquer pourquoi ils ne sont pas parmi les protéines détectées. On peut toutefois assumer qu'elles sont présentes sur nos phagosomes puisque ces sous-unités sont essentielles aux fonctions principales des V-ATPases et aussi parce que ces sous-unités ont été identifiées au niveau des phagosomes des cellules S2 (Stuart et al., 2007) et des endosomes de cellules BHK (*Baby Hamster Kidney cells*) (Lafourcade et al., 2008).

Le complexe V1 catalyse l'hydrolyse de l'ATP et l'énergie relâchée par cette réaction est utilisée pour permettre la rotation de la structure en anneau du complexe V0, ce qui produit un mouvement transmembranaire de protons (Steinberg et al., 2007). Les V-ATPases sont les grandes responsables de l'acidification du phagosome puisqu'elles peuvent pomper les protons contre leur gradient de concentration grâce à l'énergie tirée de l'ATP. Des études chez le poisson-zèbre ont révélé que la V-ATPase pourrait avoir un rôle dans la maturation en plus de celui qu'elle a dans l'acidification. La sous-unité a1 du complexe V0 est requise pour la fusion du phagosome avec les lysosomes (Peri and Nusslein-Volhard, 2008). Notons que l'Aldolase, qui est aussi présente sur les phagosomes, aurait un rôle de régulation de la V-ATPase, ce rôle étant la dissociation réversible des complexes V1 et V0 (Jefferies et al., 2008).

Il est intéressant de constater que plusieurs sous-unités de la V-ATPase, plus particulièrement celles du complexe V0, sont associées aux DRMs. Le rôle de l'environnement lipidique sur la régulation de la V-ATPase a déjà reçu l'attention de l'équipe de Gisou van der Goot, qui a conclu que l'association de ce complexe aux DRMs augmente l'activité de pompage en promouvant le couplage V1-V0 (Lafourcade et al., 2008). Leurs résultats indiquent aussi que le ratio V1/V0 augmente durant la maturation des endosomes. Sur le phagosome, nous observons aussi un accroissement global dans le ratio V1/V0, mais plus particulièrement, nous voyons un enrichissement en sous-unités des deux complexes dans les DRMs. Toutes les sous-unités de cette pompe augmentent sur le phagosome durant la maturation. Les sous-unités D à H augmentent et demeurent associées à la partie non-radeau tandis que les sous-unités a1, a3, et d de V0 ainsi que la sous-unité accessoire S1 sont hautement enrichies dans les DRMs, surtout à 30/240 (chapitre IV, table1).

Complexe de l'exocyste

Le complexe de l'exocyste est composé de 8 protéines (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, et Exo84) et joue un rôle dans le trafic vésiculaire, principalement dans la liaison à des vésicules et dans leur ciblage vers la membrane plasmique où ces

vésicules fusionnent. Malgré qu'aucune de ces protéines n'ait été identifiée sur le phagosome de la souris, une autre étude protéomique de notre laboratoire a montré que ce complexe est présent sur les phagosomes de drosophiles (Stuart et al., 2007). Pour renforcer les résultats de l'étude effectuée par nos collègues, nous avons vérifié la présence des protéines Sec6 et Sec8 par immunobuvardage sur nos préparations de phagosomes de souris. Il s'est finalement avéré que ces deux protéines aussi étaient présentes sur les phagosomes murins avec des cinétiques semblables à celles observées chez la mouche (article IV, en annexe, figure 4B).

Remodelage de l'actine

Notre liste protéomique révèle 30 protéines impliquées dans le cytosquelette d'actine, comprenant les sous-unités alpha, bêta et gamma de l'actine ainsi que des protéines accessoires. La majorité de ces protéines ne semblent pas du tout associées aux radeaux membranaires puisqu'aucun de leurs peptides n'a été détecté dans les DRMs précoces. En ajoutant les autres protéines du cytosquelette (tubuline, myosine, etc.) que nous avons trouvées sur le phagosome, nous avons une liste de 47 composants dont 16 sont associés aux DRMs. Sur les phagosomes intermédiaires, il y a un grand regroupement de protéines comme filamine et coronine, permettant la liaison des filaments d'actine à la membrane du phagosome. Notons aussi la présence de l'Intégrine b1, aussi à son maximum à 30/30 et qui est reconnue comme un récepteur membranaire liant la filamine (Legate and Fassler, 2009). La moésine, aussi impliquée dans la liaison de la F-actine à la membrane est, quant à elle, associée aux DRMs. Toujours sur le phagosome intermédiaire, nombre de protéines de liaison à l'actine qui permettent la formation de réseaux (MACF1, Actinine- α , Arp 2/3-4, IQGAP-1, Taline-1) ou qui régulent la polymérisation (Cap 1, Cap Z β) sont à leur maximum. On retrouve aussi des protéines complémentaires dans les phagosomes intermédiaires, mais celles-ci ont leur maximum d'abondance plus tard (Actinine- β , Arp2/3-5, Cap Z α).

En regardant les changements qui s'opèrent sur le phagosome plus tardif à propos des protéines du cytosquelette d'actine, il semble que l'ancrage des filaments d'actine provienne des radeaux lipidiques. En effet, pour le temps 30/240, les protéines faisant le pont entre la membrane et la F-actine sont majoritairement dans les DRMs. Le récepteur CD44 qui est enrichi dans les DRMs tardifs est connu pour lier l'actine par l'intermédiaire d'eitrine que l'on a aussi identifiée sur le phagosome tardif. Cofiline-1, Profiline-1 et Formine-like 1 ont toutes été impliquées dans la liaison de l'actine et nous les avons retrouvées dans les DRMs (Michelot et al., 2007). Même les chaînes lourdes et légères de la myosine ont été identifiées dans les DRMs des phagolysosomes avec des ratios d'enrichissement importants.

Les fonctions cellulaires altérées par le LPG sont dépendantes des radeaux membranaires

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le parasite *Leishmania* possède des moyens pour inhiber plusieurs aspects de la phagocytose. Un des premiers effets de *Leishmania* sur le phagosome ayant été décrit est l'inhibition du remodelage de l'actine, qui permet de désassembler le manteau d'actine recouvrant le phagosome qui vient de se former. La présence de *Leishmania* promastigote provoque en fait une accumulation anormale de F-actine sur le phagosome, ce qui empêche ce dernier de poursuivre sa maturation (Lodge and Descoteaux, 2008). La protéine Cdc42 reste plus longtemps associée au phagosome en présence de la molécule LPG de *Leishmania*. De plus Arp2/3, WASP, α -actinin, Myosin II et Nck sont aussi retenues sur les phagosomes lorsque du LPG est présent dans le phagosome. Cdc42 joue un rôle central dans l'accumulation de la F-actine puisque l'expression d'un mutant dominant-négatif de Cdc42 empêche l'accumulation de la F-actine ainsi que la rétention de WASP et de la myosine (Lodge and Descoteaux, 2005). Puisque plusieurs de ces protéines se trouvent dans les DRMs, il se peut que leur dérégulation soit causée par la déstabilisation des radeaux membranaires que nous avons démontrée au chapitre III. Un mécanisme pouvant expliquer le maintien de l'activité de Cdc42 sur le phagosome

serait que le LPG active une RhoGEF spécifique à Cdc42 ou inhibe une de ses RhoGAP. Il se trouve aussi que RhoGEF 2 est associée aux DRMs précoces.

Normalement le lipide PI(4,5)P₂, qui est présent sur le phagosome lors de sa formation, s'en détache peu après l'internalisation. Ce retrait de PI(4,5)P₂ (par hydrolyse) déclenche le désassemblage de la F-actine autour du phagosome (Scott et al., 2005). Lorsqu'il y a du LPG dans le phagosome, les radeaux membranaires sont dispersés, et il se peut que cela empêche l'hydrolyse du PI(4,5)P₂; et que, par conséquent, cela empêche le désassemblage du manteau d'actine. Conformément à cet énoncé, il a été démontré que certaines protéines possédant un ancrage acyle pouvaient recruter le PIP2 aux microdomaines lipidiques (Tong et al., 2008).

L'assemblage de la NADPH oxydase fait aussi partie des mécanismes inhibés par le LPG de *Leishmania* (Lodge et al., 2006). Nous avons déjà mentionné que notre analyse protéomique a permis d'identifier deux sous-unités (p22phox et gp91phox) et plusieurs régulateurs de ce complexe qui sont présents dans les DRMs des phagosomes. La désorganisation des radeaux lipidiques par le LPG serait l'explication la plus simple pour expliquer cet effet.

L'induction MyD88 dépendante de l'interleukine 1 (IL-1) est inhibée par le LPG dans un processus qui implique vraisemblablement les *Toll-like receptors* (TLRs) (Olivier et al., 2005). Le LPG a aussi été impliqué dans l'inhibition de la production d'IL-12, cette fois par une interaction avec le récepteur Fcγ dont l'effet de répression sur l'IL-12 a été démontré (Sutterwala et al., 1997). Le LPG aurait aussi un effet sur l'IL-10, et ce serait aussi suite à une interaction avec le Fcγ. Notre hypothèse du chapitre III, voulant que l'effet pléiotropique de LPG soit expliqué par la désorganisation des radeaux membranaires qui inhibe la fonction des protéines qui s'y trouvent, est validée de nouveau par la présence de TLR7 et Fcγ dans les DRMs du phagosome.

Le LPG est aussi impliqué dans une rapide élévation de Ca^{2+} intracellulaire. Se pourrait-il que ce soit causé par les trois transporteurs de Ca^{2+} retrouvés dans les DRMs du phagosome (PMCA1, SERCA2, P-type Atpase)? *Leishmania* peut aussi inhiber la voie de signalisation JAK2/STAT1 et ce processus d'inactivation serait fonction de l'activation de phosphotyrosine phosphatases (PTP), particulièrement SHP-1 (Blanchette, 1999), qui fait aussi partie de la liste des protéines insolubles du phagosome. De plus, l'induction de SHP-1 par *Leishmania* serait essentielle pour l'inhibition de la génération d'oxyde nitrique (Forget et al., 2006).

Il a finalement été démontré que des antigènes solubles de *Leishmania* permettent au parasite d'augmenter l'expression de P-gp (ABCB1) et de MRP1 (ABCC1), ce qui rendrait le parasite capable de résister à l'antimoine destiné à soigner la leishmaniose viscérale (Mookerjee Basu et al., 2008). Cette modulation de ces deux transporteurs ABC pourrait aussi être expliquée par leur présence dans les DRMs.

La composition en phospholipides des phagosomes est distincte de celle de la cellule

Dans l'article du chapitre III, nous avons choisi d'étoffer notre cartographie protéomique du phagosome en ajoutant une analyse lipidomique. Nous sommes la première équipe à avoir entrepris de faire un atlas complet des phospholipides du phagosome. La spectrométrie de masse a été utilisée pour identifier 7 différentes classes de phospholipides : phosphatidylcholine (PC), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG), acide phosphatidique (PA) et sphingomyéline (SM). Ces classes de phospholipides, identifiables par leur groupement polaire distinctif, se sous-divisent en de nombreuses espèces ayant des chaînes d'acides gras de différentes longueurs et comportant plus ou moins d'insaturations. Notre étude a pu déterminer la présence de 124 espèces de phospholipides dans les phagosomes. De cette étude préliminaire sur la composition des lipides de la membrane phagosomiale, nous pouvons d'abord retenir que la composition lipidique des phagosomes ressemble grandement à celle de la cellule

entière en ce qui concerne le ratio des classes de phospholipides. Cependant, en regardant les espèces dominantes pour chaque classe, il apparaît qu'elles diffèrent parfois entre la cellule et les phagosomes. Par exemple, les deux espèces majoritaires de la phosphatidylcholine dans le phagosome, PC (30 :3) et PC (36 :4), sont les 12^e et 10^e en importance parmi les phospholipides totaux de la cellule. Les phosphatidyléthanolamine ainsi que les acide phosphatidiques sont aussi des cas où les espèces ne sont pas proportionnelles entre les phagosomes et l'ensemble des membranes de la cellule (voir Figure 6 de l'article II).

Grâce à nos données sur la composition en phospholipides tout au long de la maturation des phagosomes, nous avons constaté que la composition en phospholipides du phagosome n'est pas statique. Les changements les plus importants sont une diminution en PS et en PE ainsi qu'une augmentation en PG (voir Figure 7 de l'article II).

Pour cette étude préliminaire des lipides de la membrane, nous nous sommes concentrés sur les phospholipides facilement ionisables et qui sont détectés par le spectromètre de masse sans prétraitements, soit les PC, PS, PI, PE, PG et PA. Nous avons très peu détecté la sphingomyéline et nous n'en avons donc pas parlé dans notre discussion. Les PA étaient détectables dans le mode négatif d'ionisation mais les écart-types très grands nous interdisent d'analyser leur variation dans le temps sur les phagosomes. Globalement nos résultats montrent que la quantité totale de phospholipides par phagosomes reste stable (Fig. 7 article II). Il est intéressant de constater que, entre les phagosomes précoces (15/0) et tardifs (30/240), la diminution de 6% des PS et la diminution de 5% des PE sont compensées par l'augmentation de 11% des PG.

Malheureusement, nous n'avons pas réussi à analyser les phospholipides des DRMs purifiés, nous avons donc analysé le phagosome entier. La raison de cette difficulté à analyser les DRMs semble être contamination inévitable par le Triton X-100. En effet, ce détergent utilisé pour séparer les DRMs du reste de la membrane phagosomiale a

une structure amphipatique très semblable aux phospholipides, et ceci a pour effet de masquer le signal des vrais phospholipides.

Outre le cholestérol et la sphingomyéline, la littérature sur les radeaux membranaires ne décrit pas la teneur en phospholipides de ces microdomaines. Il est documenté que les radeaux sont enrichis de phospholipides saturés (Fridriksson et al., 1999; Simons and Toomre, 2000) mais il n'y a pas d'études rapportant une plus grande concentration d'une ou de plusieurs des principales classes de phospholipides. Nous ne pouvons pas conclure que les changements de phospholipides mis en évidence au cours de la maturation du phagosome sont directement attribuables à l'accroissement des radeaux membranaires sur les phagolysosomes. Cependant, cette possibilité sera très intéressante à vérifier dans le futur. Il faudra passer par dessus les obstacles que nous avons rencontrés pour analyser les phospholipides des DRMs en parallèle à l'analyse des phagosomes entiers. De plus, il serait opportun d'ajouter l'analyse du cholestérol aux futures études lipidomiques, malgré la plus grande difficulté technique que pose ce lipide. Une alternative à la spectrométrie de masse pour quantifier le cholestérol serait les ensembles de dosage enzymatiques qui sont disponibles depuis quelques temps sur le marché.

Conclusion

Les travaux du chapitre III (article I) de cette thèse ont permis de démontrer que la molécule LPG du parasite *Leishmania donovani* est le facteur de virulence nécessaire et suffisant à sa survie dans le phagosome. Nos résultats démontrent que c'est en désorganisant les radeaux membranaires déjà formés ou en inhibant le recrutement de nouveaux radeaux sur le phagosome que le LPG joue son rôle. L'étude du chapitre IV (article II) est la première analyse protéomique et lipidomique spatio-temporelle du phagosome, c'est-à-dire qu'elle tient compte à la fois de la maturation et des sous-domaines du phagosome. Nous avons constaté qu'une fraction importante des protéines du phagosome sont graduellement recrutées dans les DRMs et qu'elles proviennent de deux sources (DSMs du phagosome ou autres vésicules endocytaires).

Nos résultats nous permettent de confirmer de nombreuses fonctions connues du phagosome (fusion membranaire, signalisation, métabolisme, action microbicide, présentation sur les CMH I et II) et de prévoir de nouvelles fonctions pour cette surprenante organelle (transport transmembranaire, biogenèse de corps multivésiculaires, régulation de l'apoptose/autophagie, formation de vésicules de clathrine et remodelage de l'actine). Parmi ces fonctions, plusieurs ont été décrites comme étant inhibées ou modulées par le LPG de *L. donovani*. Nous proposons donc que les nombreux effets de cette molécule de virulence sur les fonctions du phagosome découlent de la déstabilisation des radeaux membranaires des phagosomes, laquelle empêche les protéines de se rassembler correctement et de jouer leurs rôles. L'analyse des phospholipides que nous avons fait en parallèle n'est que le début d'une étude plus poussée mais nous révèle déjà que la membrane du phagosome est distincte du reste des membranes de la cellule et que les lipides qui la compose varient durant la maturation du phagosome.

CHAPITRE VI. BIBLIOGRAPHIE

- Acestor, N., S. Masina, J. Walker, N.G. Saravia, N. Fasel, and M. Quadroni. 2002. Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes. *Proteomics*. 2:877-9.
- Ackerman, A.L., A. Giodini, and P. Cresswell. 2006. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity*. 25:607-17.
- Alberts, B. 2002. Molecular biology of the cell. Garland Science, New York. xxxiv, [1548] p. pp.
- Alexander, J., and D.G. Russell. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol*. 31:175-254.
- Allen, L.A., and A. Aderem. 1996. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med*. 184:627-37.
- Antoine, J.C., E. Prina, T. Lang, and N. Courret. 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol*. 6:392-401.
- Arellano-Reynoso, B., N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A.E. Ciocchini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon, and J.P. Gorvel. 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol*. 6:618-25.
- Arni, S., S.A. Keilbaugh, A.G. Ostermeyer, and D.A. Brown. 1998. Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J Biol Chem*. 273:28478-85.
- Astarie-Dequeker, C., E.N. N'Diaye, V. Le Cabec, M.G. Rittig, J. Prandi, and I. Maridonneau-Parini. 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun*. 67:469-77.
- Babiychuk, E.B., and A. Draeger. 2006. Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem J*. 397:407-16.
- Bae, T.J., M.S. Kim, J.W. Kim, B.W. Kim, H.J. Choo, J.W. Lee, K.B. Kim, C.S. Lee, J.H. Kim, S.Y. Chang, C.Y. Kang, S.W. Lee, and Y.G. Ko. 2004. Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics*. 4:3536-48.
- Bahamonde, M.I., J.M. Fernandez-Fernandez, F.X. Guix, E. Vazquez, and M.A. Valverde. 2003. Plasma membrane voltage-dependent anion channel mediates antiestrogen-activated maxi Cl⁻ currents in C1300 neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 278:33284-9.
- Bantscheff, M., M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, and B. Kuster. 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 389:1017-31.
- Bared, S.M., C. Buechler, A. Boettcher, R. Dayoub, A. Sigruener, M. Grandl, C. Rudolph, A. Dada, and G. Schmitz. 2004. Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells. *Mol Biol Cell*. 15:5399-407.

- Baron, G.S., K. Wehrly, D.W. Dorward, B. Chesebro, and B. Caughey. 2002. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *EMBO J.* 21:1031-40.
- Baumann, C.A., V. Ribon, M. Kanzaki, D.C. Thurmond, S. Mora, S. Shigematsu, P.E. Bickel, J.E. Pessin, and A.R. Saltiel. 2000. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature.* 407:202-7.
- Bente, M., S. Harder, M. Wiesgigl, J. Heukeshoven, C. Gelhaus, E. Krause, J. Clos, and I. Bruchhaus. 2003. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics.* 3:1811-29.
- Benting, J., A. Rietveld, I. Ansorge, and K. Simons. 1999. Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. *FEBS Lett.* 462:47-50.
- Beverley, S.M., and S.J. Turco. 1998. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol.* 6:35-40.
- Beyenbach, K.W., and H. Wieczorek. 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol.* 209:577-89.
- Bickel, P.E. 2002. Lipid rafts and insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E1-E10.
- Bickel, P.E., P.E. Scherer, J.E. Schnitzer, P. Oh, M.P. Lisanti, and H.F. Lodish. 1997. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem.* 272:13793-802.
- Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K.A. Siminovitch, and M. Olivier. 1999. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol.* 29:3737-44.
- Bodman-Smith, K.B., M. Mbuchi, F.J. Culley, P.A. Bates, and J.G. Raynes. 2002. C-reactive protein-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses. *Parasite Immunol.* 24:447-54.
- Bokoch, G.M. 2005. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol.* 15:163-71.
- Boukh-Viner, T., T. Guo, A. Alexandrian, A. Cerracchio, C. Gregg, S. Haile, R. Kyskan, S. Milijevic, D. Oren, J. Solomon, V. Wong, J.M. Nicaud, R.A. Rachubinski, A.M. English, and V.I. Titorenko. 2005. Dynamic ergosterol- and ceramide-rich domains in the peroxisomal membrane serve as an organizing platform for peroxisome fusion. *J Cell Biol.* 168:761-73.
- Brittingham, A., C.J. Morrison, W.R. McMaster, B.S. McGwire, K.P. Chang, and D.M. Mosser. 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 155:3102-11.
- Brown, D. 1994. GPI-anchored proteins and detergent-resistant membrane domains. *Braz J Med Biol Res.* 27:309-15.
- Brown, G.D., and S. Gordon. 2001. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* 413:36-7.

- Brugger, B., B. Glass, P. Haberkant, I. Leibrecht, F.T. Wieland, and H.G. Krausslich. 2006. The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:2641-6.
- Burkhalter, J., H. Fiumelli, J.D. Erickson, and J.L. Martin. 2007. A critical role for system A amino acid transport in the regulation of dendritic development by brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Biol Chem*. 282:5152-9.
- Burlak, C., A.R. Whitney, D.J. Mead, T. Hackstadt, and F.R. Deleo. 2006. Maturation of human neutrophil phagosomes includes incorporation of molecular chaperones and endoplasmic reticulum quality control machinery. *Mol Cell Proteomics*. 5:620-34.
- Butcher, B.A., S.J. Turco, B.A. Hilty, P.F. Pimenta, M. Panunzio, and D.L. Sacks. 1996. Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *J Biol Chem*. 271:20573-9.
- Caron, E., and A. Hall. 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*. 282:1717-21.
- Caron, E., A.J. Self, and A. Hall. 2000. The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol*. 10:974-8.
- Chamberlain, L.H., and G.W. Gould. 2002. The vesicle- and target-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localized in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *J Biol Chem*. 277:49750-4.
- Channon, J.Y., and J.M. Blackwell. 1985. A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. II. Possible mechanisms involved in protective H₂O₂ scavenging. *Parasitology*. 91 (Pt 2):207-17.
- Chatterjee, S., and S. Mayor. 2001. The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci*. 58:1969-87.
- Chau, B.N., E.H. Cheng, D.A. Kerr, and J.M. Hardwick. 2000. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell*. 6:31-40.
- Chen, X., A. Jen, A. Warley, M.J. Lawrence, P.J. Quinn, and R.J. Morris. 2009. Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition. *Biochem J*. 417:525-33.
- Choudhuri, S., and C.D. Klaassen. 2006. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol*. 25:231-59.
- Christie, W.W. 2008. The Lipid Library.
- Chung, S.W., X. Liu, A.A. Macias, R.M. Baron, and M.A. Perrella. 2008. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *J Clin Invest*. 118:239-47.
- Cohen-Freue, G., T.R. Holzer, J.D. Forney, and W.R. McMaster. 2007. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 37:1077-86.
- Collins, M.D. 2008. Interleaflet coupling mechanisms in bilayers of lipids and cholesterol. *Biophys J*. 94:L32-4.

- Courret, N., C. Frehel, N. Gouhier, M. Pouchelet, E. Prina, P. Roux, and J.C. Antoine. 2002. Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci.* 115:2303-16.
- Culley, F.J., R.A. Harris, P.M. Kaye, K.P. McAdam, and J.G. Raynes. 1996. C-reactive protein binds to a novel ligand on Leishmania donovani and increases uptake into human macrophages. *J Immunol.* 156:4691-6.
- Cunningham, O., A. Andolfo, M.L. Santovito, L. Iuzzolino, F. Blasi, and N. Sidenius. 2003. Dimerization controls the lipid raft partitioning of uPAR/CD87 and regulates its biological functions. *EMBO J.* 22:5994-6003.
- Czibener, C., N.M. Sherer, S.M. Becker, M. Pypaert, E. Hui, E.R. Chapman, W. Mothes, and N.W. Andrews. 2006. Ca²⁺ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *J Cell Biol.* 174:997-1007.
- Denny, P.W., M.C. Field, and D.F. Smith. 2001. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett.* 491:148-53.
- Denny, P.W., D. Goulding, M.A. Ferguson, and D.F. Smith. 2004. Sphingolipid-free Leishmania are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. *Mol Microbiol.* 52:313-27.
- Dermine, J.F., S. Duclos, J. Garin, F. St-Louis, S. Rea, R.G. Parton, and M. Desjardins. 2001. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem.* 276:18507-12.
- Dermine, J.F., G. Goyette, M. Houde, S.J. Turco, and M. Desjardins. 2005. Leishmania donovani lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol.* 7:1263-70.
- Dermine, J.F., S. Scianimanico, C. Prive, A. Descoteaux, and M. Desjardins. 2000. Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* 2:115-26.
- Descoteaux, A., Y. Luo, S.J. Turco, and S.M. Beverley. 1995. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of Leishmania. *Science.* 269:1869-72.
- Descoteaux, A., S.J. Turco, D.L. Sacks, and G. Matlashewski. 1991. Leishmania donovani lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol.* 146:2747-53.
- Desjardins, M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol.* 5:183-6.
- Desjardins, M., J.E. Celis, G. van Meer, H. Dieplinger, A. Jahraus, G. Griffiths, and L.A. Huber. 1994a. Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem.* 269:32194-200.
- Desjardins, M., and A. Descoteaux. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 185:2061-8.
- Desjardins, M., L.A. Huber, R.G. Parton, and G. Griffiths. 1994b. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol.* 124:677-88.

- Desjardins, M., N.N. Nzala, R. Corsini, and C. Rondeau. 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 (Pt 18):2303-14.
- Duclos, S., R. Corsini, and M. Desjardins. 2003. Remodeling of endosomes during lysosome biogenesis involves 'kiss and run' fusion events regulated by rab5. *J Cell Sci.* 116:907-18.
- Duclos, S., and M. Desjardins. 2000. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* 2:365-77.
- Eilam, Y., J. El-On, and D.T. Spira. 1985. Leishmania major: excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. *Exp Parasitol.* 59:161-8.
- El-On, J., D.J. Bradley, and J.C. Freeman. 1980. Leishmania donovani: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. *Exp Parasitol.* 49:167-74.
- El Fakhry, Y., M. Ouellette, and B. Papadopoulou. 2002. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in Leishmania infantum. *Proteomics.* 2:1007-17.
- Endress, E., H. Heller, H. Casalta, M.F. Brown, and T.M. Bayerl. 2002. Anisotropic motion and molecular dynamics of cholesterol, lanosterol, and ergosterol in lecithin bilayers studied by quasi-elastic neutron scattering. *Biochemistry.* 41:13078-86.
- Eskelinen, E.L., Y. Tanaka, and P. Saftig. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13:137-45.
- Ezekowitz, R.A., K. Sastry, P. Bailly, and A. Warner. 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.* 172:1785-94.
- Forget, G., D.J. Gregory, L.A. Whitcombe, and M. Olivier. 2006. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in Leishmania donovani-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun.* 74:6272-9.
- Franke, E.D., P.B. McGreevy, S.P. Katz, and D.L. Sacks. 1985. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant Leishmania promastigotes. *J Immunol.* 134:2713-8.
- Fridriksson, E.K., P.A. Shipkova, E.D. Sheets, D. Holowka, B. Baird, and F.W. McLafferty. 1999. Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry.* 38:8056-63.
- Gagescu, R., N. Demaurex, R.G. Parton, W. Hunziker, L.A. Huber, and J. Gruenberg. 2000. The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell.* 11:2775-91.
- Gagnon, E., S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P.H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J.J. Bergeron, and M. Desjardins. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell.* 110:119-31.

- Gargalovic, P., and L. Dory. 2001. Caveolin-1 and caveolin-2 expression in mouse macrophages. High density lipoprotein 3-stimulated secretion and a lack of significant subcellular co-localization. *J Biol Chem.* 276:26164-70.
- Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J.F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau, and M. Desjardins. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol.* 152:165-80.
- Gatfield, J., and J. Pieters. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* 288:1647-50.
- George, S., M.D. Nelson, N. Dollahon, and A. Bamezai. 2006. A novel approach to examining compositional heterogeneity of detergent-resistant lipid rafts. *Immunol Cell Biol.* 84:192-202.
- Ghazizadeh, S., and H.B. Fleit. 1994. Tyrosine phosphorylation provides an obligatory early signal for Fc gamma RII-mediated endocytosis in the monocytic cell line THP-1. *J Immunol.* 152:30-41.
- Ghiran, I., S.F. Barbashov, L.B. Klickstein, S.W. Tas, J.C. Jensenius, and A. Nicholson-Weller. 2000. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med.* 192:1797-808.
- Gilchrist, A., C.E. Au, J. Hiding, A.W. Bell, J. Fernandez-Rodriguez, S. Lesimple, H. Nagaya, L. Roy, S.J. Gosline, M. Hallett, J. Paiement, R.E. Kearney, T. Nilsson, and J.J. Bergeron. 2006. Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell.* 127:1265-81.
- Giorgione, J.R., S.J. Turco, and R.M. Epand. 1996. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11634-9.
- Gkantiragas, I., B. Brugger, E. Stuken, D. Kaloyanova, X.Y. Li, K. Lohr, F. Lottspeich, F.T. Wieland, and J.B. Helms. 2001. Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol Biol Cell.* 12:1819-33.
- Gombos, I., Z. Bacso, C. Detre, H. Nagy, K. Goda, M. Andrasfalvy, G. Szabo, and J. Matko. 2004. Cholesterol sensitivity of detergent resistance: a rapid flow cytometric test for detecting constitutive or induced raft association of membrane proteins. *Cytometry A.* 61:117-26.
- Goncalves, R.P., N. Buzhysnsky, and S. Scheuring. 2008. Mini review on the structure and supramolecular assembly of VDAC. *J Bioenerg Biomembr.* 40:133-8.
- Gotthardt, D., V. Blancheteau, A. Bosserhoff, T. Ruppert, M. Delorenzi, and T. Soldati. 2006. Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics.* 5:2228-43.
- Grosshans, B.L., D. Ortiz, and P. Novick. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11821-7.
- Groves, E., A.E. Dart, V. Covarelli, and E. Caron. 2008. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 65:1957-76.
- Guermonez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert, and S. Amigorena. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 425:397-402.

- Hackam, D.J., O.D. Rotstein, W.J. Zhang, N. Demaurex, M. Woodside, O. Tsai, and S. Grinstein. 1997. Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na⁺/H⁺ exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and vacuolar-type H⁺-atpases. *J Biol Chem.* 272:29810-20.
- Hanzal-Bayer, M.F., and J.F. Hancock. 2007. Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett.* 581:2098-104.
- Harder, T., and K.R. Engelhardt. 2004. Membrane domains in lymphocytes - from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic.* 5:265-75.
- Harel, A., F. Wu, M.P. Mattson, C.M. Morris, and P.J. Yao. 2008. Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. *Traffic.* 9:417-29.
- Hauck, C.R., H. Grassme, J. Bock, V. Jendrossek, K. Ferlinz, T.F. Meyer, and E. Gulbins. 2000. Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Lett.* 478:260-6.
- Herwaldt, B.L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* 354:1191-9.
- Holm, A., K. Tejle, K.E. Magnusson, A. Descoteaux, and B. Rasmusson. 2001. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol.* 3:439-47.
- Homans, S.W., A. Mehlert, and S.J. Turco. 1992. Solution structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry.* 31:654-61.
- Hoppe, A.D., and J.A. Swanson. 2004. Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Mol Biol Cell.* 15:3509-19.
- Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M.F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks, and M. Desjardins. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature.* 425:402-6.
- Houslay, M.D. 1991. 'Crosstalk': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur J Biochem.* 195:9-27.
- Huang, C., and S.J. Turco. 1993. Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 268:24060-6.
- Huppa, J.B., and M.M. Davis. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 3:973-83.
- Huynh, K.K., E.L. Eskelinen, C.C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig, and S. Grinstein. 2007a. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 26:313-24.
- Huynh, K.K., J.G. Kay, J.L. Stow, and S. Grinstein. 2007b. Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology (Bethesda).* 22:366-72.
- Ichioka, F., R. Kobayashi, K. Katoh, H. Shibata, and M. Maki. 2008. Brox, a novel farnesylated Bro1 domain-containing protein that associates with charged multivesicular body protein 4 (CHMP4). *FEBS J.* 275:682-92.
- Ikonen, E., S. Heino, and S. Lusa. 2004. Caveolins and membrane cholesterol. *Biochem Soc Trans.* 32:121-3.
- Ilg, T., M. Demar, and D. Harbecke. 2001. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J Biol Chem.* 276:4988-97.

- Ilg, T., Y.D. Stierhof, M. Wiese, M.J. McConville, and P. Overath. 1994. Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*. *Parasitology*. 108 Suppl:S63-71.
- Jacobson, K., and C. Dietrich. 1999. Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.* 9:87-91.
- Jancic, C., A. Savina, C. Wasmeier, T. Tolmachova, J. El-Benna, P.M. Dang, S. Pascolo, M.A. Gougerot-Pocidallo, G. Raposo, M.C. Seabra, and S. Amigorena. 2007. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol.* 9:367-78.
- Janes, P.W., S.C. Ley, and A.I. Magee. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol.* 147:447-61.
- Jefferies, K.C., D.J. Cipriano, and M. Forgac. 2008. Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch Biochem Biophys.* 476:33-42.
- Jolly, C., and Q.J. Sattentau. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J Virol.* 79:12088-94.
- Joly, E. 2004. Hypothesis: could the signalling function of membrane microdomains involve a localized transition of lipids from liquid to solid state? *BMC Cell Biol.* 5:3.
- Jones, S.L., U.G. Knaus, G.M. Bokoch, and E.J. Brown. 1998. Two signaling mechanisms for activation of alphaM beta2 avidity in polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem.* 273:10556-66.
- Junqueira, L.C.U., J. Carneiro, and A.N. Contopoulos. 1975. Basic histology. In A Concise medical library for practitioner and student. Lange Medical Publications, Los Altos, Calif. v.
- Jutras, I., and M. Desjardins. 2005. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:511-27.
- Jutras, I., M. Houde, N. Currier, J. Boulais, S. Duclos, S. LaBoissiere, E. Bonneil, P. Kearney, P. Thibault, E. Paramithiotis, P. Hugo, and M. Desjardins. 2008. Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics.* 7:697-715.
- Jutras, I., A. Laplante, J. Boulais, S. Brunet, G. Thinakaran, and M. Desjardins. 2005. Gamma-secretase is a functional component of phagosomes. *J Biol Chem.* 280:36310-7.
- Kabouridis, P.S., and E.C. Jury. 2008. Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity. *FEBS Lett.* 582:3711-8.
- Kaneshiro, E.S., M. Gottlieb, and D.M. Dwyer. 1982. Cell surface origin of antigens shed by *Leishmania donovani* during growth in axenic culture. *Infect Immun.* 37:558-67.
- Kaplan, G. 1977. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol.* 6:797-807.
- Kenworthy, A.K., B.J. Nichols, C.L. Remmert, G.M. Hendrix, M. Kumar, J. Zimmerberg, and J. Lippincott-Schwartz. 2004. Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol.* 165:735-46.
- Kiefer, F., J. Brumell, N. Al-Alawi, S. Latour, A. Cheng, A. Veillette, S. Grinstein, and T. Pawson. 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol.* 18:4209-20.

- King, D.L., and S.J. Turco. 1988. A ricin agglutinin-resistant clone of *Leishmania donovani* deficient in lipophosphoglycan. *Mol Biochem Parasitol.* 28:285-93.
- Kinoshita, T., M. Fujita, and Y. Maeda. 2008. Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. *J Biochem.* 144:287-94.
- Kirkham, M., and R.G. Parton. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta.* 1745:273-86.
- Kitamura, H., H. Kamon, S. Sawa, S.J. Park, N. Katunuma, K. Ishihara, M. Murakami, and T. Hirano. 2005. IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity.* 23:491-502.
- Kyei, G.B., I. Vergne, J. Chua, E. Roberts, J. Harris, J.R. Junutula, and V. Deretic. 2006. Rab14 is critical for maintenance of Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. *EMBO J.* 25:5250-9.
- Lafont, F., G. Tran Van Nhieu, K. Hanada, P. Sansonetti, and F.G. van der Goot. 2002. Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *EMBO J.* 21:4449-57.
- Lafourcade, C., K. Sobo, S. Kieffer-Jaquinod, J. Garin, and F.G. van der Goot. 2008. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS ONE.* 3:e2758.
- Lagerholm, B.C., G.E. Weinreb, K. Jacobson, and N.L. Thompson. 2005. Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu Rev Phys Chem.* 56:309-36.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, and A. Dautry-Varsat. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell.* 7:661-71.
- Lang, T. 2007. SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol.* 585:693-8.
- Lang, T., R. Hellio, P.M. Kaye, and J.C. Antoine. 1994. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci.* 107 (Pt 8):2137-50.
- Lawe, D.C., A. Chawla, E. Merithew, J. Dumas, W. Carrington, K. Fogarty, L. Lifshitz, R. Tuft, D. Lambright, and S. Corvera. 2002. Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *J Biol Chem.* 277:8611-7.
- Leemans, J.C., S. Florquin, M. Heikens, S.T. Pals, R. van der Neut, and T. Van Der Poll. 2003. CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest.* 111:681-9.
- Legate, K.R., and R. Fassler. 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci.* 122:187-98.
- Leite, D.F., J. Echevarria-Lima, J.B. Calixto, and V.M. Rumjanek. 2007a. Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitrite production by the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol.* 73:665-74.
- Leite, D.F., J. Echevarria-Lima, S.C. Ferreira, J.B. Calixto, and V.M. Rumjanek. 2007b. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. *J Leukoc Biol.* 82:630-7.

- Lemasters, J.J., and E. Holmuhamedov. 2006. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta*. 1762:181-90.
- Lennon-Dumenil, A.M., A.H. Bakker, R. Maehr, E. Fiebiger, H.S. Overkleeft, M. Roseblatt, H.L. Ploegh, and C. Lagaudriere-Gesbert. 2002. Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med*. 196:529-40.
- Leray, C. 2009. CYBERLIPID CENTER.
- Lichtenberg, D., F.M. Goni, and H. Heerklotz. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci*. 30:430-6.
- Lingrel, J.B., and T. Kuntzweiler. 1994. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Biol Chem*. 269:19659-62.
- Lingwood, D., J. Ries, P. Schwille, and K. Simons. 2008. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:10005-10.
- Lingwood, D., and K. Simons. 2007. Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat Protoc*. 2:2159-65.
- Liu, H., R.G. Sadygov, and J.R. Yates, 3rd. 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*. 76:4193-201.
- Lo, S.K., L. Bovis, R. Matura, B. Zhu, S. He, H. Lum, S.J. Turco, and J.L. Ho. 1998. Leishmania lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J Immunol*. 160:1857-65.
- Lodge, R., and A. Descoteaux. 2005. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. *Clin Immunol*. 114:256-65.
- Lodge, R., and A. Descoteaux. 2008. Leishmania invasion and phagosome biogenesis. *Subcell Biochem*. 47:174-81.
- Lodge, R., T.O. Diallo, and A. Descoteaux. 2006. Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol*. 8:1922-31.
- Lodish, H.F. 2003. Molecular cell biology. W.H. Freeman and Company, New York. xxxiii, 973 , [79] p. pp.
- Lu, S., M. Ouyang, J. Seong, J. Zhang, S. Chien, and Y. Wang. 2008. The spatiotemporal pattern of Src activation at lipid rafts revealed by diffusion-corrected FRET imaging. *PLoS Comput Biol*. 4:e1000127.
- Ma, D., D.G. Russell, S.M. Beverley, and S.J. Turco. 1997. Golgi GDP-mannose uptake requires Leishmania LPG2. A member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. *J Biol Chem*. 272:3799-805.
- Macdonald, J.L., and L.J. Pike. 2005. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res*. 46:1061-7.
- Madore, N., K.L. Smith, C.H. Graham, A. Jen, K. Brady, S. Hall, and R. Morris. 1999. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J*. 18:6917-26.

- Maeda, Y., Y. Tashima, T. Houjou, M. Fujita, T. Yoko-o, Y. Jigami, R. Taguchi, and T. Kinoshita. 2007. Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. *Mol Biol Cell*. 18:1497-506.
- Mairhofer, M., M. Steiner, W. Mosgoeller, R. Prohaska, and U. Salzer. 2002. Stomatin is a major lipid-raft component of platelet alpha granules. *Blood*. 100:897-904.
- Maiuri, M.C., G. Le Toumelin, A. Criollo, J.C. Rain, F. Gautier, P. Juin, E. Tasdemir, G. Pierron, K. Troulinaki, N. Tavernarakis, J.A. Hickman, O. Geneste, and G. Kroemer. 2007a. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*. 26:2527-39.
- Maiuri, M.C., E. Zalckvar, A. Kimchi, and G. Kroemer. 2007b. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:741-52.
- Malinska, K., J. Malinsky, M. Opekarova, and W. Tanner. 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell*. 14:4427-36.
- Man, P., P. Novak, M. Cebecauer, O. Horvath, A. Fiserova, V. Havlicek, and K. Bezouska. 2005. Mass spectrometric analysis of the glycosphingolipid-enriched microdomains of rat natural killer cells. *Proteomics*. 5:113-22.
- Manes, S., G. del Real, and A.C. Martinez. 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol*. 3:557-68.
- Marchand, S., A. Devillers-Thiery, S. Pons, J.P. Changeux, and J. Cartaud. 2002. Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J Neurosci*. 22:8891-901.
- McIntosh, T.J., S.A. Simon, D. Needham, and C.H. Huang. 1992. Interbilayer interactions between sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Biochemistry*. 31:2020-4.
- McKean, P.G., P.W. Denny, E. Knuepfer, J.K. Keen, and D.F. Smith. 2001. Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. *Cell Microbiol*. 3:511-23.
- McMahon, K.A., M. Zhu, S.W. Kwon, P. Liu, Y. Zhao, and R.G. Anderson. 2006. Detergent-free caveolae proteome suggests an interaction with ER and mitochondria. *Proteomics*. 6:143-52.
- McNeely, T.B., G. Rosen, M.V. Londner, and S.J. Turco. 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem J*. 259:601-4.
- McNeely, T.B., and S.J. Turco. 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol*. 144:2745-50.
- Melkonian, K.A., A.G. Ostermeyer, J.Z. Chen, M.G. Roth, and D.A. Brown. 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem*. 274:3910-7.
- Metzstein, M.M., G.M. Stanfield, and H.R. Horvitz. 1998. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet*. 14:410-6.

- Michelot, A., J. Berro, C. Guerin, R. Boujemaa-Paterski, C.J. Staiger, J.L. Martiel, and L. Blanchoin. 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr Biol.* 17:825-33.
- Miyoshi, H., K.A. Smith, D.E. Mosier, I.M. Verma, and B.E. Torbett. 1999. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.* 283:682-6.
- Mocchetti, I. 2005. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell Mol Life Sci.* 62:2283-94.
- Mookerjee Basu, J., A. Mookerjee, R. Banerjee, M. Saha, S. Singh, K. Naskar, G. Tripathy, P.K. Sinha, K. Pandey, S. Sundar, S. Bimal, P.K. Das, S.K. Choudhuri, and S. Roy. 2008. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in Leishmania Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1080-93.
- Morales-Garcia, M.G., J.J. Fournie, M.M. Moreno-Altamirano, G. Rodriguez-Luna, R.M. Flores, and F.J. Sanchez-Garcia. 2008. A flow-cytometry method for analyzing the composition of membrane rafts. *Cytometry A.* 73:918-25.
- Morris, R., H. Cox, E. Mombelli, and P.J. Quinn. 2004. Rafts, little caves and large potholes: how lipid structure interacts with membrane proteins to create functionally diverse membrane environments. *Subcell Biochem.* 37:35-118.
- Morrow, I.C., S. Rea, S. Martin, I.A. Prior, R. Prohaska, J.F. Hancock, D.E. James, and R.G. Parton. 2002. Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem.* 277:48834-41.
- Mosser, D.M., and A. Brittingham. 1997. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology.* 115 Suppl:S9-23.
- Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell.* 115:377-88.
- Nada, S., A. Hondo, A. Kasai, M. Koike, K. Saito, Y. Uchiyama, and M. Okada. 2009. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *EMBO J.*
- Nagao, E., K.B. Seydel, and J.A. Dvorak. 2002. Detergent-resistant erythrocyte membrane rafts are modified by a Plasmodium falciparum infection. *Exp Parasitol.* 102:57-9.
- Nguyen, D.H., and J.E. Hildreth. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol.* 74:3264-72.
- Nichols, B.J. 2003. GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits. *Curr Biol.* 13:686-90.
- Niedergang, F., E. Colucci-Guyon, T. Dubois, G. Raposo, and P. Chavrier. 2003. ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol.* 161:1143-50.
- Nielsen, E., S. Christoforidis, S. Uttenweiler-Joseph, M. Miaczynska, F. Dewitte, M. Wilm, B. Hoflack, and M. Zerial. 2000. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol.* 151:601-12.

- Nishiya, T., and A.L. DeFranco. 2004. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem.* 279:19008-17.
- Nugent, P.G., S.A. Karsani, R. Wait, J. Tempero, and D.F. Smith. 2004. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol.* 136:51-62.
- Odorizzi, G. 2006. The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci.* 119:3025-32.
- Ogden, C.A., A. deCathelineau, P.R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V.A. Fadok, and P.M. Henson. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 194:781-95.
- Okada, M., C.D. Huston, B.J. Mann, W.A. Petri, Jr., K. Kita, and T. Nozaki. 2005. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* 4:827-31.
- Olivier, M., D.J. Gregory, and G. Forget. 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 18:293-305.
- Ouellette, M., M. Olivier, S. Sato, and B. Papadopoulou. 2003. [Studies on the parasite *Leishmania* in the post-genomic era]. *Med Sci (Paris).* 19:900-9.
- Palecanda, A., J. Paulauskis, E. Al-Mutairi, A. Imrich, G. Qin, H. Suzuki, T. Kodama, K. Tryggvason, H. Koziel, and L. Kobzik. 1999. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J Exp Med.* 189:1497-506.
- Papadopoulos, V., H. Amri, N. Boujrad, C. Cascio, M. Culty, M. Garnier, M. Hardwick, H. Li, B. Vidic, A.S. Brown, J.L. Reversa, J.M. Bernassau, and K. Drieu. 1997. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids.* 62:21-8.
- Parolini, I., M. Sargiacomo, F. Galbiati, G. Rizzo, F. Grignani, J.A. Engelman, T. Okamoto, T. Ikezu, P.E. Scherer, R. Mora, E. Rodriguez-Boulan, C. Peschle, and M.P. Lisanti. 1999. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem.* 274:25718-25.
- Parton, R.G., and J.F. Hancock. 2004. Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* 14:141-7.
- Parton, R.G., M. Hanzal-Bayer, and J.F. Hancock. 2006. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci.* 119:787-96.
- Paulick, M.G., and C.R. Bertozzi. 2008. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry.* 47:6991-7000.
- Peri, F., and C. Nusslein-Volhard. 2008. Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. *Cell.* 133:916-27.
- Pfeiffer, A., A. Bottcher, E. Orso, M. Kapinsky, P. Nagy, A. Bodnar, I. Spreitzer, G. Liebisch, W. Drobnik, K. Gempel, M. Horn, S. Holmer, T. Hartung, G. Multhoff, G. Schutz, H. Schindler, A.J. Ulmer, H. Heine, F. Stelter, C. Schutt,

- G. Rothe, J. Szollosi, S. Damjanovich, and G. Schmitz. 2001. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol.* 31:3153-64.
- Piedrafita, D., L. Proudfoot, A.V. Nikolaev, D. Xu, W. Sands, G.J. Feng, E. Thomas, J. Brewer, M.A. Ferguson, J. Alexander, and F.Y. Liew. 1999. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur J Immunol.* 29:235-44.
- Pike, L.J. 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J.* 378:281-92.
- Pike, L.J. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 47:1597-8.
- Pimenta, P.F., P. Pinto da Silva, D. Rangarajan, D.F. Smith, and D.L. Sacks. 1994a. *Leishmania major*: association of the differentially expressed gene B protein and the surface lipophosphoglycan as revealed by membrane capping. *Exp Parasitol.* 79:468-79.
- Pimenta, P.F., E.M. Saraiva, E. Rowton, G.B. Modi, L.A. Garraway, S.M. Beverley, S.J. Turco, and D.L. Sacks. 1994b. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:9155-9.
- Pimenta, P.F., E.M. Saraiva, and D.L. Sacks. 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol.* 72:191-204.
- Pitt, A., L.S. Mayorga, P.D. Stahl, and A.L. Schwartz. 1992. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest.* 90:1978-83.
- Popik, W., T.M. Alce, and W.C. Au. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol.* 76:4709-22.
- Pralle, A., P. Keller, E.L. Florin, K. Simons, and J.K. Horber. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol.* 148:997-1008.
- Prina, E., J.C. Antoine, B. Wiederanders, and H. Kirschke. 1990. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect Immun.* 58:1730-7.
- Prior, I.A., C. Muncke, R.G. Parton, and J.F. Hancock. 2003. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.* 160:165-70.
- Puentes, S.M., R.P. Da Silva, D.L. Sacks, C.H. Hammer, and K.A. Joiner. 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol.* 145:4311-6.
- Ravetch, J.V., and S. Bolland. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 19:275-90.
- Ray, M., A.A. Gam, R.A. Boykins, and R.T. Kenney. 2000. Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. *J Infect Dis.* 181:1121-8.
- Resh, M.D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1451:1-16.

- Reymann, S., W. Haase, W. Krick, G. Burckhardt, and F.P. Thinner. 1998. Endosomes: another extra-mitochondrial location of type-1 porin/voltage-dependent anion-selective channels. *Pflugers Arch.* 436:478-80.
- Rietveld, A., S. Neutz, K. Simons, and S. Eaton. 1999. Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem.* 274:12049-54.
- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, and M. Zerial. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell.* 122:735-49.
- Roberts, E.A., J. Chua, G.B. Kyei, and V. Deretic. 2006. Higher order Rab programming in phagolysosome biogenesis. *J Cell Biol.* 174:923-9.
- Rogers, L.D., and L.J. Foster. 2007. The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:18520-5.
- Ross, G.D. 2000. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol.* 20:197-222.
- Roy, M.O., R. Leventis, and J.R. Silvius. 2000. Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry.* 39:8298-307.
- Russell, D.G., S. Xu, and P. Chakraborty. 1992. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Cell Sci.* 103 (Pt 4):1193-210.
- Sabharanjak, S., P. Sharma, R.G. Parton, and S. Mayor. 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell.* 2:411-23.
- Sacks, D., and S. Kamhawi. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 55:453-83.
- Sacks, D., and N. Noben-Trauth. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2:845-58.
- Sacks, D.L. 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.* 69:100-3.
- Sacks, D.L., P.F. Pimenta, M.J. McConville, P. Schneider, and S.J. Turco. 1995. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 181:685-97.
- Salzer, U., P. Hinterdorfer, U. Hunger, C. Borken, and R. Prohaska. 2002. Ca⁺⁺-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood.* 99:2569-77.
- Sanjuan, M.A., C.P. Dillon, S.W. Tait, S. Moshiah, F. Dorsey, S. Connell, M. Komatsu, K. Tanaka, J.L. Cleveland, S. Withoff, and D.R. Green. 2007. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature.* 450:1253-7.
- Saxton, M.J., and K. Jacobson. 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 26:373-99.
- Scheiffele, P., A. Rietveld, T. Wilk, and K. Simons. 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem.* 274:2038-44.

- Schlein, Y., L.F. Schnur, and R.L. Jacobson. 1990. Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 84:353-5.
- Schram, V., and T.E. Thompson. 1995. Interdigitation does not affect translational diffusion of lipids in liquid crystalline bilayers. *Biophys J.* 69:2517-20.
- Schulte, T., K.A. Paschke, U. Laessing, F. Lottspeich, and C.A. Stuermer. 1997. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development.* 124:577-87.
- Schwegmann, A., R. Guler, A.J. Cutler, B. Arendse, W.G. Horsnell, A. Flemming, A.H. Kottmann, G. Ryan, W. Hide, M. Leitges, C. Seoghe, and F. Brombacher. 2007. Protein kinase C delta is essential for optimal macrophage-mediated phagosomal containment of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:16251-6.
- Scianimanico, S., M. Desrosiers, J.F. Dermine, S. Meresse, A. Descoteaux, and M. Desjardins. 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol.* 1:19-32.
- Scott, C.C., W. Dobson, R.J. Botelho, N. Coady-Osberg, P. Chavrier, D.A. Knecht, C. Heath, P. Stahl, and S. Grinstein. 2005. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol.* 169:139-49.
- Selkoe, D., and R. Kopan. 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci.* 26:565-97.
- Sengelov, H., L. Kjeldsen, M.S. Diamond, T.A. Springer, and N. Borregaard. 1993. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest.* 92:1467-76.
- Sereno, D., and J.L. Lemesre. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:972-6.
- Sharma, P., R. Varma, R.C. Sarasij, Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, and S. Mayor. 2004. Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell.* 116:577-89.
- Sheets, E.D., G.M. Lee, R. Simson, and K. Jacobson. 1997. Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry.* 36:12449-58.
- Shin, J.S., Z. Gao, and S.N. Abraham. 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science.* 289:785-8.
- Shoshan-Barmatz, V., N. Keinan, and H. Zaid. 2008. Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *J Bioenerg Biomembr.* 40:183-91.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569-72.
- Simons, K., and E. Ikonen. 2000. How cells handle cholesterol. *Science.* 290:1721-6.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:31-9.

- Simons, K., and G. van Meer. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. 27:6197-202.
- Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-31.
- Smart, E.J., Y.S. Ying, C. Mineo, and R.G. Anderson. 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:10104-8.
- Sobota, A., A. Strzelecka-Kiliszek, E. Gladkowska, K. Yoshida, K. Mrozinska, and K. Kwiatkowska. 2005. Binding of IgG-opsonized particles to Fc gamma R is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation. *J Immunol*. 175:4450-7.
- Song, K.S., S. Li, T. Okamoto, L.A. Quilliam, M. Sargiacomo, and M.P. Lisanti. 1996. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem*. 271:9690-7.
- Stauffer, T.P., and T. Meyer. 1997. Compartmentalized IgE receptor-mediated signal transduction in living cells. *J Cell Biol*. 139:1447-54.
- Steinberg, B.E., K.K. Huynh, and S. Grinstein. 2007. Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences. *Biochem Soc Trans*. 35:1083-7.
- Stuart, L.M., J. Boulais, G.M. Charriere, E.J. Hennessy, S. Brunet, I. Jutras, G. Goyette, C. Rondeau, S. Letarte, H. Huang, P. Ye, F. Morales, C. Kocks, J.S. Bader, M. Desjardins, and R.A. Ezekowitz. 2007. A systems biology analysis of the Drosophila phagosome. *Nature*. 445:95-101.
- Stuart, L.M., and R.A. Ezekowitz. 2008. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol*. 8:131-41.
- Sutterwala, F.S., G.J. Noel, R. Clynes, and D.M. Mosser. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med*. 185:1977-85.
- Suzaki, E., H. Kobayashi, Y. Kodama, T. Masujima, and S. Terakawa. 1997. Video-rate dynamics of exocytotic events associated with phagocytosis in neutrophils. *Cell Motil Cytoskeleton*. 38:215-28.
- Swanson, J.A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:639-49.
- Swanson, J.A., M.T. Johnson, K. Beningo, P. Post, M. Mooseker, and N. Araki. 1999. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci*. 112 (Pt 3):307-16.
- Taille, C., J. El-Benna, S. Lanone, M.C. Dang, E. Ogier-Denis, M. Aubier, and J. Boczkowski. 2004. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J Biol Chem*. 279:28681-8.
- Takai, T. 2002. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2:580-92.
- Tardieux, I., P. Webster, J. Ravesloot, W. Boron, J.A. Lunn, J.E. Heuser, and N.W. Andrews. 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*. 71:1117-30.

- Tatulian, S.A., and L.K. Tamm. 2000. Secondary structure, orientation, oligomerization, and lipid interactions of the transmembrane domain of influenza hemagglutinin. *Biochemistry*. 39:496-507.
- Thomas, J.R., R.A. Dwek, and T.W. Rademacher. 1990. Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols. *Biochemistry*. 29:5413-22.
- Tiede, A., I. Bastisch, J. Schubert, P. Orlean, and R.E. Schmidt. 1999. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol Chem*. 380:503-23.
- Tolson, D.L., S.J. Turco, and T.W. Pearson. 1990. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*. 58:3500-7.
- Tong, J., L. Nguyen, A. Vidal, S.A. Simon, J.H. Skene, and T.J. McIntosh. 2008. Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to Raft bilayers. *Biophys J*. 94:125-33.
- Trost, M., L. English, S. Lemieux, M. Courcelles, M. Desjardins, and P. Thibault. 2009. The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity*. 30:143-54.
- Tsujimoto, Y., and S. Shimizu. 2007. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*. 12:835-40.
- Turco, S.J., and A. Descoteaux. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*. 46:65-94.
- Ullrich, O., H. Horiuchi, C. Bucci, and M. Zerial. 1994. Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature*. 368:157-60.
- Underhill, D.M., and A. Ozinsky. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 20:825-52.
- van der Laan, L.J., E.A. Dopp, R. Haworth, T. Pikkarainen, M. Kangas, O. Elomaa, C.D. Dijkstra, S. Gordon, K. Tryggvason, and G. Kraal. 1999. Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J Immunol*. 162:939-47.
- Veatch, S.L., and S.L. Keller. 2005. Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1746:172-85.
- Vieira, O.V., C. Bucci, R.E. Harrison, W.S. Trimble, L. Lanzetti, J. Gruenberg, A.D. Schreiber, P.D. Stahl, and S. Grinstein. 2003. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*. 23:2501-14.
- Walker, J., J.J. Vasquez, M.A. Gomez, J. Drummelsmith, R. Burchmore, I. Girard, and M. Ouellette. 2006. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 147:64-73.
- Williams, R.L., and S. Urbe. 2007. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:355-68.
- Wilson, B.S., S.L. Steinberg, K. Liederman, J.R. Pfeiffer, Z. Surviladze, J. Zhang, L.E. Samelson, L.H. Yang, P.G. Kotula, and J.M. Oliver. 2004. Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell*. 15:2580-92.

- Wilson, M.E., and R.D. Pearson. 1986. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol.* 136:4681-8.
- Wright, S.D., and S.C. Silverstein. 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med.* 158:2016-23.
- Yamauchi, A., C. Kim, S. Li, C.C. Marchal, J. Towe, S.J. Atkinson, and M.C. Dinamer. 2004. Rac2-deficient murine macrophages have selective defects in superoxide production and phagocytosis of opsonized particles. *J Immunol.* 173:5971-9.
- Yan, W., R. Aebersold, and E.W. Raines. 2009. Evolution of organelle-associated protein profiling. *J Proteomics.* 72:4-11.
- Youle, R.J. 2007. Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science.* 315:776-7.
- Zheng, Y.Z., K.B. Berg, and L.J. Foster. 2009. Mitochondria do not contain lipid rafts, and lipid rafts do not contain mitochondrial proteins. *J Lipid Res.* 50:988-98.
- Zilberstein, D., and M. Shapira. 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 48:449-70.

CHAPITRE VII. ANNEXES

Annexe I. Résultats supplémentaires

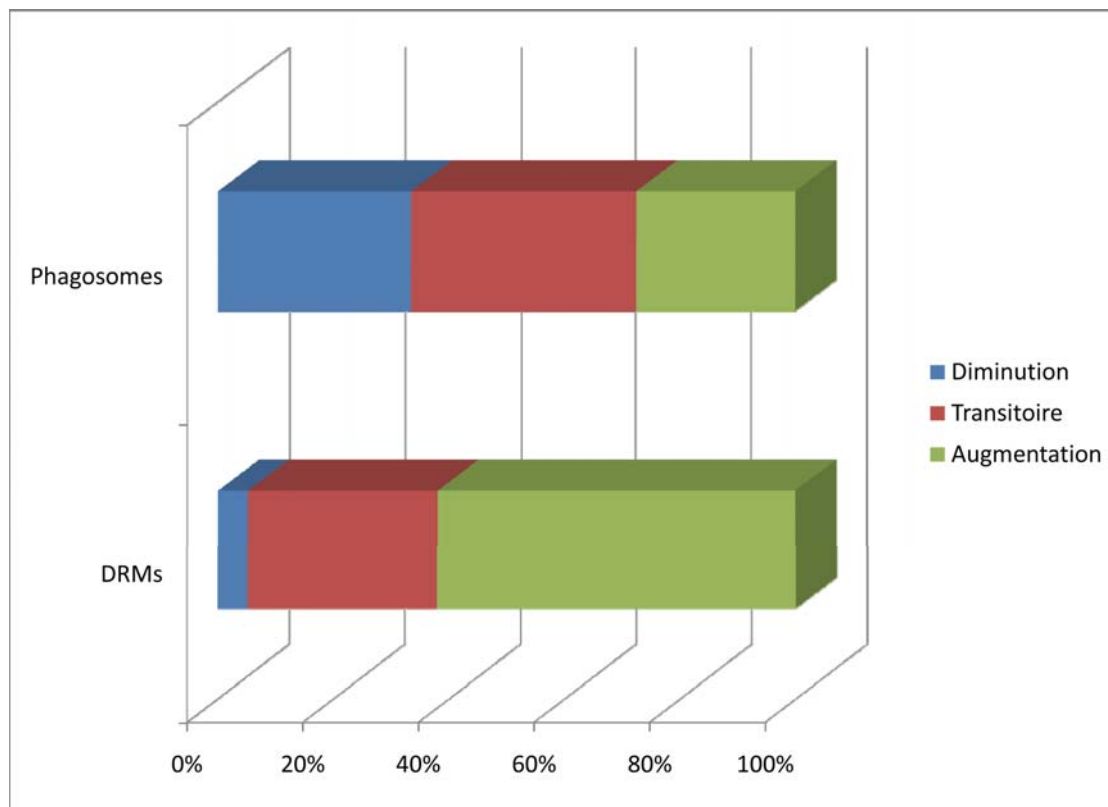


Figure 1 : Distribution des protéines selon leur comportement cinétique (Diminution, Transitoire ou Augmentation) pour les 921 protéines du phagosome comparé aux 352 protéines des DRMs

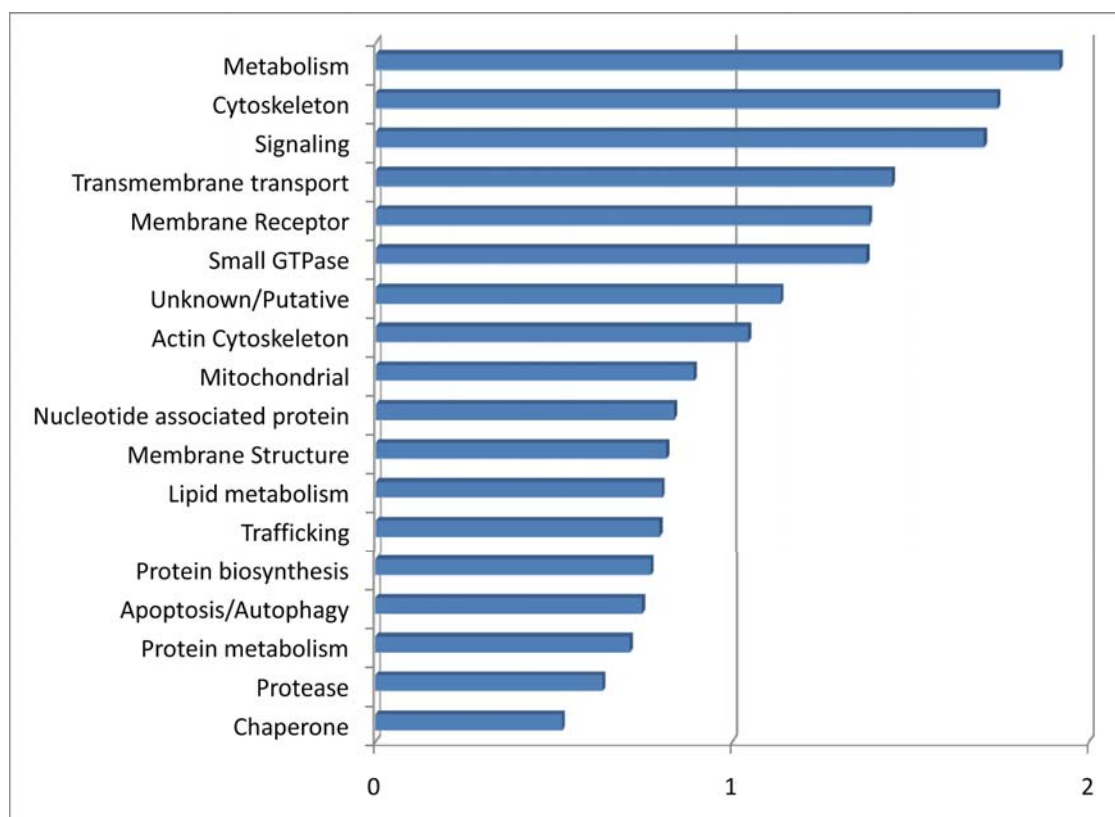


Figure 2: Enrichissement dans les DRMs des catégories fonctionnelles des phagosomes NPF (Nombre de protéines pour une fonction), NPT (Nombres de protéines totales), DRM (Detergent Resistant Membrane), DSM (Detergent Soluble Membrane)

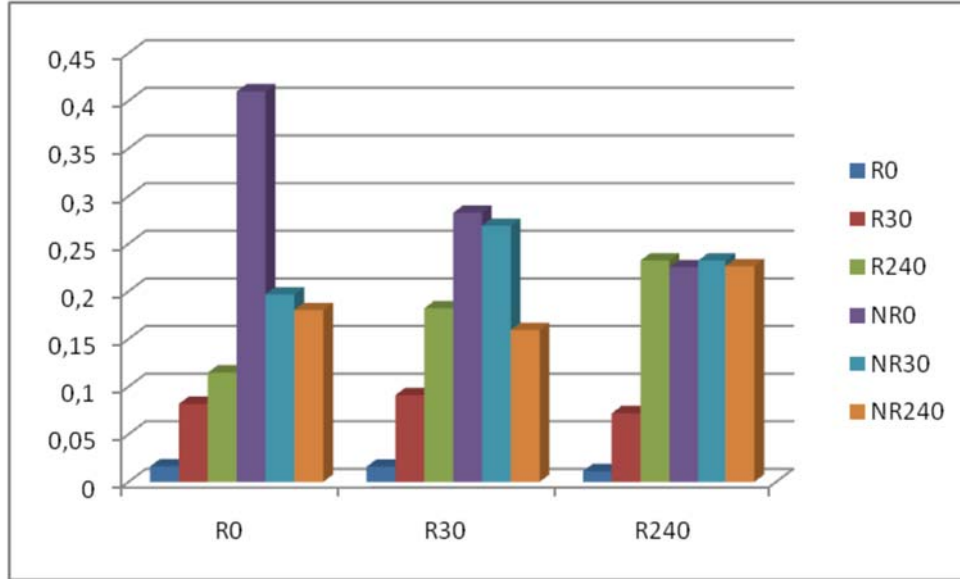


Figure 3 Interactions des protéines des différents groupes spatio-temporels des phagosomes

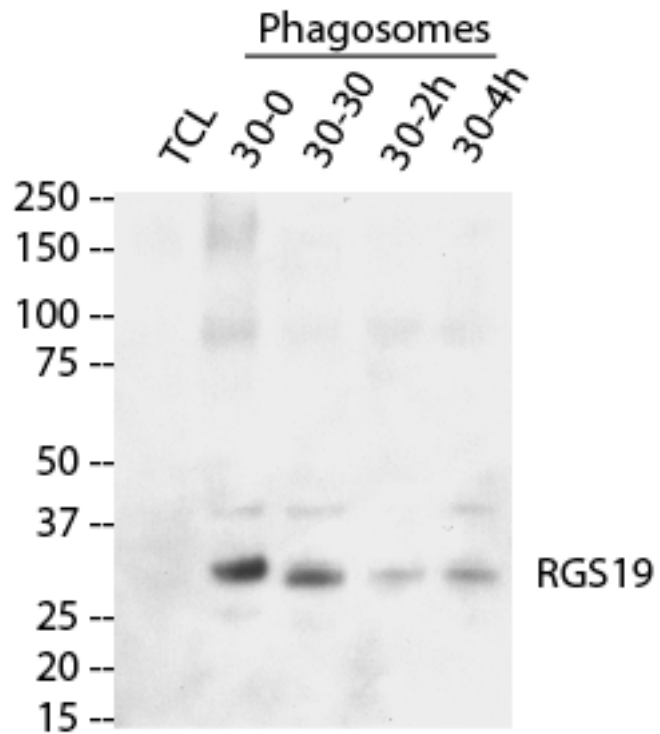
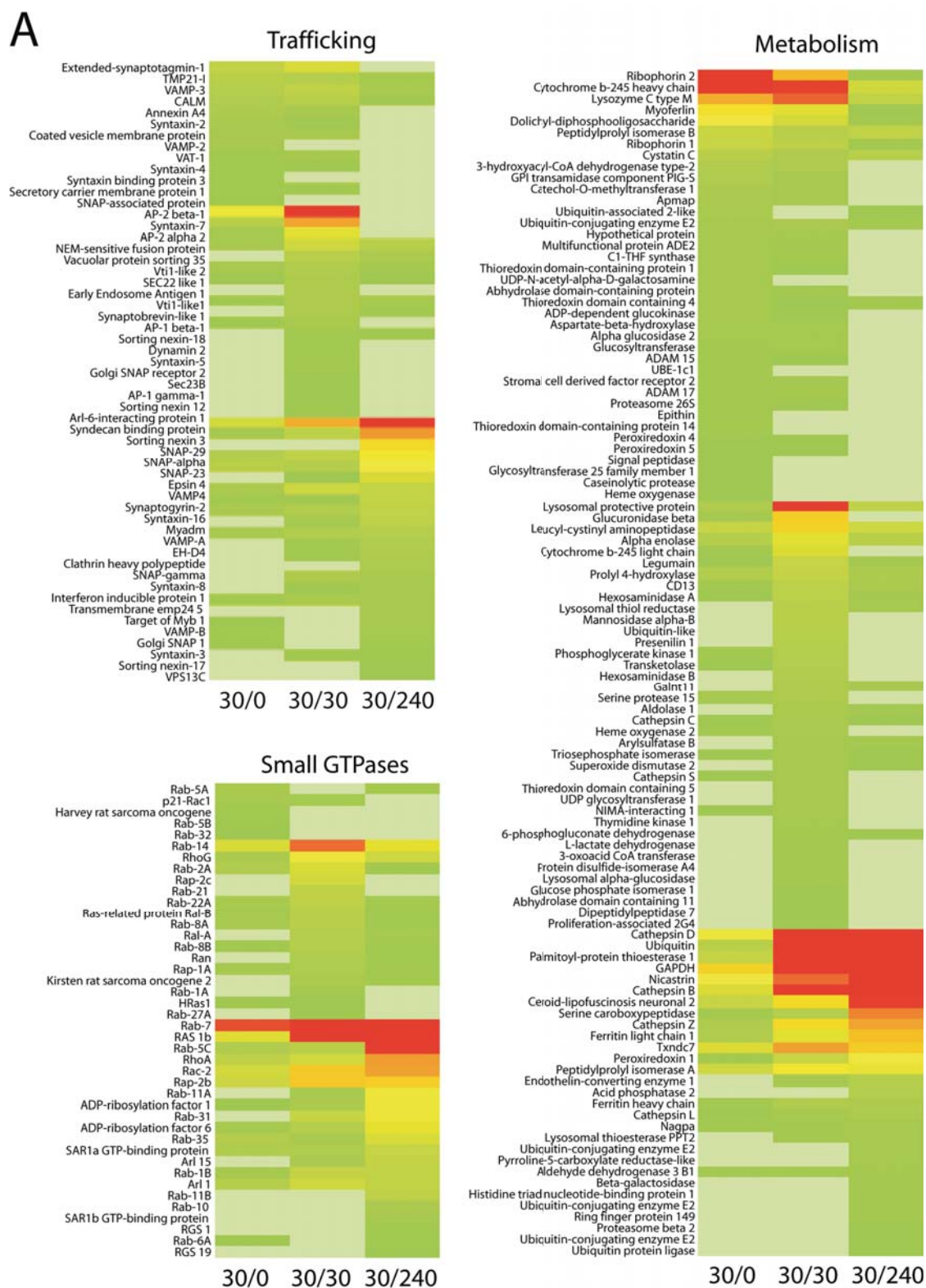


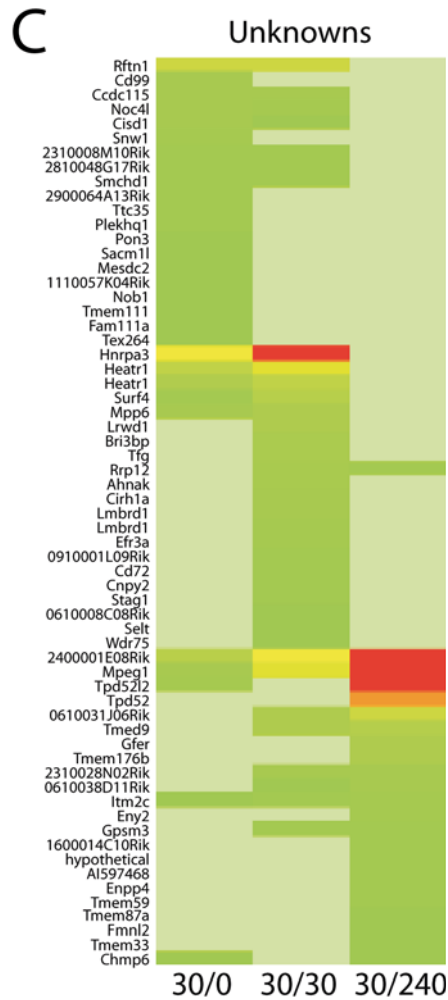
Figure 4 : RGS19 est enrichi dans les phagosomes précoces et diminue lors de la maturation du phagosome

Annexe II. Résultats supplémentaires Article 2



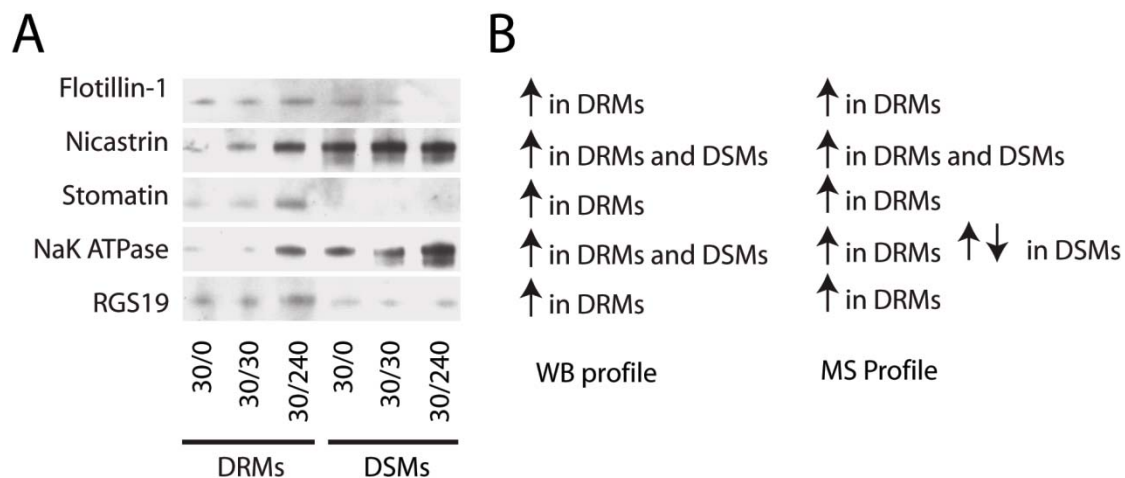
B





Supplementary Figure 1. Spatio-temporal profiling of phagosome functional groups of proteins.

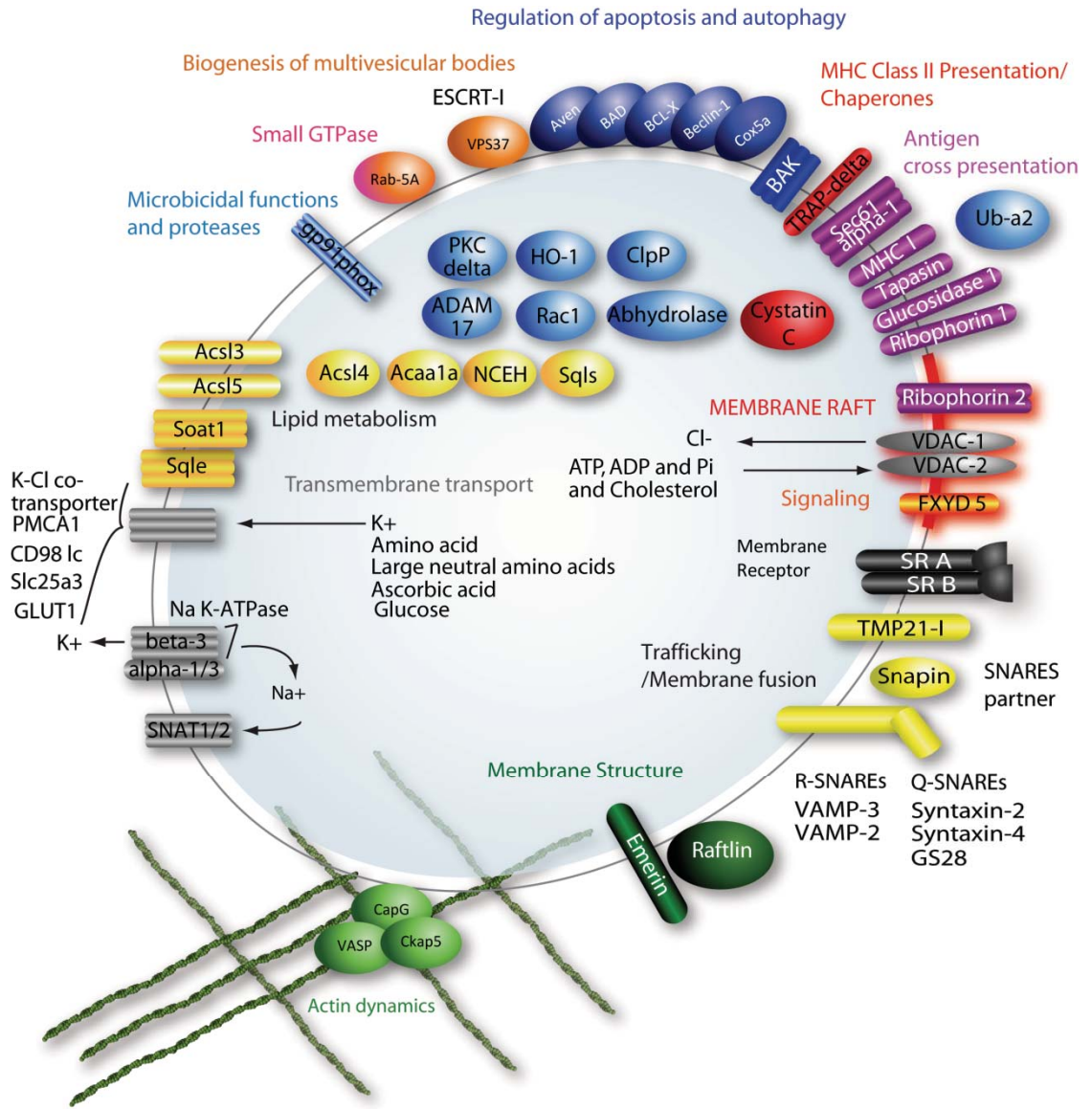
(A) Heat maps as in (Fig 3) showing proteins grouped in functional groups : Trafficking, Small gtpases, and Metabolism (B) Heat maps of protein of the Signaling, Receptors, Transmembrane transporters and Lipid metabolism categories. (C) Heat maps of the unknown protein (gene names or database identification are used)



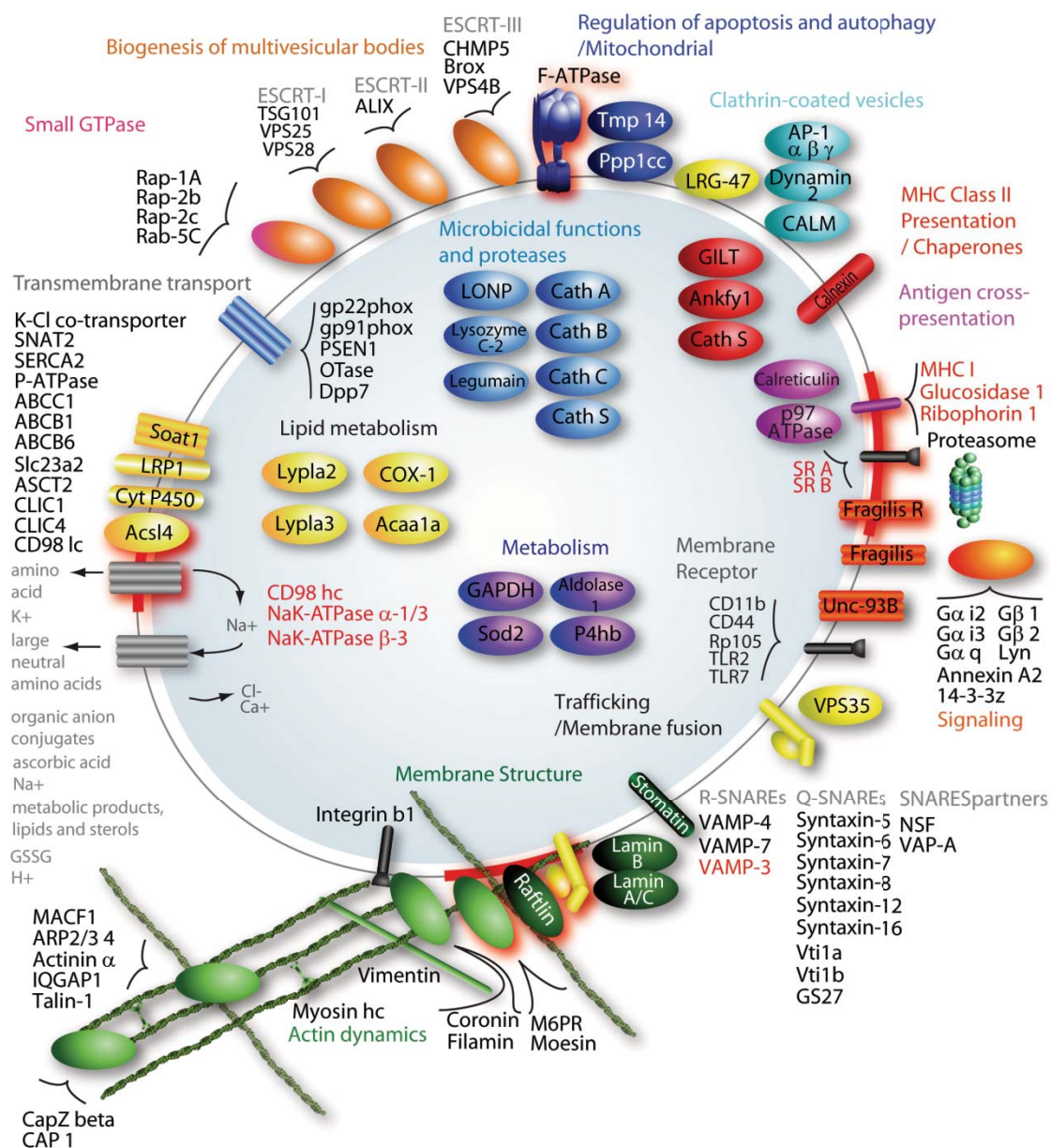
Supplementary Figure 2. Western-blot validation of proteins identified in lipid rafts.

(A) DRMs were extracted from purified phagosomes and isolated on an OptiprepTM-step gradient as in Figure 1. Proteins in pooled fractions 1 and 2 (Rafts), which contain DRMs, and proteins in fraction 7 (Non rafts), which contains the bulk of solubilized membranes, were separated by SDS-PAGE, prior to Western blotting for the indicated proteins. Representative blots are shown using DRMs from 30/240 phagosomes. Similar results were obtained with phagosomes from 30/0 and 30/30 time-points. (B) Comparison of the kinetic expression profiles of the proteins from the Western Blot (WB) experiment and the Mass Spectrometry analysis (MS). Arrows are describing the most important changes (increasing or decreasing) for DRMs and DSMs.

A



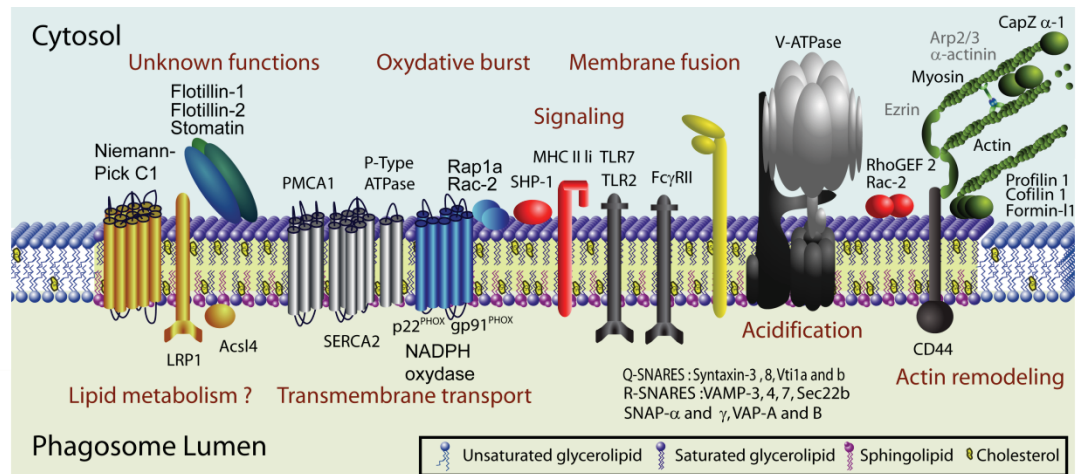
B



Supplementary Figure 3. Functional clusterization in the phagosome membrane.

(A) Proteins of the intermediate phagosome (30 min pulse, 30 min chase) (B) Proteins of the phagolysosome (30 min pulse, 240 min chase). A4: Annexin A4; ABC transporter: ATP-binding cassette transporter; SNAT2: Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2; C5aR: Complement component 5a receptor 1; CAT1: Cationic

amino acid transporter 1; CIC: Chloride intracellular channels 1 and 4; ENT1: Equilibrative nucleoside transporter 1; Gals: Galectins 1, 3, and 9; GLUT1: Glucose transporter type 1 and 6; GPCR: G-protein coupled receptor; FcγR: IgG Fc receptor II and III; IL2R_g: Interleukin-2 Receptor g chain; Kir2.1: Inward rectifier potassium channel 2; LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3; LDLR: Low-density lipoprotein receptor; LRP1: Lipoprotein receptor-related protein; M6PR: Mannose-6-phosphate receptor; MP1: Mitogen-activated protein kinase kinase 1-interacting protein 1; PHT2: Peptide/histidine transporter 2; P2X₇: P2X purinergic receptor 7; RIP: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase; SIRP: Signal-regulatory protein; SPX2: Sugar phosphate exchanger 2; TLR: Toll-like receptor 2 and 7; ZIP4: Zinc transporter 4



Supplementary Figure 4. Alteration of phagosome functions by *Leishmania*.

The nature of the proteins found in DRMs reveals that functions related to lipid metabolism, the oxidative burst, signal transduction, membrane fusion, acidification, and actin nucleation are likely to take place on specialized foci of the phagosome membrane and altered by LPG during *Leishmania* infection. CD36L2 (CD36 antigen-like 2), MSR1 (Macrophage scavenger receptor type I), LDLR (Low-density lipoprotein receptor), VLDLR (Very low-density lipoprotein receptor), LDL (Lowdensity lipoprotein), LDL-PLA(2) (Low-density lipoprotein associated phospholipase A2), PKC (Protein kinase C), TLR (Toll-like receptor), GPCR84 (G protein-coupled receptor 84), SNAP (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein).

Supplementary Table 1. List of the 921 phagosomal proteins

Supplementary Table 1. List of the 921 phagosomal proteins

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
1	14-3-3 eta	14-3-3e	Q3TGZ9	3	23	9	-	↑↓	-
2	14-3-3 zeta	14-3-3z	Q3TSF1	10	65	25	↑	↑↓	↑
3	Hmgcl		Q3UMP2	6	11	4	-	↓	-
4	HADH Type II		O08756	6	22	16	-	↓	-
5	3-oxoacid CoA transferase		Q9CRF4	4	4	4	-	↑↓	-
6	4.1G		Q811C0	3	5	4	-	↓	-
7	6-phosphogluconate dehydrogenase		Q3UD80	5	6	1	-	↑↓	-
8	Abhydrolase domain containing 11		Q8K4F5	2	2	1	-	↑↓	-
9	Abhydrolase protein	Abhydrolase	Q58EV9	5	9	4	-	↓	-
10	Acetyl-CoA acyltransferase A	Acaa1a	Q921H8	9	62	25	-	↓	-
11	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1		Q3TQP7	5	11	4	-	↓	-
12	Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase		Q8BJT5	2	2	1	-	↓	-
13	Acid ceramidase	Asah1	Q3U646	8	109	16	↑	↑	↑
14	Acid phosphatase 2		Q3U4F3	4	13	4	↑	↑	↑
15	Aconitase 2		Q3UNH7	6	29	1	-	↓	-
16	Actin alpha 2		Q3TG92	0 (17)	415	4	-	↑	-
17	Actin beta		Q3UBQ4	0 (17)	930	4	-	↑	-
18	Actin gamma		Q9QZ83	0 (17)	902	4	-	↑	-
19	Actin-like 2		Q6PI31	5	13	1	-	↑↓	-
20	Actin-like 6A		Q3TF62	2	2	1	-	↑↓	-
21	Actin-related protein 2/3	ARP2/3	Q3U870	6	24	4	-	↑↓	-
22	Actin-related protein 2/3	ARP2/3	Q9WV32	2	4	1	-	↑↓	-
23	Actin-related protein 2/3 complex 3	ARP2/3	Q3TAT0	2	4	1	-	↑	-
24	Actin-related protein 2/3 complex 4	ARP2/3	Q3UWV4	4	8	9	-	↑↓	-
25	Actin-related protein 2/3 complex 5	ARP2/3	Q3UA72	6	17	4	-	↑	-
26	Actinin alpha 4		Q3UDJ7	7	24	4	↑↓	↑↓	↑↓
27	Actinin beta		Q3TVP6	0 (17)	1000	4	-	↑	-
28	Activating signal cointegrator 1		Q6P4T2	5	42	16	-	↑↓	-
29	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	AHA1	Q3TL79	2	2	1	-	↓	-
30	Acyl-CoA synthetase 3	AcsI3	Q8K1J7	2	6	4	-	↓	-
31	Acyl-CoA synthetase 4	AcsI4	Q91YN3	12	128	36	↑	↓	↑
32	Acyl-CoA synthetase 5	AcsI5	Q3UKS0	5	10	1	-	↓	-
33	ADAM 15		O88839	5	7	0	-	↓	-
34	ADAM 17		Q3UEC0	4	6	4	↑↓	↓	↑↓
35	Adenine phosphoribosyltransferase APRT		P08030	7	18	16	↑	↑↓	↑
36	Adenylate kinase 3 alpha like		Q9D8W6	4	4	4	-	↓	-
37	Adenylate kinase isoenzyme 2		Q3TKI6	6	18	9	-	↓	-
38	Adipocyte PM-associated protein		Q3U4F4	5	14	9	-	↓	-
39	ADP-dependent glucokinase		Q3UDS7	4	8	4	↑↓	↓	↑↓
40	ADP-ribosylation factor 1	Arf 1	P84078	11	158	25	↑	↑	↑
41	ADP-ribosylation factor 6		P62331	11	59	25	↑	↑	↑
42	ADP-ribosyltransferase 1		Q3TF18	5	8	16	↑↓	↑↓	↑↓
43	ADP/ATP translocase 2		Q61311	9	26	1	↑	↓	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
44	AHNAK		Q6UL10	12	66	16	↑↓	↓	↑↓
45	Albumin 1		Q8C7C7	18	312	1	↑	↓	↑
46	Aldehyde dehydrogenase 2		Q3UJW1	8	34	25	↑↓	↑↓	↑↓
47	Aldehyde dehydrogenase 3 B1		Q3U3J9	8	12	16	↑	↓	↑
48	Aldolase 1		P05064	6	12	9	-	↑↓	-
49	Alpha enolase		Q9DCY7	11	71	25	↑	↑↓	↑
50	Alpha glucosidase 2		Q3UE86	4	10	4	-	↓	-
51	Alpha-2-macroglobulin		Q6PEM2	3	4	4	-	↑	-
52	Alpha-globin		Q61649	7	8	1	-	↓	-
53	Amyloid beta A4		Q8BPC7	4	5	4	↑	↑	↑
54	Ankfy1		Q5SPW9	5	19	25	↑	↑↓	↑
55	Annexin A11		Q921F1	7	17	9	-	↑↓	-
56	Annexin A2		P07356	16	609	25	↑	↑	↑
57	Annexin A3		O35639	7	13	16	-	↑↓	-
58	Annexin A4		P97429	6	19	4	-	↓	-
59	Annexin A5		Q3U5Q1	9	226	16	-	↑	-
60	Annexin A7		Q8CCV9	2	2	1	-	↑↓	-
61	Antioxidant protein		Q8K4K8	6	12	4	-	↑↓	-
62	AP-1 beta-1	AP-1	Q5SVG5	4	45	16	-	↑↓	-
63	AP-1 gamma-1	AP-1	Q8BSZ7	2	2	1	-	↑↓	-
64	AP-2 alpha 2	AP-2	Q3U7X9	5	44	4	-	↑↓	-
65	AP-2 beta-1	AP-2	Q9DBG3	7	193	49	↑↓	↑↓	↑↓
66	API-5		O35841	6	22	1	-	↓	-
67	Apolipoprotein A1		Q58EV2	2	2	1	-	↑	-
68	Apoo		Q3KNM9	3	3	4	-	↑↓	-
69	Arl 1	Arl 1	Q3TIR2	3	3	4	↑	↓	↑
70	Arl 15	Arl 15	Q8BGR6	6	6	16	↑	~	↑
71	Arl-6-interacting protein 1		Q3U499	2	2	1	-	↑↓	-
72	Armet		Q80ZP8	8	28	36	-	↑	-
73	ARP3 actin-related 3		Q3TGE1	9	44	16	-	↑	-
74	Arylacetamide deacetylase-like 1	NCEH	Q8BLF1	6	32	1	-	↓	-
75	Arylsulfatase B		Q32KJ1	5	11	16	-	↑↓	-
76	ASCT2	ASCT2	Q3UFR4	17	415	25	↑	↓	↑
77	Aspartate-beta-hydroxylase		Q8CBM2	8	12	9	↑↓	↓	↑
78	Atlastin-3		Q99LZ9	4	7	4	-	↑↓	-
79	ATP synthase CF(0) e		P70342	5	5	1	-	↓	-
80	ATP synthase CF(0) g		Q5M9M8	4	4	4	-	↓	-
81	ATP synthase CF(1) 5d		Q4FK74	8	12	1	-	↑↓	-
82	ATP-binding cassette B1	ABCB1	P06795	13	116	25	↑	↑↓	↑
83	ATP-binding cassette B6	ABCB6	Q9DC29	9	23	9	↑	↑↓	↑
84	ATP-binding cassette C1	ABCC1	O35379	7	32	25	↑↓	↑↓	↑↓
85	ATPase AAA domain-containing 1		Q9D9C1	4	5	1	-	↓	-
86	Aven		Q496S6	3	5	1	-	↓	-
87	BAK	BAK	O08734	5	12	4	-	↓	-
88	Basigin	CD147	O55108	16	156	9	↑↓	↑↓	↑↓
89	Bcas2		Q3U5M2	5	14	4	-	↑↓	-
90	Bcl-associated death promoter	BAD	Q3U9H3	2	2	1	-	↓	-
91	Bcl-x	BCL-X	Q9QWX2	4	10	1	-	↓	-
92	BCL2-associated X kappa	BAX	Q8K3J2	4	4	4	-	↑	-
93	BCL2-like 13		Q3TNR7	4	4	1	-	↓	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
94	Beclin-1		O88597	1 (1)	1	1	-	↑↓	-
95	Beta-2 microglobulin	B2m	Q91XJ8	12	61	4	↑	↑	↑
96	Beta-galactosidase		Q99KV2	3	5	1	-	↑	-
97	Beta-globin		Q61650	3	5	1	-	↑	-
98	BRI3		Q3U0F3	8	11	4	↑	↑↓	↑
99	BRI3-binding protein		Q8BXP1	7	10	1	↑↓	↑↓	↑↓
100	BRUNOL2		Q99PE1	2	3	1	-	↑↓	-
101	Bub 3		Q6ZWM5	3	6	4	-	↓	-
102	C1-THF synthase		Q80V98	4	10	4	-	↓	-
103	C19orf12 homolog		Q9DAX5	3	3	4	-	↑	-
104	Calcium-binding protein CHP		Q62877	3	4	1	-	↑↓	-
105	Calmodulin		P62204	5	9	4	↑↓	↑↓	↑↓
106	Calnexin	Calnexin	Q3TXE5	16	213	9	↑↓	↓	↑
107	Calpactin-1 light chain		P08207	5	7	4	-	↓	-
108	Calponin-2		Q08093	2	2	1	-	↑	-
109	Calreticulin		Q3UWP8	9	63	9	↑	↓	↑
110	CAP 1	Cap1	P40124	8	80	16	-	↑↓	-
111	CapZ alpha-1	CapZ	Q3UAS2	5	6	9	↑	↑	↑
112	CapZ beta	CapZ	Q3TRH8	7	16	4	-	↑↓	-
113	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II		Q5I0X8	6	8	4	↑	↑↓	↑
114	Caseinolytic protease	ClpP	Q3UGW4	2	2	1	-	↓	-
115	Catechol-O-methyltransferase 1		Q8BIG7	6	15	9	-	↓	-
116	Catenin delta-1		Q80VQ2	2	5	4	-	↓	-
117	Cathepsin B	Cath B	Q3TVS6	10	249	9	↑↓	↑	↑↓
118	Cathepsin C	Cath C	Q3U9B7	5	12	1	-	↑↓	-
119	Cathepsin D	Cath D	Q3U7P0	13	891	49	↑	↑	↑
120	Cathepsin L	Cath L	Q3UWH6	7	18	4	-	↑	-
121	Cathepsin S	Cath S	Q3UBR4	5	9	4	-	↑↓	-
122	Cathepsin Z	Cath Z	Q545I6	10	124	16	↑	↑	↑
123	Cbx3		Q2YD72	2	3	4	-	↑↓	-
124	Ccl3		Q3U6F9	2	2	1	-	↑↓	-
125	CD Man-6-P receptor	M6PR	Q3UF03	17	276	16	↑↓	↑	↑
126	CD11b	CD11b	Q3U4I5	0 (14)	517	4	-	↓	-
127	CD13	CD13	Q3TB69	9	32	25	↑	↑↓	↑
128	CD14		Q91V69	13	230	36	↑	↑	↑↓
129	CD166		O70136	14	121	36	↑↓	↑↓	↑↓
130	CD180	Rp105	Q3U0U7	18	416	25	↑↓	↑	↑
131	CD316		Q8R366	5	16	16	↑↓	↓	↑↓
132	CD43		Q544C5	12	25	9	↑↓	↑	↑↓
133	CD44	CD44	P15379	18	207	0	↑	↑↓	↑
134	CD47		Q3U967	9	55	1	-	↑	-
135	CD49e		Q80YP5	13	47	25	↑↓	↓	↑↓
136	CD5		Q91X69	14	168	16	↑↓	↓	↑↓
137	CD68		P31996	13	74	0	↑	↑	↓
138	CD72		Q3UB58	2	4	1	-	↑↓	-
139	CD9		Q3U9W0	11	111	4	↑↓	↓	↑↓
140	CD98	CD98 hc	Q54AH5	18	838	9	↑↓	↑↓	↑
141	CD99		Q8C1L8	3	7	1	-	↓	-
142	Cdc2a		Q99JW7	5	9	36	-	↑↓	-
143	CDC42 small effector 1		Q8BHL7	4	6	1	-	↑	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
144	Cell adhesion molecule 1	NECL-2	Q7TNL1	11	124	4	↑↓	↓	↑↓
145	Cell cycle associated protein 1		Q7TT26	8	103	16	-	↓	-
146	Cell division cycle 42		Q3THZ7	0 (10)	67	9	-	↓	-
147	Ceroid-lipofuscinosis neuronal 2	TPP-1	Q3U2Z6	10	162	9	↑	↑	↑
148	Chaperonin subunit 3		Q3U0I3	6	18	9	-	↓	-
149	Chaperonin subunit 5		Q3UCU4	5	10	4	-	↑↓	-
150	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4		Q6P8R3	5	9	4	-	↑	-
151	Chemokine-like factor 7		Q9ESD6	3	4	0	-	↑↓	-
152	Chloride intracellular channel 1	CLIC1	Q9Z1Q5	6	13	1	↑↓	↑↓	↑↓
153	Chloride intracellular channel 4	CLIC4	Q543N5	5	22	9	-	↑↓	-
154	CHMP4b	CHMP4B	Q3TXM7	8	13	9	↑	-	H
155	Cirhin		Q3UJY3	2	6	1	-	↑↓	-
156	Citrate synthase		Q3UDP3	8	64	9	↑↓	↓	↑↓
157	Clathrin heavy polypeptide		Q5SXR6	7	14	16	↑	↑	↑
158	CLE7		Q9CQE8	6	16	9	-	↑↓	-
159	Coactosin-like protein		Q9CQI6	6	15	4	-	↓	-
160	Coated vesicle membrane protein		Q3THL1	7	13	4	-	↓	-
161	Cofilin 1		P18760	13	316	9	↑	↑	↑
162	Cohesin		O35638	3	3	4	-	↑↓	-
163	Coiled-coil protein 115		Q3TS67	6	12	1	-	↓	-
164	Collectin 12	Collectin 12	Q3TYT8	10	23	4	↑	↓	↑
165	COMM domain-containing protein 7		Q99J75	5	8	1	-	↑↓	-
166	Complement	p32-RACK	Q8R5L1	10	90	9	↑↓	↓	↑↓
167	Complement 5 receptor 1	C5aR	Q3UCS9	5	14	4	↑	↓	↑
168	Coronin		Q3U9K3	6	36	9	-	↑↓	-
169	CREG		Q3UNP8	8	130	4	↑	↑	↑
170	Cri-1		Q9JI13	2	5	0	-	↑↓	-
171	Crry		Q64735	4	5	0	↑↓	↑↓	↑↓
172	CSF-1-R		Q3U4N8	12	103	4	↑	↓	↑
173	CSP		P60904	4	4	1	↑	↑	↑
174	CTBP		Q3TT81	7	24	16	-	↓	-
175	Cyclooxygenase-1	COX-1	Q3UZ23	9	40	4	-	↑↓	-
176	Cyclophilin C-associated protein	CyCAP	O35649	10	278	16	↑↓	↑↓	↑↓
177	Cystatin C		Q3U5K7	9	44	4	-	↓	-
178	Cytochrome b-245 heavy chain	gp91phox	Q3U6G0	15	232	36	↑	↓	↑
179	Cytochrome b-245 light chain	p22phox	Q3U820	9	38	4	↑↓	↑↓	↑
180	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske		Q5SVV1	3	4	4	-	↓	-
181	Cytochrome b5 A		Q3TN44	9	50	9	↓	↓	↑
182	Cytochrome b5 reductase		Q9DCN2	7	25	9	↓	↓	↓
183	Cytochrome c 1		Q3TDC5	5	7	9	-	↑↓	-
184	Cytochrome c oxidase 4		P19783	6	13	4	-	↑↓	-
185	Cytochrome c oxidase subunit 2		Q7JCZ1	4	18	4	-	↑↓	-
186	Cytochrome c oxidase subunit 5a	Cox5a	P12787	6	13	4	-	↓	-
187	Cytochrome c oxidase subunit 7a 2-like		Q3UDK5	5	6	1	-	↓	-
188	Cytochrome P450	Cyt P450	Q9JIY3	3	5	4	-	↑↓	-
189	Cytokeratin-1		Q149E0	5	53	1	↑	↑↓	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
190	Cytokeratin-2e		Q3TTY5	5	7	1	↑	↑	↑
191	Cytokeratin-6A		Q8K2E4	5	5	1	↑	↑	↑
192	Cytokeratin-6B		Q9CV72	12	25	1	↑	↑	↓
193	Cytokine-like nuclear factor n-pac		Q3TX02	2	4	4	-	↑↓	-
194	Cytoskeleton-associated protein 5	Ckap5	Q80U79	4	10	4	↑	↓	↑
195	DEAD 1		Q3V1Z7	4	14	9	-	↑↓	-
196	DEAD 18		Q3MIB0	2	2	1	-	↑↓	-
197	DEAD 42		Q3TAN3	6	25	4	-	↓	-
198	DEAD 5		Q3UXW3	8	121	9	↑↓	↓	↑↓
199	Dedicator of cytokinesis protein 8		Q8CAP6	6	14	1	-	↓	-
200	Dehydrogenase/reductase SDR 1		Q3TVU9	4	5	1	-	↓	-
201	Deleted in polyposis 1		Q9CQG4	2	2	1	-	↑	-
202	Deoxyuridine triphosphatase		Q9CQ43	4	4	1	-	↑↓	-
203	Dhm1		Q9DBR1	6	42	0	-	↓	-
204	Dihydroipoamide dehydrogenase		Q3TG55	3	5	4	-	↓	-
205	Dipeptidylpeptidase 7	Dpp7	Q8R082	2	2	1	-	↑↓	-
206	DNA binding		Q9JKB3	6	6	0	-	↑	-
207	DNA binding		Q9CRH1	3	4	1	-	↓	-
208	DNA damage-binding protein 1		Q99LV3	3	15	1	-	↑↓	-
209	DNA enzyme		O35931	6	52	4	-	↑↓	-
210	DNA lyase		P28352	3	10	4	-	↑↓	-
211	Dodecenoyl-CoA delta isomerase		Q8QZV3	2	3	4	-	↓	-
212	Dolichyl-diphosphooligosaccharide	Rpn1	Q5RKP4	13	80	25	↑↓	↓	↑
213	Dynamain 2		Q9CUM4	3	5	9	-	↑↓	-
214	Dynein 1 light chain 1		Q3UGE7	4	5	9	-	↓	-
215	Dystroglycan 1		Q8BPJ7	3	4	1	-	↓	-
216	E-NPP4		Q69ZX0	2	3	1	-	↑	-
217	E25B		Q9JME4	3	4	1	-	↑	-
218	Early Endosome Antigen 1	EEA1	Q3TQY5	4	12	36	-	↑↓	-
219	EFR3 homolog A		Q8BXQ7	4	5	4	↑↓	↑↓	↑↓
220	EGF-like module containing		Q3U1M9	2	2	1	-	↑↓	-
221	EH-D4		Q3TWP9	6	15	25	↑	↑↓	↑
222	ELAV-like 1		Q3UFF9	6	65	9	-	↑↓	-
223	Electron transfer flavoprotein alpha		Q3THD7	6	27	9	-	↓	-
224	Elmo 1	ELMO1	Q8BSY9	3	5	4	↑↓	↓	↑↓
225	Elongation factor	eEF-1A	Q3UA81	17	759	25	↑	↓	↑
226	Elongation factor	eEF-1G	Q9CRT5	7	50	25	-	↑↓	-
227	Elongation factor	eEF-1B	Q3THP5	8	45	4	↑↓	↑↓	↑↓
228	Elongation factor	eEF-1D	Q9CYJ5	6	11	4	-	↓	-
229	Elongation factor	eEF-Tu	Q8BFR5	4	4	0	-	↓	-
230	Elongation factor		Q80UT3	5	6	1	-	↑↓	-
231	Emerin	Emerin	Q3TIH6	5	17	4	-	↓	-
232	EMP-3		Q3UIF8	6	34	1	-	↓	-
233	Endophilin-B1		Q3TYR7	3	20	1	-	↑	-
234	Endothelin-converting enzyme 1		Q6P9Q9	5	22	4	-	↑	-
235	Enhancer of yellow 2 homolog		Q9JIX0	2	5	1	-	↑	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
236	Enoyl Coenzyme A hydratase		Q8BU95	3	3	4	-	↓	-
237	Env		Q04586	17	596	36	↑	↑	↑
238	Env		Q3TTS2	8	10	1	↑	↑↓	↑
239	Epithin	Epithin	P56677	3	4	9	-	↓	-
240	Epsin 4		Q3UPG6	5	33	25	-	↑	-
241	ERp29		Q3THW3	8	17	36	-	↑	-
242	ERp60		Q3UZK8	11	232	36	↑	↑↓	↑
243	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11		Q3U2P6	2	2	1	-	↓	-
244	EVI-2A		Q3TBB7	9	20	1	↑↓	↑↓	↑↓
245	Ewing sarcoma homolog		Q9D2P0	4	24	9	-	↓	-
246	Exosome component 5		Q3U2K4	4	6	4	-	↑↓	-
247	Exosome component 6		Q8BTW3	4	4	4	-	↓	-
248	Extended-synaptotagmin-1		Q3U7R1	7	56	4	↑	↓	↑
249	Ezrin		Q80ZT8	4	41	25	-	↑	-
250	F0-ATPase b		Q3UF04	3	4	4	-	↑↓	-
251	F0-ATPase d		Q91YK9	8	20	16	-	↓	-
252	F1-ATPase alpha		Q3U452	5	5	4	↑↓	↓	↑↓
253	F1-ATPase beta		Q3TX28	14	490	4	↓	↓	↓
254	F1-ATPase gamma		Q8C2Q8	6	18	9	-	↓	-
255	F1-ATPase O		Q3TF25	9	51	36	-	↑↓	-
256	FAM111A		Q3T9N2	2	2	1	-	↓	-
257	Farnesyl diphosphate synthetase		Q3TMB3	9	13	4	-	↑	-
258	Fatty acid-binding protein		Q05816	9	27	25	-	↑	-
259	Fc gamma receptor II	FcgammaRII	P08101	12	60	0	↑	↑	↑↓
260	Fc gamma receptor III	FcgammaRIII	Q5D5I8	9	58	4	-	↑	-
261	Ferritin heavy chain		Q3UI44	10	26	9	↑	↑	↑
262	Ferritin light chain 1		Q8WUQ8	11	107	4	↑	↑	↑
263	Fibrillarin		Q3UJS2	2	4	4	-	↑↓	-
264	Filamin		Q8BTM8	5	20	25	-	↑↓	-
265	FK506-binding protein 2		Q3TND1	6	13	9	-	↓	-
266	FK506-binding protein 8		Q811R4	3	4	1	-	↓	-
267	Flap structure specific endonuclease 1		Q3TGH6	3	5	4	-	↑↓	-
268	Flotillin 1	Flotillin 1	Q3TJS0	1 (1)	1	9	↑	-	↑
269	Flotillin 2	Flotillin 2	Q60634	1 (1)	1	0	↑	-	↑
270	Formin-like 1		Q3TY82	7	46	9	↑	↑↓	↑
271	Fragilis	Fragilis	Q9CQW9	18	490	4	↑	↑	↑
272	Fragilis R	Fragilis R	Q99J93	11	39	9	↑	↑↓	↓
273	Fumarate hydratase 1		Q3UIA9	6	13	25	-	↓	-
274	FUS interacting protein		Q8CF51	3	4	1	-	↑↓	-
275	FXDY 5	FXDY 5	Q3TDW1	15	51	4	↓	↓	↓
276	G alpha		P63094	9	74	0	↑	↑↓	↑
277	G alpha 13		Q3UE40	12	103	25	↑	↑↓	↑
278	G alpha 14		Q8R2X9	2	12	4	-	↓	-
279	G alpha i2	Galpha	Q3TXK7	17	833	1	↑	↑↓	↑
280	G alpha i3	Galpha	Q3TGV1	16	210	16	↑	↑↓	↑
281	G alpha q	Galpha	Q6PFF5	11	62	25	↑↓	↑↓	↑↓
282	G beta 1	Gbeta	P62874	15	235	25	↑	↑	↑
283	G beta 2	Gbeta	P62880	18	304	16	↑	↑	↑
284	G beta 2		Q3TKQ0	3	3	9	↑	↑↓	↑
285	G gamma 10		Q9CXP8	2	3	4	-	↑	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
286	G gamma 2		Q3TYE8	9	15	4	↑↓	↑	↑↓
287	G gamma 5		Q3UKC8	3	6	1	-	↑↓	-
288	GABA(A) receptor-associated like 1		Q3TXZ5	5	6	1	-	↑↓	-
289	Gag		Q60588	9	393	25	-	↑	-
290	Galectin-1	Gal1	P11946	8	37	4	-	↑	-
291	Galectin-3	Gal3	Q3V471	14	472	16	↑	↑	↑
292	Gfer		Q8CIF8	3	10	1	-	↑	-
293	GLTP	GLTP	Q91YJ7	3	5	1	-	↑↓	-
294	Glucose phosphate isomerase 1		Q8C675	2	2	4	-	↑↓	-
295	Glucosidase 1		Q3U026	5	9	9	↑↓	↓	↑
296	Glucosylceramidase precursor	Gba	Q78NR7	10	40	36	↑	↑	↑
297	Glucosyltransferase		Q8BWM7	4	10	16	-	↓	-
298	Glucuronidase beta		Q3TW82	5	60	4	-	↑↓	-
299	Glutamate dehydrogenase		Q8C273	5	15	4	-	↓	-
300	Aspartate aminotransferase		Q3UD91	5	48	9	-	↓	-
301	Glutaredoxin-related protein 5		Q9D6E9	2	3	1	-	↑↓	-
302	GAPDH	GAPDH	P16858	15	341	4	↑	↑↓	↑
303	Glycerol-3-phosphate transporter	SPX2	Q6P4P0	13	80	1	↑	↑↓	↑
304	Glycine amidinotransferase		Q3UKD9	3	6	4	-	↑↓	-
305	Glycosyltransferase 25 member 1		Q3V3R5	3	3	1	-	↓	-
306	GM2 Activator Protein		Q5F1Z8	4	5	4	-	↑↓	-
307	Golgi apparatus protein 1	ESL-1	Q61543	13	36	49	↑	↑↓	↑
308	Golgi SNAP 1	GS28	Q91VU9	4	8	4	↑	↓	↑
309	Golgi SNAP receptor 2	GS27	Q3UDN0	4	4	1	-	↑↓	-
310	GPI transamidase component PIG-S	PIG-S	Q6PD26	6	18	16	-	↓	-
311	Granulin		Q3TX66	4	13	4	-	↑	-
312	Growth factor receptor bound protein 2		Q3U1Q4	4	6	9	-	↑↓	-
313	GTPase activating protein 2	G3BP	Q542W3	6	12	4	-	↓	-
314	Guanine nucleotide exchange factor 2	GEF2	Q3TBI4	7	46	4	↓	↓	↓
315	Harvey rat sarcoma oncogene		Q3U1N3	3	4	4	-	↓	-
316	Haymaker		Q3UQD0	2	5	4	-	↓	-
317	HBX-interacting		Q3UJV9	7	11	1	-	↑	-
318	Helicase		O09060	12	150	9	↑↓	↓	↑
319	Helicase		Q6PDQ2	6	50	9	-	↑↓	-
320	Helicase		Q8K2L4	4	36	9	↑↓	↑↓	↑↓
321	Heme oxygenase	HO-1	Q3U5H8	2	2	1	-	↓	-
322	Heme oxygenase 2	HO-2	Q3U6W4	6	12	9	-	↑↓	-
323	Hexosaminidase A		Q3UCP6	8	24	25	-	↑↓	-
324	Hexosaminidase B		Q3TXR9	3	12	9	-	↑↓	-
325	High mobility group box 1		Q8C7C4	5	33	9	-	↑↓	-
326	Histidine triad nucleotide-binding 1		P70349	3	5	1	-	↑	-
327	Histone		Q0VDL9	10	271	4	↑	↑	↓
328	Histone		P15864	3	21	4	↑	↑↓	↑
329	Histone		P43274	2	17	9	↑	↑↓	↑
330	Histone		Q5T008	18	396	9	↑↓	↑↓	↑
331	Histone		Q3THW5	5	30	9	↑↓	↓	↑↓
332	Histone		Q3B7Z8	9	57	16	↑↓	↑↓	↓

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
333	Histone		Q9CRM8	2	3	1	↑	-	↑
334	Histone		Q8CGP3	10	33	9	↑↓	↓	↑↓
335	Histone		P43275	7	26	16	↑↓	↓	↑
336	Histone		Q3TW79	10	43	16	↑↓	↓	↑↓
337	Histone		P84228	12	131	16	↑↓	↑↓	↓
338	HMG- 2		Q3UAZ7	9	63	16	↑↓	↑↓	↑↓
339	Hnrnpa3		Q6P6I7	8	158	9	↓	↑↓	↓
340	HRas1		Q76LV5	4	36	4	-	↑↓	-
341	HSP 10		Q64433	8	40	4	-	↑	-
342	HSP 40 A1		Q3TK61	8	11	16	↑	↓	↑
343	HSP 40 A2		Q3TFF0	4	5	9	↑	↓	↑
344	HSP 40 C3		Q3UFV9	3	4	1	-	↓	-
345	HSP 60		Q8C2C7	14	411	49	↑↓	↑↓	↓
346	HSP 75		Q922Z3	3	63	1	-	↓	-
347	HSP 8		Q3U7E2	11	827	9	↑	↑↓	↑
348	HSP 90		P07901	3	81	9	-	↑	-
349	HSP 90-beta		Q71LX8	11	164	16	↑	↑↓	↑
350	HSP A		Q3V015	9	94	36	↑↓	↓	↑↓
351	HSPC117		Q3UDW6	3	3	1	-	↑↓	-
352	Hypoxia up-regulated 1		Q3TAL1	5	35	16	-	↓	-
353	ICOS ligand		Q571G9	2	5	1	-	↑	-
354	Importin alpha-2		Q52L97	8	72	4	↑↓	↑↓	↑↓
355	Importin beta 1		Q6GTI5	9	99	9	↑↓	↓	↑↓
356	Initiation factor	eIF4G2	Q5XKD8	7	36	25	-	↓	-
357	Initiation factor	eIF4A	Q8BVY3	6	32	9	-	↓	-
358	Initiation factor	eIF4G1	Q6NZJ6	8	36	0	-	↓	-
359	Initiation factor	eIF5A1	P63242	8	32	1	-	↓	-
360	Initiation factor	eIF4H	Q9WUK2	7	16	0	-	↓	-
361	Initiation factor	eIF4B	Q3TDD8	3	8	1	-	↓	-
362	Integrin alpha 4		Q6NV53	10	53	25	↑	↑↓	↑
363	Integrin beta 1	Integrin b1	Q8BTU0	16	387	16	↑	↑	↑
364	Integrin beta 2	CD18	Q542I8	14	377	36	↑↓	↑↓	↑↓
365	Integrin beta 4 binding protein		Q3UA13	3	11	4	-	↑↓	-
366	Interferon inducible protein 1	LRG-47	Q5NCB5	5	10	25	↑	↑	↑
367	Interleukin 2 receptor gamma chain	IL2Rgamma	Q3UPA9	4	6	1	↑	↑	↑
368	Interleukin enhancer-binding factor 2		Q3UXI9	6	31	16	-	↑↓	-
369	Inward rectifier potassium channel 2	Kir2.1	Q543W5	5	12	1	-	↓	-
370	IQ motif containing GTPase activating 1	IQGAP1	Q80UW7	5	24	16	-	↑↓	-
371	Isocitrate dehydrogenase 3 beta		Q91VA7	5	8	1	-	↓	-
372	Isocitrate dehydrogenase alpha		Q9D6R2	7	30	0	↑↓	↓	↑↓
373	KDEL receptor 2		Q4FK20	7	18	4	-	↓	-
374	Keratin		Q6IFT3	8	47	1	↑	↑	↑
375	Kinesin 16A		Q8BZZ9	3	3	1	-	↑↓	-
376	Kirsten rat sarcoma oncogene 2		Q3U2W7	4	37	9	↑↓	↑↓	↑↓
377	L-lactate dehydrogenase		Q99K20	3	5	9	-	↑↓	-
378	L1cam		Q6PGJ3	5	12	9	-	↓	-
379	Lamin-A/C	Lamin-A/C	Q3UCA0	11	440	64	↑↓	↓	↑↓

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
380	Lamin-B receptor	Lamin-B R	Q3U9G9	9	82	9	↑↓	↓	↑↓
381	Lamin-B1	Lamin-B1	Q8C553	11	163	36	↑↓	↑↓	↑↓
382	Lamina-associated polypeptide 1B		Q3U7A4	3	4	4	-	↑↓	-
383	LAMP-1	LAMP-1	Q3TX84	13	187	16	↑	↑	↑
384	LAMP-2	LAMP-2	Q3UIW3	11	128	9	↑	↑	↑
385	LDL-R	LDLR	Q3U8R7	11	73	25	↑	↑	↑
386	LDL-R-related protein-associated protein 1		Q6PB52	3	3	1	-	↑	-
387	Lectin mannose-binding 2	Lman2	Q8BJL4	4	9	9	-	↓	-
388	Lectin, galactose binding, soluble 9	Gal9	Q99L83	3	5	4	-	↑↓	-
389	Legumain	Legumain	Q3UE99	7	30	1	-	↑↓	-
390	Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein 1		Q8BK13	3	10	1	-	↑↓	-
391	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	OTase	Q8C129	12	107	36	↑	↑↓	↑
392	LIMP II	LIMP-2	Q3UNF8	11	60	16	↑	↑	↑↓
393	Lin 7		Q3TTY6	2	2	1	-	↑↓	-
394	Lmbrd1		Q8R3D6	2	5	1	-	↑↓	-
395	LR8	LR8	Q9WU52	4	10	9	↑	↑	↑
396	LRP 130		Q6PB66	5	15	9	-	↑↓	-
397	LRP1	LRP1	Q920Y4	11	171	36	↑	↑↓	↑
398	Lymphocyte antigen 86		Q5D046	10	23	9	↑	↑	↑
399	Lyn	Lyn	P25911	13	80	0	↑	↑↓	↑
400	Lysophospholipase 2	Lypla2	Q3TJD6	2	2	1	-	↑↓	-
401	Lysophospholipase 3	Lypla3	Q3U303	4	6	4	-	↑↓	-
402	Lysosomal acid lipase 1	Lipa	Q3TEL5	10	209	16	↑	↑	↑
403	Lysosomal alpha-glucosidase		Q3UJB2	2	3	4	-	↑↓	-
404	Lysosomal protective protein	Cath A	Q544R6	9	128	25	-	↑↓	-
405	Lysosomal thioesterase PPT2	PPT2	O35448	5	10	1	-	↑	-
406	Lysosomal thiol reductase	GILT	Q3U0F9	7	26	9	-	↑↓	-
407	Lysozyme C type M	Lysozyme C-2	Q3U5Q2	15	158	1	↑↓	↓	↑
408	Macf1b	MACF1	Q4PLL5	5	24	4	-	↑↓	-
409	Macrophage capping protein	CapG	Q3UJ44	9	32	9	-	↓	-
410	Mg lectin 1		Q91YT3	5	16	1	-	↑	-
411	MIF		P34884	6	10	4	-	↓	-
412	MAGUK p55		Q9JLB0	5	16	0	-	↑↓	-
413	Malate dehydrogenase 2		Q8R1P0	11	108	25	S	↓	↑
414	M-6-phosphate-uncovering enzyme		Q3U273	7	13	4	-	↑	-
415	Mannosidase alpha-B		Q3TBM1	4	18	4	-	↑↓	-
416	MAP1A/1B light chain 3 B	LC3	Q3U9W5	6	9	1	↑	↑	↑
417	Matrin 3		Q3TTX0	6	38	4	-	↑↓	-
418	MDL-1		Q3UV97	3	8	1	-	↑↓	-
419	Mdc 1		Q52KG1	3	4	1	-	↑↓	-
420	Mesoderm development candidate 2		Q91WK8	2	2	1	-	↓	-
421	Metadherin		Q3TAB3	2	2	1	-	↑↓	-
422	Metaxin-1		P47802	3	4	4	-	↓	-
423	M cyclohydrolase		Q3U8E7	5	6	9	-	↓	-
424	Methylsterol monooxygenase		Q543V8	2	4	4	-	↑↓	-
425	Methyltransferase		P13864	6	25	0	-	↑↓	-
426	MHC class I H-2D	MHC I H2D	P01900	9	242	25	↑↓	↑	↑↓

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
427	MHC class I H2-K	MHC I H2K	Q6RJ37	7	119	25	↑	↑	↑
428	MHC class II li	MHC II li	P04441	9	68	0	↑	↑	↑
429	MIP-1-beta		Q5QNV9	3	3	1	-	↑↓	-
430	Mitochondrialpeptidase alpha		Q8BK51	3	3	1	-	↑↓	-
431	Map2k1ip1	MP1	Q3TX23	13	88	9	S	↑	↓
432	Moesin		Q3UL28	10	112	64	↑↓	↑↓	↑
433	MPS1		Q61889	14	156	25	↑	↑↓	↑
434	mRNA-associated		Q6PAS9	3	6	4	-	↓	-
435	Multifunctional protein ADE2		Q9DCL9	5	11	9	-	↓	-
436	Myb-binding protein 1A		Q3U2W2	9	389	36	↑↓	↑↓	↑↓
437	Myeloid-associated diff. marker		Q0VE46	4	25	9	↑	↑↓	↑
438	Myoferlin		Q69ZN7	9	90	25	↑	↓	↑
439	Myosin heavy chain 9	Myosin hc	Q3UHU4	9	100	49	↑	↑↓	↑
440	Myosin lc		O08834	3	3	9	↑↓	-	↑↓
441	Myosin light chain 2	Myosin lc	Q9CQL8	9	23	16	↑	↑	↑
442	Myosin light chain 6	Myosin lc	Q60605	9	34	0	↑	↑	↑
443	Na K-ATPase alpha-1	Na/K ATPase	Q8VDN2	15	1205	25	↑↓	↓	↑
444	Na K-ATPase alpha-3	Na/K ATPase	Q6PIC6	4	392	9	-	↓	-
445	Na/K-ATPase beta-3		Q544Q7	16	167	9	↑↓	↓	↑↓
446	Na/K-ATPase gamma		Q923I3	5	6	4	-	↑	-
447	NADH dehydrogenase 1 alpha 10		Q3UKK0	5	6	4	-	↓	-
448	NADH dehydrogenase 1 alpha 12		Q3TIA0	3	3	1	-	↑↓	-
449	NADH dehydrogenase 1 alpha 9		Q6GTD3	3	3	1	-	↓	-
450	NADH dehydrogenase 1 beta 4		Q9DBH2	7	9	1	↓	↓	↓
451	NADH dehydrogenase Fe-S protein 3		Q8BTZ3	2	4	1	-	↓	-
452	NADH dehydrogenase Fe-S protein 5		Q99LY9	4	6	1	-	↓	-
453	NADH-cytochrome b5 reductase 1		Q9DB73	6	12	9	-	↓	-
454	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75		Q3TIU7	4	10	4	-	↓	-
455	Nascent polypeptide-associated alpha	NAC-Alpha	Q3UK68	3	3	4	-	↑↓	-
456	NCU-G1		Q3TUF5	7	39	9	-	↑	-
457	NDP kinase B		Q5NC82	7	95	4	-	↑	-
458	NEM-sensitive fusion protein	NSF	Q923C6	9	52	36	-	↑↓	-
459	Nesprin-3		Q8C117	2	2	1	-	↑↓	-
460	Neuropilin 1		Q6PAR3	7	47	16	↑↓	↑↓	↑↓
461	Neuropilin 2		Q5SRM6	4	6	4	-	↓	-
462	NHP2-like protein 1		Q3UY64	10	89	9	↓	↓	↓
463	Nicastrin	NCSTN	Q3T9E5	16	225	36	↑	↑	↑
464	Niemann Pick type C1	NPC1	Q3U2B2	6	12	1	↑	↑↓	↑
465	Niemann Pick type C2	NPC2	Q3U3C2	8	32	9	-	↑	-
466	NIMA-interacting 1		Q3UTI7	5	8	16	-	↑↓	-
467	Nono		Q3TFC2	8	105	16	-	↑↓	-
468	Noxp70		Q9CQB5	9	17	4	↑↓	↑↓	↑↓
469	Nuclear mitotic apparatus protein 1		Q80Y35	5	45	4	-	↑↓	-
470	Nuclear protein		Q6P5E5	7	42	25	↑↓	↓	↑↓
471	Nuclear protein		Q6A026	5	22	25	↑↓	↑↓	↑↓
472	Nuclear protein		Q3TUA1	4	98	9	-	↑↓	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
473	Nuclear protein		Q91ZH2	6	59	4	-	↓	-
474	Nuclear protein		Q8BQD8	8	137	16	↑↓	↑↓	↑↓
475	Nuclear protein		Q3U6D2	5	11	16	↑↓	↑↓	↑↓
476	Nuclear protein		Q3TCI1	4	12	9	-	↑	-
477	Nuclear protein		Q3TFC8	5	20	9	-	↓	-
478	Nuclear protein		Q5SQB0	9	103	9	↑↓	↑↓	↑↓
479	Nuclear protein		Q3UL43	4	8	16	-	↓	-
480	Nuclear protein		Q9D7J2	7	25	16	-	↓	-
481	Nuclear protein		Q8VCY6	4	6	9	-	↓	-
482	Nuclear protein		Q61769	6	15	9	-	↑↓	-
483	Nuclear protein		Q3UJZ4	4	5	4	-	↓	-
484	Nuclear protein		Q3TSI2	6	8	9	-	↑↓	-
485	Nuclear protein		Q3TF41	5	12	9	-	↑	-
486	Nuclear protein		Q3UGJ7	6	11	9	-	↓	-
487	Nuclear protein		Q7TPD0	3	4	4	-	↓	-
488	Nuclear protein		Q3U4W9	3	9	1	-	↑↓	-
489	Nuclear protein		Q9CT32	2	2	1	-	↑↓	-
490	Nuclear protein		Q3UZA3	2	3	1	-	↑↓	-
491	Nuclear protein		Q4FJX1	2	2	1	-	↑↓	-
492	Nuclear protein		Q3TPG3	2	2	1	-	↑↓	-
493	Nuclear protein		Q8R081	7	330	49	↑↓	↑↓	↑↓
494	Nucleoplasmin-3		Q3UJ58	4	6	1	-	↑↓	-
495	Nucleoside diphosphate kinase A		Q5NC81	4	87	1	-	↑	-
496	Nup205		Q6PDG0	6	61	9	-	↓	-
497	Oas1a		Q3UEC1	7	19	9	↑	↓	↑
498	Ornithine aminotransferase		Q3UKT3	3	9	16	-	↓	-
499	Oxalosuccinate decarboxylase		P54071	3	5	0	-	↑↓	-
500	Oxysterol-binding protein		Q69ZJ4	2	2	4	-	↓	-
501	p100 co-activator		Q3UZI3	4	24	4	-	↓	-
502	p15PAF		Q4VAG2	3	5	4	-	↓	-
503	p21-Rac1	Rac1	P63001	5	53	9	-	↓	-
504	P2X purinoceptor 7	P2X7	Q3UM93	2	2	4	-	↓	-
505	Palmitoyl-protein thioesterase 1		Q3TEL0	11	380	4	↑	↑	↑↓
506	Paraspeckle 1		Q3TUK2	3	4	1	-	↑↓	-
507	Peptidyl-tRNA hydrolase 2		Q5SXR0	4	6	4	-	↑↓	-
508	Peptidylprolyl isomerase A		Q9CWJ5	12	117	36	↑	↑	↑
509	Peptidylprolyl isomerase B	PPase	P24369	14	64	4	↑	↓	↑
510	Peroxiredoxin 1		Q3UBV4	12	75	16	↑	↑	↑
511	Peroxiredoxin 4	Prx-4	Q3U8E4	4	36	9	-	↑	-
512	Peroxiredoxin 5		Q91YU9	4	4	1	-	↓	-
513	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	CALM	Q3TD51	9	30	9	↑↓	↓	↑↓
514	Phosphoglycerate kinase 1		Q3UKV8	5	16	25	-	↑↓	-
515	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	Q9DBJ1	5	14	16	-	↓	-
516	Phospholipid scramblase 3	PLSCR3	Q5F284	3	8	1	-	↑↓	-
517	PKC substrate 80K-H		Q3TWG2	3	3	4	-	↑↓	-
518	PM calcium-transporting ATPase 1	PMCA1	Q8K314	6	60	25	↑↓	↓	↑↓
519	PM calcium-transporting ATPase 1	P-type ATPase	Q3TC38	7	53	4	↑↓	↑↓	↑↓
520	PHD-containing Q1		Q3TCY2	2	3	1	-	↓	-
521	Plectin 7		Q6S388	5	20	16	-	↑↓	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
522	Plexin-B2		Q3UH76	8	433	16	↑↓	↑↓	↑
523	Pol		P70355	3	352	25	-	↑	-
524	Polr2e		Q8R0H0	3	9	1	-	↑↓	-
525	Polybromo-1		Q8BSQ9	3	12	1	-	↑↓	-
526	Polymerase		Q3U8U8	6	68	9	-	↓	-
527	Polymerase		Q3UDD3	3	4	9	-	↓	-
528	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase		Q3T9F5	2	2	1	-	↑↓	-
529	GalNAc-T11	Galnt11	Q3TT83	8	18	1	↑	↑↓	↑
530	PP2A-alpha	PP2A	Q76MZ3	3	4	9	-	↑↓	-
531	pre-mRNA processing factor		Q3TP64	4	10	9	-	↑↓	-
532	pre-mRNA processing factor 8		Q3UNG1	2	19	4	-	↑↓	-
533	Presenilin 1	PSEN1	Q3TDW2	7	17	4	↑↓	↑↓	↑↓
534	PRL-2	PRL2	Q3U1K7	5	8	16	-	↓	-
535	Probable RNA-binding protein 25		Q3UQU7	6	48	4	-	↓	-
536	Profilin 1		Q5SX49	13	78	9	↑	↑	↑↓
537	Progesterone receptor 1		Q3TFP8	5	9	4	-	↑↓	-
538	Programmed cell death 6	ALG2	Q8C5M4	10	40	16	↑	↑	↑
539	Programmed cell death 6 interacting	ALIX	Q3TED2	14	224	64	↑	↑↓	↑
540	Brox	Brox	Q8K2Q7	6	28	25	-	↑↓	-
541	Prohibitin		Q3UB75	11	57	16	↑	↑↓	↑
542	Prohibitin 2		Q3V235	11	33	16	↑	↓	↑
543	Proliferation-associated 2G4		Q3UMW2	2	2	1	-	↑↓	-
544	Prolyl 4-hydroxylase	P4hb	Q3UDR2	9	48	49	-	↑↓	-
545	Prosaposin		Q3TWM9	4	33	9	-	↑	-
546	Proteasome 26S non subunit 13	Proteasome	Q3TB19	1 (1)	1	1	-	↑	-
547	Proteasome 26S subunit 7	Proteasome	Q3TW61	5	5	1	-	↓	-
548	Proteasome alpha 2	Proteasome	Q8BKE0	1 (1)	1	1	-	↑↓	-
549	Proteasome beta 2	Proteasome	Q8BJX0	3	3	4	-	↑	-
550	Proteasome beta 4	Proteasome	Q3U0S0	1 (1)	1	1	-	↑↓	-
551	Proteasome component C9	Proteasome	Q3TL95	1 (1)	1	1	-	↓	-
552	Proteasome subunit beta type 3	Proteasome	Q545G0	1 (1)	1	1	-	↑↓	-
553	Protein disulfide-isomerase A4		Q6NXW4	3	4	9	-	↑↓	-
554	Protein kinase C delta	PKCdelta	Q80UN7	3	4	4	-	↓	-
555	Protein phosphatase 1 gamma	Ppp1cc	Q3U7K1	4	46	16	-	↑↓	-
556	Protein spinster homolog 1		Q99LN7	5	8	4	-	↑↓	-
557	Proteolipid protein 2	Plp2	Q58E29	4	6	1	-	↑↓	-
558	Putative protein		Q3UNW7	6	33	9	-	↑↓	-
559	Putative protein		Q9CQ22	15	182	16	↑	↑	↑
560	Putative protein		Q3V1X6	6	58	4	-	↑↓	-
561	Putative protein		Q3UKH4	5	11	4	-	↓	-
562	Putative protein		Q8BRB8	2	6	4	-	↑↓	-
563	Putative protein		Q8C4D5	8	55	1	↓	↓	↓
564	Putative protein		Q9CZV9	8	14	16	↑	↑	↓
565	Putative protein		Q6A0D1	3	3	4	-	↓	-
566	Putative protein		Q3V3G1	5	7	4	-	↓	-
567	Putative protein		Q3UJA1	3	8	4	↑↓	↑↓	↑↓
568	Putative protein		Q14C26	3	4	4	-	↓	-
569	Putative protein		Q3TM37	3	5	4	-	↓	-
570	Putative protein		Q9DAM7	2	3	1	-	↑	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
571	Putative protein		O35443	6	7	4	↑	↑↓	H
572	Putative protein		Q9CZM3	2	2	1	↑	-	↑
573	Putative protein		Q8BW77	2	2	1	-	↓	-
574	Putative protein		Q8VCR4	6	10	1	-	↑	-
575	Putative protein		Q8BVV0	2	2	1	-	↓	-
576	Putative protein		Q8BI52	2	2	1	↑	-	↑
577	Putative protein		Q3TS10	4	4	1	-	~	-
578	Putative protein		Q922F6	2	3	1	-	↑	-
579	Putative protein		Q78XF5	5	8	1	-	↓	-
580	Putative protein		Q3TXY2	2	2	1	-	↓	-
581	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 9		Q8C5C3	6	12	1	-	↑↓	-
582	Pyrroline-5-carboxylate reductase-like		Q8R0P9	4	6	4	↑	↑	↑
583	Pyruvate kinase		Q3TBV8	11	48	16	↑	↑	↑
584	Rab GDI beta-2		Q61598	5	10	0	-	↑↓	-
585	Rab-10		Q4FJL0	8	105	9	↑	↑	↑
586	Rab-11A	Rab-11A	Q3V1Z6	7	127	25	-	↑	-
587	Rab-11B	Rab-11B	P46638	5	122	36	-	↑	-
588	Rab-14	Rab-14	Q50HX4	16	160	36	↑	↑↓	↑
589	Rab-1A		Q5SW88	4	97	9	-	↑↓	-
590	Rab-1B		Q0PD66	10	102	9	↑	↑	↑
591	Rab-21		P35282	7	19	16	↑	↑↓	↑
592	Rab-22A		Q0PD34	7	36	9	-	↑↓	-
593	Rab-27A		Q9ERI2	3	3	1	-	↑↓	-
594	Rab-2A		Q0PD65	14	78	16	↑	↑↓	↑
595	Rab-31		Q921E2	11	47	4	↑	↑	↑
596	Rab-32		Q3TXU7	3	3	1	-	↓	-
597	Rab-35		Q3U0T9	14	108	16	↑	↑↓	↑
598	Rab-5A	Rab-5A	Q3UCX7	6	64	25	↑	↓	↑
599	Rab-5B		Q8C458	3	38	9	-	↓	-
600	Rab-5C	Rab-5C	Q3TJ39	16	150	9	↑	↑	↑
601	Rab-6A		Q8VEE5	4	42	1	↑	↑	↑
602	Rab-7	Rab-7	Q4FJQ0	17	683	16	↑	↑	↑
603	Rab-8A		Q0PD50	9	92	9	↓	↑↓	↓
604	Rab-8B		Q0PD49	6	86	9	↑	↑↓	H
605	Rac-2	Rac2	Q3TBC4	10	118	9	↑	↑	↑
606	Lrrc 59	Raftlin	Q3TF84	16	89	9	↑	↓	↑
607	Ral-A		P63321	3	11	16	-	↑↓	-
608	Ran		Q3ULW0	3	4	4	-	↑↓	-
609	Ran GTPase-activating protein 1		Q6NZB5	6	15	9	-	↓	-
610	Rap-1A	Rap-1A	P62835	3	328	16	-	↑↓	-
611	Rap-2b	Rap-2b	Q6ZWR0	10	82	16	↑	↑↓	↑
612	Rap-2c	Rap-2c	Q504Q0	8	65	16	-	↑↓	-
613	RAS 1b		Q52L50	12	407	9	↑	↑	↑
614	Ras GTPase-activating pb 1	G3BP	Q5NCU1	7	43	9	-	↑↓	-
615	Ras suppressor protein 1		Q9D031	6	24	9	-	↑↓	-
616	Ras-related protein Ral-B	RalB	Q8CCG5	8	27	16	↑	↑↓	↑
617	Receptor-interacting ser/thre kinase 1	RIP	Q3U0J3	1 (1)	1	1	-	↑	-
618	Receptor-interacting ser/thre kinase 3	RIP-3	Q3U3Z9	4	7	9	-	↑	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
619	Receptor-type tyr phosphatase alpha		Q91V35	4	7	4	↑	↓	↑
620	Receptor-type tyr phosphatase eta		Q3UH64	5	13	9	-	↑↓	-
621	Regulator of G-protein signaling 1	RGS1	Q3U477	3	9	4	-	↑	-
622	Regulator of G-protein signaling 19	RGS19	Q9CTC4	2	4	1	↑	-	↑
623	Replication factor		Q99J62	4	5	4	-	↑↓	-
624	Replication factor		Q3UDK3	3	3	1	-	↑↓	-
625	Reticulon 4		Q8BH78	7	16	16	↑↓	↓	↑↓
626	Retinoblastoma binding protein 7		Q3UJI2	6	28	9	-	↓	-
627	Rexo2		Q78KL9	3	4	1	-	↑↓	-
628	Rho-GDI alpha		Q8BPI0	6	20	16	-	↓	-
629	RhoA	RhoA	Q9QUI0	10	134	16	↑	↑	↑
630	RhoB	RhoB	Q3TIC2	0 (10)	59	4	-	↑	-
631	RhoG		Q3UDZ1	12	47	9	↑↓	↑↓	↑
632	Ribophorin 1		Q3UC51	10	46	25	↑	↓	↑
633	Ribophorin 2		Q61833	11	191	49	↓	↓	↑
634	Ribosomal protein		Q8BGJ5	6	196	1	-	↑↓	-
635	Ribosomal protein		Q91ZR9	7	198	9	↓	↑↓	↓
636	Ribosomal protein		Q3TMY8	3	13	9	-	↑↓	-
637	Ribosomal protein		Q3TVV6	10	162	16	↑↓	↓	↑↓
638	Ribosomal protein		Q3V269	6	111	4	-	↑↓	-
639	Ribosomal protein		Q35737	5	83	1	-	↓	-
640	Ribosomal protein		Q3THV8	8	36	16	↑	↑	↑
641	Ribosomal protein		Q3TIQ2	13	102	16	↑	↑	↑
642	Ribosomal protein		Q9DAB3	5	74	36	-	↑	-
643	Ribosomal protein		Q58E74	10	36	4	↑	↑	↑
644	Ribosomal protein		Q3U7R8	6	21	9	-	↓	-
645	Ribosomal protein		Q3THV9	4	41	1	-	↑↓	-
646	Ribosomal protein		Q91V55	9	33	4	-	↑	-
647	Ribosomal protein		Q9CX86	6	42	1	-	↑↓	-
648	Ribosomal protein		Q5EBQ6	4	6	9	↑	↓	↑
649	Ribosomal protein		Q9D6G1	7	67	1	↑↓	↑↓	↑↓
650	Ribosomal protein		Q3TKY3	10	33	16	↑↓	↑	↑↓
651	Ribosomal protein		P67984	10	33	4	↑	↓	↑
652	Ribosomal protein		Q9Z204	4	12	0	-	↑↓	-
653	Ribosomal protein		Q99PL5	7	8	9	↑	↑	↑
654	Ribosomal protein		Q8C1L7	8	27	4	-	↑	-
655	Ribosomal protein		Q3UYM0	6	14	4	-	↑↓	-
656	Ribosomal protein		Q922I0	5	11	9	-	↑↓	-
657	Ribosomal protein		Q91VM2	7	22	9	↑	↓	↑
658	Ribosomal protein		Q9Z2X1	3	51	0	-	↑↓	-
659	Ribosomal protein		Q6ZWZ6	6	16	4	-	↑	-
660	Ribosomal protein		Q5FWB6	7	18	9	↑	↑	↑
661	Ribosomal protein		Q9D7S7	3	13	0	-	↓	-
662	Ribosomal protein		Q8VC94	10	20	1	↑	↑↓	↑
663	Ribosomal protein		Q9JJI8	9	22	9	↓	↓	↑
664	Ribosomal protein		P61358	5	5	4	↑	↓	↑
665	Ribosomal protein		Q3THM9	5	9	9	↑	↓	↑
666	Ribosomal protein		Q3TKR5	5	7	9	↑	↓	↑
667	Ribosomal protein		Q9D8Q1	2	3	1	↑	-	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
668	Ribosomal protein		Q3UW83	8	14	9	-	↑	-
669	Ribosomal protein		Q3UX80	3	6	1	-	↑↓	-
670	Ribosomal protein		Q9Z130	3	15	1	-	↑↓	-
671	Ribosomal protein		Q8CCF0	2	4	4	-	↓	-
672	Ribosomal protein		Q4FZE6	5	16	4	-	↑↓	-
673	Ribosomal protein		Q9R0Y0	5	16	4	-	↑↓	-
674	Ribosomal protein		Q3U9T9	3	5	1	-	↑↓	-
675	Ribosomal protein		P62264	6	17	4	-	↓	-
676	Ribosomal protein		Q497D7	9	19	4	↑	↓	↑
677	Ribosomal protein		Q3UCL7	3	4	9	↑	↓	↑
678	Ribosomal protein		Q58E35	6	15	4	-	↑	-
679	Ribosomal protein		Q9CY93	4	6	4	↑	↑	↑
680	Ribosomal protein		Q5BLK2	7	13	4	-	↑	-
681	Ribosomal protein		P62270	3	4	4	-	↑	-
682	Ribosomal protein		Q542K7	2	2	1	↑	-	↑
683	Ribosomal protein		Q91YK6	3	7	1	-	↑	-
684	Ribosomal protein		Q3V424	3	4	4	-	↓	-
685	Ribosomal protein		Q3THU4	7	23	4	↑↓	↓	↑↓
686	Ribosomal protein		Q3UB68	5	6	1	↑	↑↓	↑
687	Ribosomal protein		Q8BTB8	4	5	1	-	↓	-
688	Ribosomal protein		Q5BKQ7	10	33	1	↓	↑	↓
689	Ribosomal protein		Q3TKJ3	4	6	1	-	↓	-
690	Ribosomal protein		Q542U7	3	3	1	-	↑↓	-
691	Ribosomal protein		P58064	2	3	1	-	↓	-
692	Ribosomal protein		Q3TQ66	2	3	1	-	↑↓	-
693	Ring finger protein 149		Q3U2C5	3	3	1	-	↑	-
694	RNA binding		Q8CFQ9	6	14	9	-	↓	-
695	RNA binding		Q9CWZ3	3	10	0	-	↑↓	-
696	RNA binding		Q9R0B2	6	13	4	-	↑↓	-
697	RNA binding		Q64012	3	3	0	-	↑↓	-
698	RNA enzyme		Q9CZQ0	4	7	9	-	↑↓	-
699	RNA helicase		Q3U837	3	7	1	-	↑↓	-
700	RNA-binding		Q545K5	6	30	9	-	↓	-
701	RNA-binding protein		Q8C2Q3	4	11	0	-	↑↓	-
702	RuvB-like protein 1		Q3UJN2	6	17	9	-	↓	-
703	RuvB-like protein 2		Q9WTM5	6	12	16	-	↓	-
704	S100 calcium-binding protein A11		P50543	3	3	4	-	↑	-
705	SAC1		Q99K33	2	2	1	-	↓	-
706	Sam68		Q3U8T3	4	9	9	-	↓	-
707	SAR1a GTP-binding protein		Q3TXJ4	8	61	16	-	↑	-
708	SAR1b GTP-binding protein		Q3U281	3	35	1	-	↑	-
709	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	SERCA2	O55143	9	60	0	↑↓	↓	↑↓
710	Scavenger receptor A	SR A	Q3U2C3	18	300	25	↑↓	↓	↑
711	Scavenger receptor B1	SR B	Q3TZ42	13	124	9	↑↓	↓	↑
712	Scrib		Q6P9N3	2	3	1	-	↓	-
713	SCY1-like protein 1		Q8K222	2	2	1	-	↓	-
714	SEC22 like 1	Sec22b	Q3UZ06	8	16	4	↑	↑↓	↑
715	Sec23B		Q8CDS4	3	3	4	-	↑↓	-
716	Sec61 alpha-1		Q3TXA5	6	26	9	-	↓	-
717	Secretory carrier membrane protein 1		Q3UY11	4	7	4	-	↓	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
718	Secretory carrier membrane protein 2		Q3TAL2	13	64	4	↑↓	↑↓	↑↓
719	Secretory carrier membrane protein 3		Q3TDM8	12	69	1	↑↓	↓	↑
720	Selenoprotein T		Q8CHV4	2	2	1	-	↑↓	-
721	Serine carboxypeptidase	Risc	Q9D625	8	89	16	-	↑	-
722	Serine hydroxymethyl transferase 2		Q3TFD0	7	44	16	↑↓	↑↓	↑↓
723	Serine incorporator 3	AIGP-1	Q3U7C6	9	38	16	↑	↑↓	↑
724	Serine protease 15	LONP	Q3TZW3	5	16	9	-	↑↓	-
725	Serine/threonine protein phosphatase	Ppp2cb	Q8VED4	3	3	1	-	↓	-
726	Ser/thre kinase MRCK alpha		Q3UU96	2	2	1	↑	-	↑
727	Ser/thre phosphatase 1 subunit 10		Q80W00	3	4	0	-	↑↓	-
728	Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1		Q3U8N1	3	8	4	-	↑↓	-
729	SET		Q5U445	6	19	1	-	↑↓	-
730	SF3b14b		Q3TQX7	2	3	1	-	↑↓	-
731	Sideroflexin-1		Q3UB44	5	13	9	-	↓	-
732	Signal peptidase	SPC22	Q8C1D0	3	3	1	-	↓	-
733	Signal recognition particle 14		Q3TIK2	4	5	1	-	↓	-
734	SRP receptor subunit beta		Q544X9	8	34	9	↑	↓	↑
735	SRP alpha	SIRPalpha	Q6P6I8	10	142	9	↑↓	↑↓	↑↓
736	Similar to cyclin I		Q3TQZ0	2	2	4	-	↑↓	-
737	SMC hinge domain containing 1		Q6P5D8	5	7	9	↑↓	↓	↑↓
738	SNAP-23		Q35620	15	80	25	↑	↑	↑
739	SNAP-29		Q3UGN0	4	51	9	↑	↑	↑
740	SNAP-alpha		Q543I3	11	83	9	↑	↑	↑
741	SNAP-associated protein	Snapin	Q3UY32	2	2	1	-	↓	-
742	SNAP-gamma		Q8C1T5	5	10	9	↑	↑	↑
743	SNF2L1		Q3UDA4	2	3	4	-	↓	-
744	SNF2L4		Q3URH5	4	10	4	↑↓	↓	↑↓
745	SNF7 protein 2	CHMP5	Q3UI64	3	3	4	↑	↑↓	↑
746	snRNA-associated		Q3TIX3	4	6	9	-	↑↓	-
747	snRNA-associated		Q3U9X2	5	6	1	-	↓	-
748	snRNA-associated		Q9QXA5	5	5	1	-	↓	-
749	Snat 1	SNAT1	Q8BHI3	9	65	1	-	↓	-
750	Snat 2	SNAT2	Q8CD21	12	78	9	↑↓	↓	↑
751	Solute carrier family 12 member 7	K-Cl co-transporter	Q3UE50	7	67	4	↑↓	↓	↑↓
752	Solute carrier family 15 member 3	PHT2	Q8BPX9	6	9	16	↑	↑	↑↓
753	Solute carrier family 16 member 1	MCT1	Q8BPS5	9	90	16	↑↓	↑↓	↑↓
754	Solute carrier family 2 member 1	GLUT1	Q3TD17	10	39	36	↑	↓	↑
755	Solute carrier family 2 member 6	GLUT6	Q3UDF0	8	43	4	↑↓	↑↓	↑↓
756	Solute carrier family 23 member 2	Slc23a2	Q9EPR4	4	10	0	-	↓	-
757	Solute carrier family 25 member 13		Q8C140	2	5	4	-	↓	-
758	Solute carrier family 25 member 3	Slc25a3	Q3UB63	6	32	4	-	↓	-
759	Solute carrier family 29 member 1	ENT1	Q9JIM1	3	5	0	-	↑	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
760	Solute carrier family 7 member 1	CAT1	Q3TQZ8	10	25	9	↑↓	↑↓	↑↓
761	Solute carrier family 7 member 5	CD98 lc	Q3UQM7	11	202	25	↑↓	↓	↑↓
762	Sorting nexin-12		Q6ZWQ5	2	3	9	-	↑↓	-
763	Sorting nexin-3	SNX3	Q78ZM0	10	91	16	↑	↑	↑
764	Sorting nexin-17	SNX17	Q8R0N8	3	4	4	↑	↑↓	↑
765	Sorting nexin-18		Q3UPB9	4	6	4	↑	↑↓	↑
766	Splicing factor		Q8VIJ6	6	118	25	-	↑↓	-
767	Splicing factor		Q8QZY9	6	10	4	-	↑↓	-
768	Splicing factor 3a		Q58E59	2	5	4	-	↑↓	-
769	Splicing factor 3A subunit 2		Q62203	2	2	4	-	↑↓	-
770	Splicing factor 3b		Q3UGI3	3	10	4	-	↑↓	-
771	Splicing factor 3b		Q3US00	6	10	4	-	↑↓	-
772	Splicing regulatory protein		Q3U0V1	4	7	4	-	↑↓	-
773	Spred-1		Q924S8	4	11	0	-	↑↓	-
774	Squalene epoxidase	Sqle	Q3TSS7	4	6	1	-	↓	-
775	Squalene synthase	Sqls	Q9QYT0	3	6	4	-	↓	-
776	SRp20		Q3U781	2	2	1	-	↑↓	-
777	Stathmin Phosphoprotein p19		P54227	3	3	1	-	↑	-
778	Sterol O-acyltransferase	Soat1	Q8C795	4	7	1	-	↓	-
779	Stomatin	Stomatin	O88988	17	412	25	↑	↑↓	↑
780	Stromal antigen 1		Q6P5D1	2	3	1	-	↑↓	-
781	Stromal cell derived factor receptor 2		Q3UMF5	3	6	1	-	↓	-
782	Succinate dehydrogenase		Q921P5	7	34	1	-	↓	-
783	Succinate dehydrogenase		Q3TE45	4	5	9	-	↑↓	-
784	Superoxide dismutase 2	Sod2	Q8VEM5	4	9	9	-	↑↓	-
785	Surfeit 4		Q3U7E6	5	20	4	↑↓	↑↓	↑↓
786	SWI/SNF A		Q8BVB6	3	7	1	↑↓	-	↑↓
787	SWI/SNF C		Q6PDG5	3	20	0	-	↑↓	-
788	SWI/SNF C 1		P97496	6	40	0	-	↑↓	-
789	Synaptobrevin-like 1	VAMP-7	P70280	5	14	9	↑	↑↓	↑
790	Synaptogyrin-2		Q3TCK2	11	29	4	↑	↑	↑
791	Synaptotagmin binding protein		Q68ED6	6	13	16	-	↑↓	-
792	Syndecan binding protein	Sdcbp	Q3TMX0	13	184	9	↑	↑	↑
793	Syntaxin binding protein 3		Q3TE73	3	4	1	-	↓	-
794	Syntaxin-12		Q3UIV9	0 (14)	88	4	-	↑↓	-
795	Syntaxin-16		Q8C0W8	9	43	1	-	↑	-
796	Syntaxin-2		Q3TN38	5	10	4	-	↓	-
797	Syntaxin-3		Q3UZ19	5	5	9	↑	↓	↑
798	Syntaxin-4		Q3UKQ8	4	6	1	-	↓	-
799	Syntaxin-5		Q8K1E0	3	4	0	-	↑↓	-
800	Syntaxin-6		Q9D729	0 (7)	19	25	-	↑↓	-
801	Syntaxin-7		O70439	6	190	16	-	↑↓	-
802	Syntaxin-8		Q5F234	9	19	9	↑	↑↓	↑
803	T-cell activation protein		Q9CQL7	2	3	1	-	↓	-
804	Talin-1	Talin-1	Q80TM2	6	74	25	-	↑↓	-
805	TAP binding protein	Tapasin	Q8C6N4	3	3	1	-	↓	-
806	Target of Myb 1		Q3V4C6	3	6	1	-	↑	-
807	TCP-1-delta		P80315	5	5	4	-	↓	-
808	TCP-1-zeta		Q8VEI1	5	6	1	-	↑	-
809	TDP-43		Q8BUM1	6	77	1	-	↓	-

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
810	TGF-beta receptor type-2		Q3UG22	2	2	4	↑	-	↑
811	Thioredoxin		Q9D8R0	7	9	1	-	↓	-
812	Thioredoxin domain containing 4		Q3URM4	6	11	9	-	↓	-
813	Thioredoxin domain containing 5		Q3UWX1	4	8	1	-	↑↓	-
814	Thioredoxin protein 1		Q3UCI8	4	10	1	↑	↓	↑
815	Thioredoxin protein 14		Q8BW13	2	3	1	-	↓	-
816	THO complex subunit 4		O08583	5	11	0	-	↓	-
817	Thymidine kinase 1		Q58EU0	3	6	1	-	↑↓	-
818	Thymopietin		Q61029	9	92	0	↓	↓	↑
819	Thyroid hormone receptor associated 3		Q8BZN7	3	7	4	-	↓	-
820	TIAP		O70201	3	3	0	-	↓	-
821	Tim17-A		Q545U2	3	4	9	-	↑↓	-
822	Tmed9		Q9CX02	7	29	4	↑	↑	↑
823	Tmem4		Q3UBH8	4	4	1	-	↑↓	-
824	Tmem9		Q3U459	2	5	1	-	↓	-
825	TMP21-I	TMP21-I	Q3U7I7	10	37	16	↑	↓	↑
826	Toll-like receptor 2	TLR2	Q8K3D9	6	36	4	-	↑↓	-
827	Toll-like receptor 7	TLR7	Q548J0	14	84	25	↑	↑↓	↑
828	TOM22		Q9D8D3	6	10	4	-	↓	-
829	TOM34		Q812F2	2	2	1	-	↓	-
830	Tomm20		Q4KL41	3	4	4	-	↑↓	-
831	Topoisomerase		Q01320	3	15	4	↑↓	↑↓	↑↓
832	TPR		Q7M739	6	37	16	-	↑↓	-
833	Transcription factor		Q3UJR8	6	29	16	-	↓	-
834	Transferrin receptor		Q61560	15	408	36	↑	↑	↑
835	Transgelin 2		Q3TIB8	11	218	16	↑↓	↑	↑↓
836	Transketolase		Q3U7Y1	7	15	9	↑↓	↑↓	↑↓
837	Translation initiation factor		Q3ULL5	2	2	1	-	↓	-
838	Translationally-contr. tumor protein		Q3UAG7	2	5	1	-	↑↓	-
839	Transmembrane 9-2		Q8C7F9	3	5	4	-	↑	-
840	Transmembrane 9-3		Q8C6F5	3	5	1	-	↓	-
841	Transmembrane emp24 5		Q3TDS6	8	17	4	↑	↑↓	↑
842	Transmembrane protein 111		Q3TIK3	2	2	4	-	↓	-
843	Transmembrane protein 59		Q3TWB4	3	3	1	↑	-	↑
844	Transmembrane protein 87A		Q8BTV9	2	2	1	-	↑	-
845	TRAP-alpha		Q3TV94	10	21	4	↓	~	↓
846	TRAP-delta	TRAP-d	Q3TVJ8	10	37	1	S	↓	↑
847	TRAP-gamma		Q4FK79	10	19	1	↑↓	↓	↑↓
848	Tcof 1		Q6PFZ6	6	18	1	-	↓	-
849	TREM-2		Q99NH8	7	90	4	-	↑	-
850	Trifunctional protein alpha		Q5U5Y5	6	12	9	↑↓	↓	↑↓
851	Triosephosphate isomerase		Q64513	6	11	9	-	↑↓	-
852	Tripartite motif protein 14	Tmp 14	Q14AR3	4	12	25	↑	↑↓	↑
853	Tripartite motif protein 28		Q3UDN8	2	8	1	-	↑↓	-
854	Trk-fused		Q9D828	3	9	9	-	↑↓	-
855	Tropomyosin 3 gamma		P21107	4	10	0	-	↓	-
856	Tsg 101	TSG101	Q3UK08	2	2	9	-	↑↓	-
857	Tubulin alpha 2		Q4KMW2	13	62	16	↑	↑	↑
858	Tubulin beta 5		Q3UF52	5	61	36	↑	↑	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
859	Tumor protein D52		Q545M5	5	67	9	↑	↑	↑
860	Tumor protein D52-like 2		Q3TAI4	5	107	4	-	↑	-
861	Twinfilin-2		Q9Z0P5	3	3	0	-	↑↓	-
862	Txndc7		Q922R8	12	152	9	↑	↑	↑
863	TYRO		Q3U419	10	51	4	↑↓	↓	↑↓
864	Tyrosine 3-monooxygenase		Q5SS40	10	74	25	↑	↑	↑
865	Tyr phosphatase non-receptor type 6	SHP1	P29351	4	7	0	↑	↑↓	↑
866	UBE-1c1		Q9R1R5	3	5	9	-	↓	-
867	Ub-cytochrome c reductase core 1		Q3TIC8	6	14	9	-	↑↓	-
868	Ub-cytochrome-c reductase 3-6		Q8K2E2	4	5	9	-	↓	-
869	Ub-cytochrome-c reductase core 2		Q9DB77	7	48	16	↑↓	↓	↑↓
870	Ubiquitin		Q64223	15	457	1	↑	↑	↑
871	Ubiquitin protein ligase		Q3TXI7	2	2	4	↑	-	↑
872	Ubiquitin-associated 2-like	Ub-a2	Q80X50	3	10	0	-	↓	-
873	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	E2	Q3TSL6	2	4	4	-	↑	-
874	Ubiquitin-conjugating enzyme E2		P68037	8	20	1	-	↓	-
875	Ubiquitin-conjugating enzyme E2		Q9ERI7	3	6	4	-	↑	-
876	Ubiquitin-conjugating enzyme E2		Q3U5V6	2	2	1	-	↑	-
877	Ubiquitin-like		Q3U9D7	3	16	4	-	↑↓	-
878	UDP glycosyltransferase 1	UGT1	Q6ZQM8	2	7	4	-	↑↓	-
879	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	Galnt7	Q3U8I4	4	8	4	-	↓	-
880	Unc-93B	Unc-93B	Q3TNR9	12	78	36	↑	↑↓	↑
881	UPF0539		Q8CEW4	3	4	4	-	↑↓	-
882	V0-ATPase a1		Q3TXT5	3	14	9	↑	-	↑
883	V0-ATPase a3		Q9JHF5	10	163	36	↑	↑↓	↑
884	V0-ATPase d		Q54A57	10	70	36	↑	↑↓	↑
885	V1-ATPase A1		Q3TKS0	13	223	25	↑	↑↓	↑
886	V1-ATPase B2		Q3TL62	14	220	25	↑	↑	↑
887	V1-ATPase C		Q9Z1G3	9	83	49	↑↓	↑	↑↓
888	V1-ATPase D		Q3UK81	9	19	4	↑	↑	↑
889	V1-ATPase E		Q3UK59	12	212	4	S	↑	↓
890	V1-ATPase F		Q3U6X0	7	18	16	-	↑	-
891	V1-ATPase G1		Q9CR51	6	100	4	-	↑	-
892	V1-ATPase G1		Q3U7E0	2	70	1	-	↑	-
893	V1-ATPase H		Q3U9S9	3	5	4	-	↑	-
894	V1-ATPase S1		Q3UWN7	3	9	1	↑	-	↑
895	Vacuolar protein sorting 35	VPS35	Q3TKU6	7	28	16	-	↑↓	-
896	Vacuolar protein sorting 4b	VPS4B	Q3U8P5	4	5	1	-	↑↓	-
897	VPS 13C		Q8BX70	2	2	1	↑	-	↑
898	VPS 28	VPS28	Q8BMZ7	3	4	9	↑	↑↓	↑
899	VPS 37C	VPS37	Q8R105	3	5	16	-	↓	-
900	Valosin containing protein	p97 ATPase	Q8BNF8	6	18	9	-	↑↓	-
901	VAMP-2		P63044	3	47	1	-	↓	-
902	VAMP-3		Q3TH70	11	67	4	↑↓	↑↓	↓
903	VAMP-A	VAP-A	Q3TJM1	11	42	9	↑	↑↓	↑
904	VAMP-B	VAP-B	Q9QY76	5	22	16	↑	↑	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
905	VAMP4		Q8BSN6	13	59	16	↑	↑↓	↑
906	Vasodilator-stimulated p-protein	VASP	Q3U0C2	6	11	16	-	↓	-
907	VAT-1		Q5RKP0	6	11	1	-	↓	-
908	Vimentin	Vimentin	O08704	18	808	81	↑	↑↓	↑
909	VDAC 1	VDAC-1	Q3U6K8	7	18	25	↓	↓	↓
910	VDAC 2	VDAC-2	Q78MH6	11	40	16	↓	↓	↑
911	Vps25	VPS25	Q3UBT0	2	2	4	-	↑↓	-
912	Vti1-like 2	Vti1a	O89116	8	22	9	↑	↑↓	↑
913	Vti1-like1	Vti1b	Q9Z2P7	8	18	9	↑	↑↓	↑
914	WBRS9		Q3USR7	5	10	1	-	↑↓	-
915	WD repeat-containing protein 43		Q68FC6	4	8	1	-	↑↓	-
916	Weakly similar to CBL27		Q3UHC0	4	5	1	-	↑	-
917	Y box transcription factor		Q71V06	8	42	9	-	↑↓	-
918	Zinc finger CDGSH protein 1		Q3V2I3	5	8	1	-	↓	-
919	Zinc finger protein 162		Q3TZI3	6	48	9	-	↓	-
920	ZIP4	ZIP4	Q8CHL4	10	23	16	↑↓	↑↓	↑↓
921	Pon3		Q99JS7	2	2	1	-	↓	-

Table Legend Replicates Number of times that at least one prorated peptide was attributed to this protein in one of the 18 samples (DRM and DSM from 3 timepoints in triplicates)

T peptides Total peptide count

U peptides Uniques peptides count

DRM Variation of the prorated peptide count in Detergent Resistant Membranes (~ Membrane Rafts) subfraction

DSM Variation of the prorated peptide count in Detergent Soluble Membranes (Rest of the phagosome) subfraction

Ratio DRM/DSM

↑ Increasing peptide count

↓ Decreasing peptide count

↑↓ Maximal peptide count at 30-30

S Stable in DRM

~ Stable or lower at 30-30 in DSM

H Ratio stable near 1

() Replicates using total peptides insted of prorated peptides count

Supplementary Table 2. List of the 350 proteins present in phagosomal DRMs

Supplementary Table 2. List of the 350 protein present in phagosomal DRMs

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
1	F1-ATPase beta	F1-ATPase beta	Q3TX28	14	490	4	↓	↓	↓
2	Cytochrome b5 reductase		Q9DCN2	7	25	9	↓	↓	↓
3	Cytochrome b5 A		Q3TN44	9	50	9	↓	↓	↑
4	Hnrnpa3		Q6P6I7	8	158	9	↓	↑↓	↓
5	NHP2-like protein 1		Q3UY64	10	89	9	↓	↓	↓
6	Guanine nucleotide exchange factor 2	GEF2	Q3TBI4	7	46	4	↓	↓	↓
7	Putative protein		Q8C4D5	8	55	1	↓	↓	↓
8	FXYD 5	FXYD 5	Q3TDW1	15	51	4	↓	↓	↓
9	NADH dehydrogenase 1 beta 4		Q9DBH2	7	9	1	↓	↓	↓
10	Ribophorin 2		Q61833	11	191	49	↓	↓	↑
11	Ribosomal protein		Q91ZR9	7	198	9	↓	↑↓	↓
12	Rab-8A		Q0PD50	9	92	9	↓	↑↓	↓
13	Ribosomal protein		Q9JJ18	9	22	9	↓	↓	↑
14	Ribosomal protein		Q5BKQ7	10	33	1	↓	↑	↓
15	Thymopoietin		Q61029	9	92	0	↓	↓	↑
16	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC-2	Q78MH6	11	40	16	↓	↓	↑
17	Voltage-dependent anion channel 1	VDAC-1	Q3U6K8	7	18	25	↓	↓	↓
18	TRAP-alpha		Q3TV94	10	21	4	↓	~	↓
19	ERp60		Q3UZK8	11	232	36	↑	↑↓	↑
20	Annexin A2	Annexin A2	P07356	16	609	25	↑	↑	↑
21	Cytochrome b-245 heavy chain	gp91phox	Q3U6G0	15	232	36	↑	↓	↑
22	Elongation factor	eEF-1A	Q3UA81	17	759	25	↑	↓	↑
23	Cathepsin D	Cath D	Q3U7P0	13	891	49	↑	↑	↑
24	Extended-synaptotagmin-1		Q3U7R1	7	56	4	↑	↓	↑
25	Env		Q04586	17	596	36	↑	↑	↑
26	Acyl-CoA synthetase 4	Acsl4	Q91YN3	12	128	36	↑	↓	↑
27	ASCT2	ASCT2	Q3UFR4	17	415	25	↑	↓	↑
28	ATP-binding cassette B1	ABCB1	P06795	13	116	25	↑	↑↓	↑
29	ADP-ribosylation factor 1	Arf 1	P84078	11	158	25	↑	↑	↑
30	Calreticulin		Q3UWP8	9	63	9	↑	↓	↑
31	Cathepsin Z	Cath Z	Q545I6	10	124	16	↑	↑	↑
32	Alpha enolase		Q9DCY7	11	71	25	↑	↑↓	↑
33	EH-D4		Q3TWP9	6	15	25	↑	↑↓	↑
34	CD14		Q91V69	13	230	36	↑	↑	↑↓
35	Cofilin 1		P18760	13	316	9	↑	↑	↑
36	Ceroid-lipofuscinosis neuronal 2	TPP-1	Q3U2Z6	10	162	9	↑	↑	↑
37	Aldehyde dehydrogenase 3 B1		Q3U3J9	8	12	16	↑	↓	↑
38	Ankfy1	Ankfy1	Q5SPW9	5	19	25	↑	↑↓	↑
39	Clathrin heavy polypeptide		Q5SXR6	7	14	16	↑	↑	↑
40	CSF-1-R		Q3U4N8	12	103	4	↑	↓	↑
41	CD13	CD13	Q3TB69	9	32	25	↑	↑↓	↑
42	Acid ceramidase	Asah1	Q3U646	8	109	16	↑	↑	↑
43	ADP-ribosylation factor 6		P62331	11	59	25	↑	↑	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
44	14-3-3 zeta	14-3-3z	Q3TSF1	10	65	25	↑	↑↓	↑
45	CD44	CD44	P15379	18	207	0	↑	↑↓	↑
46	Cytoskeleton-associated protein 5	Ckap5	Q80U79	4	10	4	↑	↓	↑
47	ATP-binding cassette B6	ABCB6	Q9DC29	9	23	9	↑	↑↓	↑
48	ADP/ATP translocase 2		Q61311	9	26	1	↑	↓	↑
49	Collectin 12	Collectin 12	Q3TYT8	10	23	4	↑	↓	↑
50	CD68		P31996	13	74	0	↑	↑	↓
51	Adenine phosphoribosyltransferase APRT		P08030	7	18	16	↑	↑↓	↑
52	CREG		Q3UNP8	8	130	4	↑	↑	↑
53	Arl 15	Arl 15	Q8BGR6	6	6	16	↑	~	↑
54	Beta-2 microglobulin	B2m	Q91XJ8	12	61	4	↑	↑	↑
55	CHMP4b	CHMP4B	Q3TXM7	8	13	9	↑	~	H
56	Cytokeratin-1		Q149E0	5	53	1	↑	↑↓	↑
57	CapZ alpha-1	CapZ	Q3UAS2	5	6	9	↑	↑	↑
58	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II		Q5I0X8	6	8	4	↑	↑↓	↑
59	Acid phosphatase 2		Q3U4F3	4	13	4	↑	↑	↑
60	Albumin 1		Q8C7C7	18	312	1	↑	↓	↑
61	Complement 5 receptor 1	C5aR	Q3UCS9	5	14	4	↑	↓	↑
62	BRI3		Q3U0F3	8	11	4	↑	↑↓	↑
63	Arl 1	Arl 1	Q3TIR2	3	3	4	↑	↓	↑
64	Amyloid beta A4		Q8BPC7	4	5	4	↑	↑	↑
65	Env		Q3TTS2	8	10	1	↑	↑↓	↑
66	Cytokeratin-6A		Q8K2E4	5	5	1	↑	↑	↑
67	Cytokeratin-6B		Q9CV72	12	25	1	↑	↑	↓
68	CSP		P60904	4	4	1	↑	↑	↑
69	Cytokeratin-2e		Q3TTY5	5	7	1	↑	↑	↑
70	LRP1	LRP1	Q920Y4	11	171	36	↑	↑↓	↑
71	Myosin heavy chain 9	Myosin hc	Q3UHU4	9	100	49	↑	↑↓	↑
72	HSP 8		Q3U7E2	11	827	9	↑	↑↓	↑
73	G alpha i2	Galpha	Q3TXK7	17	833	1	↑	↑↓	↑
74	Myoferlin		Q69ZN7	9	90	25	↑	↓	↑
75	G alpha i3	Galpha	Q3TGV1	16	210	16	↑	↑↓	↑
76	MPS1		Q61889	14	156	25	↑	↑↓	↑
77	Integrin beta 1	Integrin b1	Q8BTU0	16	387	16	↑	↑	↑
78	HSP 90-beta		Q71LX8	11	164	16	↑	↑↓	↑
79	Lysosomal acid lipase 1	Lipa	Q3TEL5	10	209	16	↑	↑	↑
80	Lyn	Lyn	P25911	13	80	0	↑	↑↓	↑
81	G beta 2	Gbeta	P62880	18	304	16	↑	↑	↑
82	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	OTase	Q8C129	12	107	36	↑	↑↓	↑
83	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	P16858	15	341	4	↑	↑↓	↑
84	LDL-R	LDLR	Q3U8R7	11	73	25	↑	↑	↑
85	G beta 1	Gbeta	P62874	15	235	25	↑	↑	↑
86	Nicastrin	NCSTN	Q3T9E5	16	225	36	↑	↑	↑
87	MHC class I H2-K	MHC I H2K	Q6RJ37	7	119	25	↑	↑	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
88	G alpha 13		Q3UE40	12	103	25	↑	↑↓	↑
89	Golgi apparatus protein 1	ESL-1	Q61543	13	36	49	↑	↑↓	↑
90	Myosin light chain 6	Myosin lc	Q60605	9	34	0	↑	↑	↑
91	Integrin alpha 4		Q6NV53	10	53	25	↑	↑↓	↑
92	Histone		Q0VDL9	10	271	4	↑	↑	↓
93	LAMP-1	LAMP-1	Q3TX84	13	187	16	↑	↑	↑
94	Putative protein		Q9CQ22	15	182	16	↑	↑	↑
95	Galectin-3	Gal3	Q3V471	14	472	16	↑	↑	↑
96	Ferritin light chain 1		Q8WUQ8	11	107	4	↑	↑	↑
97	Glucosylceramidase precursor	Gba	Q78NR7	10	40	36	↑	↑	↑
98	LIMP II	LIMP-2	Q3UNF8	11	60	16	↑	↑	↑↓
99	G alpha		P63094	9	74	0	↑	↑↓	↑
100	Histone		P15864	3	21	4	↑	↑↓	↑
101	Histone		P43274	2	17	9	↑	↑↓	↑
102	Myosin light chain 2	Myosin lc	Q9CQL8	9	23	16	↑	↑	↑
103	LAMP-2	LAMP-2	Q3UIW3	11	128	9	↑	↑	↑
104	Lymphocyte antigen 86		Q5D046	10	23	9	↑	↑	↑
105	MHC class II li	MHC II li	P04441	9	68	0	↑	↑	↑
106	Interferon inducible protein 1	LRG-47	Q5NCB5	5	10	25	↑	↑	↑
107	HSP 40 A1		Q3TK61	8	11	16	↑	↓	↑
108	Fragilis	Fragilis	Q9CQW9	18	490	4	↑	↑	↑
109	Fc gamma receptor II	FcgammaRII	P08101	12	60	0	↑	↑	↑↓
110	Formin-like 1		Q3TY82	7	46	9	↑	↑↓	↑
111	Histone		Q9CRM8	2	3	1	↑	~	↑
112	Putative protein		Q9CZV9	8	14	16	↑	↑	↓
113	Glycerol-3-phosphate transporter	SPX2	Q6P4P0	13	80	1	↑	↑↓	↑
114	Golgi SNAP 1	GS28	Q91VU9	4	8	4	↑	↓	↑
115	Flotillin 1	Flotillin 1	Q3TJS0	1	1	9	↑	~	↑
116	Ferritin heavy chain		Q3UI44	10	26	9	↑	↑	↑
117	Myeloid-associated differentiation marker		Q0VE46	4	25	9	↑	↑↓	↑
118	Fragilis R	Fragilis R	Q99J93	11	39	9	↑	↑↓	↓
119	HSP 40 A2		Q3TFF0	4	5	9	↑	↓	↑
120	LR8	LR8	Q9WU52	4	10	9	↑	↑	↑
121	G beta 2		Q3TKQ0	3	3	9	↑	↑↓	↑
122	Niemann Pick type C1	NPC1	Q3U2B2	6	12	1	↑	↑↓	↑
123	Keratin		Q6IFT3	8	47	1	↑	↑	↑
124	Putative protein		O35443	6	7	4	↑	↑↓	H
125	Flotillin 2	Flotillin 2	Q60634	1	1	0	↑	~	↑
126	MAP1A/1B light chain 3 B	LC3	Q3U9W5	6	9	1	↑	↑	↑
127	Interleukin 2 receptor gamma chain	IL2Rgamma	Q3UPA9	4	6	1	↑	↑	↑
128	Putative protein		Q9CZM3	2	2	1	↑	~	↑
129	Putative protein		Q8BI52	2	2	1	↑	~	↑
130	Programmed cell death 6 interacting protein	ALIX	Q3TED2	14	224	64	↑	↑↓	↑
131	Rab-7	Rab-7	Q4FJQ0	17	683	16	↑	↑	↑
132	RAS 1b		Q52L50	12	407	9	↑	↑	↑
133	SNAP-alpha		Q54313	11	83	9	↑	↑	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
134	Prohibitin		Q3UB75	11	57	16	↑	↑↓	↑
135	Peptidylprolyl isomerase A		Q9CWXJ5	12	117	36	↑	↑	↑
136	Raftlin	Raftlin	Q3TF84	16	89	9	↑	↓	↑
137	Palmitoyl-protein thioesterase 1		Q3TELO	11	380	4	↑	↑	↑↓
138	Rab-14	Rab-14	Q50HX4	16	160	36	↑	↑↓	↑
139	Pyruvate kinase		Q3TBV8	11	48	16	↑	↑	↑
140	Ribophorin 1		Q3UC51	10	46	25	↑	↓	↑
141	Rab-2A		Q0PD65	14	78	16	↑	↑↓	↑
142	Rab-5C	Rab-5C	Q3TJ39	16	150	9	↑	↑	↑
143	Prohibitin 2		Q3V235	11	33	16	↑	↓	↑
144	Ribosomal protein		Q3THV8	8	36	16	↑	↑	↑
145	SNAP-23		O35620	15	80	25	↑	↑	↑
146	Peroxiredoxin 1		Q3UBV4	12	75	16	↑	↑	↑
147	Oas1a		Q3UEC1	7	19	9	↑	↓	↑
148	Ribosomal protein		Q3TIQ2	13	102	16	↑	↑	↑
149	Rap-2b	Rap-2b	Q6ZWR0	10	82	16	↑	↑↓	↑
150	Signal recognition particle receptor subunit beta		Q544X9	8	34	9	↑	↓	↑
151	Peptidylprolyl isomerase B	PPlase	P24369	14	64	4	↑	↓	↑
152	Solute carrier family 2 member 1	GLUT1	Q3TD17	10	39	36	↑	↓	↑
153	SNAP-29		Q3UGN0	4	51	9	↑	↑	↑
154	RhoA	RhoA	Q9QUI0	10	134	16	↑	↑	↑
155	Rab-31		Q921E2	11	47	4	↑	↑	↑
156	Rab-1B		Q0PD66	10	102	9	↑	↑	↑
157	Rab-5A	Rab-5A	Q3UCX7	6	64	25	↑	↓	↑
158	Ribosomal protein		Q58E74	10	36	4	↑	↑	↑
159	Rab-21		P35282	7	19	16	↑	↑↓	↑
160	Ras-related protein Ral-B	RalB	Q8CCG5	8	27	16	↑	↑↓	↑
161	Serine incorporator 3	AIGP-1	Q3U7C6	9	38	16	↑	↑↓	↑
162	Programmed cell death 6	ALG2	Q8C5M4	10	40	16	↑	↑	↑
163	Rac-2	Rac2	Q3TBC4	10	118	9	↑	↑	↑
164	SNAP-gamma		Q8C1T5	5	10	9	↑	↑	↑
165	Rab-8B		Q0PD49	6	86	9	↑	↑↓	H
166	Ribosomal protein		Q5EBQ6	4	6	9	↑	↓	↑
167	Rab-10		Q4FJL0	8	105	9	↑	↑	↑
168	Rab-35		Q3U0T9	14	108	16	↑	↑↓	↑
169	Profilin 1		Q5SX49	13	78	9	↑	↑	↑↓
170	Solute carrier family 15 member 3	PHT2	Q8BPX9	6	9	16	↑	↑	↑↓
171	Ribosomal protein		P67984	10	33	4	↑	↓	↑
172	Ribosomal protein		Q99PL5	7	8	9	↑	↑	↑
173	SEC22 like 1	Sec22b	Q3UZ06	8	16	4	↑	↑↓	↑
174	Ribosomal protein		Q91VM2	7	22	9	↑	↓	↑
175	Pyrroline-5-carboxylate reductase-like		Q8R0P9	4	6	4	↑	↑	↑
176	SNF7 protein 2	CHMP5	Q3UI64	3	3	4	↑	↑↓	↑
177	Ribosomal protein		Q5FWB6	7	18	9	↑	↑	↑
178	Rab-6A		Q8VEE5	4	42	1	↑	↑	↑
179	Ribosomal protein		Q8VC94	10	20	1	↑	↑↓	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
180	Ribosomal protein		P61358	5	5	4	↑	↓	↑
181	Ribosomal protein		Q3THM9	5	9	9	↑	↓	↑
182	Ribosomal protein		Q3TKR5	5	7	9	↑	↓	↑
183	Ribosomal protein		Q9D8Q1	2	3	1	↑	~	↑
184	Ribosomal protein		Q497D7	9	19	4	↑	↓	↑
185	Ribosomal protein		Q3UCL7	3	4	9	↑	↓	↑
186	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha		Q91V35	4	7	4	↑	↓	↑
187	Ribosomal protein		Q9CY93	4	6	4	↑	↑	↑
188	Ribosomal protein		Q542K7	2	2	1	↑	~	↑
189	Ribosomal protein		Q3UB68	5	6	1	↑	↑↓	↑
190	Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha		Q3UU96	2	2	1	↑	~	↑
191	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11	Galnt11	Q3TT83	8	18	1	↑	↑↓	↑
192	Regulator of G-protein signaling 19	RGS19	Q9CTC4	2	4	1	↑	~	↑
193	Vimentin	Vimentin	O08704	18	808	81	↑	↑↓	↑
194	V1-ATPase B2		Q3TL62	14	220	25	↑	↑	↑
195	V1-ATPase A1		Q3TKS0	13	223	25	↑	↑↓	↑
196	V0-ATPase a3		Q9JHF5	10	163	36	↑	↑↓	↑
197	Transferrin receptor		Q61560	15	408	36	↑	↑	↑
198	V0-ATPase d		Q54A57	10	70	36	↑	↑↓	↑
199	Toll-like receptor 7	TLR7	Q548J0	14	84	25	↑	↑↓	↑
200	Txndc7		Q922R8	12	152	9	↑	↑	↑
201	Tubulin beta 5		Q3UF52	5	61	36	↑	↑	↑
202	Tripartite motif protein 14	Tmp 14	Q14AR3	4	12	25	↑	↑↓	↑
203	Unc-93B	Unc-93B	Q3TNR9	12	78	36	↑	↑↓	↑
204	Stomatin	Stomatin	O88988	17	412	25	↑	↑↓	↑
205	Tubulin alpha 2		Q4KMW2	13	62	16	↑	↑	↑
206	Tumor protein D52		Q545M5	5	67	9	↑	↑	↑
207	Syndecan binding protein	Sdcbp	Q3TMX0	13	184	9	↑	↑	↑
208	Sorting nexin 3	SNX3	Q78ZM0	10	91	16	↑	↑	↑
209	V0-ATPase a1		Q3TXT5	3	14	9	↑	~	↑
210	Synaptobrevin-like 1	VAMP-7	P70280	5	14	9	↑	↑↓	↑
211	Tyrosine 3-monooxygenase		Q5SS40	10	74	25	↑	↑	↑
212	V1-ATPase D		Q3UK81	9	19	4	↑	↑	↑
213	Vti1-like 2	Vti1a	O89116	8	22	9	↑	↑↓	↑
214	TMP21-I	TMP21-I	Q3U7I7	10	37	16	↑	↓	↑
215	Vti1-like1	Vti1b	Q9Z2P7	8	18	9	↑	↑↓	↑
216	VAMP4		Q8BSN6	13	59	16	↑	↑↓	↑
217	VAMP-A	VAP-A	Q3TJM1	11	42	9	↑	↑↓	↑
218	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	VPS28	Q8BMZ7	3	4	9	↑	↑↓	↑
219	Sorting nexin-18		Q3UPB9	4	6	4	↑	↑↓	↑
220	Syntaxin-8		Q5F234	9	19	9	↑	↑↓	↑
221	VAMP-B	VAP-B	Q9QY76	5	22	16	↑	↑	↑
222	Syntaxin-3		Q3UZI9	5	5	9	↑	↓	↑
223	TGF-beta receptor type-2		Q3UG22	2	2	4	↑	~	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
224	Ubiquitin		Q64223	15	457	1	↑	↑	↑
225	Tmed9		Q9CX02	7	29	4	↑	↑	↑
226	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	SHP1	P29351	4	7	0	↑	↑↓	↑
227	Thioredoxin domain-containing protein 1		Q3UCI8	4	10	1	↑	↓	↑
228	Ubiquitin protein ligase		Q3TXI7	2	2	4	↑	~	↑
229	Synaptogyrin-2		Q3TCK2	11	29	4	↑	↑	↑
230	Sorting nexin-17	SNX17	Q8R0N8	3	4	4	↑	↑↓	↑
231	V1-ATPase S1		Q3UWN7	3	9	1	↑	~	↑
232	Transmembrane emp24 5		Q3TDS6	8	17	4	↑	↑↓	↑
233	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C		Q8BX70	2	2	1	↑	~	↑
234	Transmembrane protein 59		Q3TWB4	3	3	1	↑	~	↑
235	Malate dehydrogenase 2		Q8R1P0	11	108	25	S	↓	↑
236	Mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1	MP1	Q3TX23	13	88	9	S	↑	↓
237	V1-ATPase E		Q3UK59	12	212	4	S	↑	↓
238	TRAP-delta	TRAP-d	Q3TVJ8	10	37	1	S	↓	↑
239	CD180	Rp105	Q3U0U7	18	416	25	↑↓	↑	↑
240	AP-2 beta-1	AP-2	Q9DBG3	7	193	49	↑↓	↑↓	↑↓
241	CD98	CD98 hc	Q54AH5	18	838	9	↑↓	↑↓	↑
242	Dolichyl-diphosphooligosaccharide	Rpn1	Q5RKP4	13	80	25	↑↓	↓	↑
243	Calnexin	Calnexin	Q3TXE5	16	213	9	↑↓	↓	↑
244	Cyclophilin C-associated protein	CyCAP	O35649	10	278	16	↑↓	↑↓	↑↓
245	Aldehyde dehydrogenase 2		Q3UJW1	8	34	25	↑↓	↑↓	↑↓
246	CD166		O70136	14	121	36	↑↓	↑↓	↑↓
247	DEAD 5		Q3UXW3	8	121	9	↑↓	↓	↑↓
248	Cathepsin B	Cath B	Q3TVS6	10	249	9	↑↓	↑	↑↓
249	CD5		Q91X69	14	168	16	↑↓	↓	↑↓
250	CD49e		Q80YP5	13	47	25	↑↓	↓	↑↓
251	Cell adhesion molecule 1	NECL-2	Q7TNL1	11	124	4	↑↓	↓	↑↓
252	AHNAK		Q6UL10	12	66	16	↑↓	↓	↑↓
253	ADP-ribosyltransferase 1		Q3TF18	5	8	16	↑↓	↑↓	↑↓
254	Elongation factor	eEF-1B	Q3THP5	8	45	4	↑↓	↑↓	↑↓
255	ATP-binding cassette C1	ABCC1	O35379	7	32	25	↑↓	↑↓	↑↓
256	Complement	p32-RACK	Q8R5L1	10	90	9	↑↓	↓	↑↓
257	CD316		Q8R366	5	16	16	↑↓	↓	↑↓
258	Basigin	CD147	O55108	16	156	9	↑↓	↑↓	↑↓
259	Actinin alpha 4		Q3UDJ7	7	24	4	↑↓	↑↓	↑↓
260	CD Man-6-P receptor	M6PR	Q3UF03	17	276	16	↑↓	↑	↑
261	CD9		Q3U9W0	11	111	4	↑↓	↓	↑↓
262	Elmo 1	ELMO1	Q8BSY9	3	5	4	↑↓	↓	↑↓
263	ADP-dependent glucokinase		Q3UDS7	4	8	4	↑↓	↓	↑↓
264	CD43		Q544C5	12	25	9	↑↓	↑	↑↓
265	Calmodulin		P62204	5	9	4	↑↓	↑↓	↑↓
266	Citrate synthase		Q3UDP3	8	64	9	↑↓	↓	↑↓
267	Aspartate-beta-hydroxylase		Q8CBM2	8	12	9	↑↓	↓	↑

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
268	Chloride intracellular channel 1	CLIC1	Q9Z1Q5	6	13	1	↑↓	↑↓	↑↓
269	EFR3 homolog A		Q8BXQ7	4	5	4	↑↓	↑↓	↑↓
270	F1-ATPase alpha	F1-ATPase alpha	Q3U452	5	5	4	↑↓	↓	↑↓
271	ADAM 17	ADAM 17	Q3UEC0	4	6	4	↑↓	↓	↑↓
272	BRI3-binding protein		Q8BXP1	7	10	1	↑↓	↑↓	↑↓
273	Cytochrome b-245 light chain	p22phox	Q3U820	9	38	4	↑↓	↑↓	↑
274	EVI-2A		Q3TBB7	9	20	1	↑↓	↑↓	↑↓
275	Crry		Q64735	4	5	0	↑↓	↑↓	↑↓
276	Na K-ATPase alpha-1	Na/K ATPase	Q8VDN2	15	1205	25	↑↓	↓	↑
277	Myb-binding protein 1A		Q3U2W2	9	389	36	↑↓	↑↓	↑↓
278	HSP 60		Q8C2C7	14	411	49	↑↓	↑↓	↓
279	Integrin beta 2	CD18	Q542I8	14	377	36	↑↓	↑↓	↑↓
280	Lamin-A/C	Lamin-A/C	Q3UCA0	11	440	64	↑↓	↓	↑↓
281	Importin beta 1		Q6GTI5	9	99	9	↑↓	↓	↑↓
282	Moesin		Q3UL28	10	112	64	↑↓	↑↓	↑
283	Nuclear protein		Q6P5E5	7	42	25	↑↓	↓	↑↓
284	Helicase		O09060	12	150	9	↑↓	↓	↑
285	Lamin-B1	Lamin-B1	Q8C553	11	163	36	↑↓	↑↓	↑↓
286	HSP A		Q3V015	9	94	36	↑↓	↓	↑↓
287	Importin alpha-2		Q52L97	8	72	4	↑↓	↑↓	↑↓
288	Nuclear protein		Q6A026	5	22	25	↑↓	↑↓	↑↓
289	MHC class I H-2D	MHC I H2D	P01900	9	242	25	↑↓	↑	↑↓
290	Nuclear protein		Q8BQD8	8	137	16	↑↓	↑↓	↑↓
291	Nuclear protein		Q3U6D2	5	11	16	↑↓	↑↓	↑↓
292	Helicase		Q8K2L4	4	36	9	↑↓	↑↓	↑↓
293	Na/K-ATPase beta-3		Q544Q7	16	167	9	↑↓	↓	↑↓
294	HMG- 2		Q3UAZ7	9	63	16	↑↓	↑↓	↑↓
295	Kirsten rat sarcoma oncogene 2		Q3U2W7	4	37	9	↑↓	↑↓	↑↓
296	G alpha q	Galpha	Q6PFF5	11	62	25	↑↓	↑↓	↑↓
297	Histone		Q5T008	18	396	9	↑↓	↑↓	↑
298	Nuclear protein		Q5SQB0	9	103	9	↑↓	↑↓	↑↓
299	Histone		Q3THW5	5	30	9	↑↓	↓	↑↓
300	Neuropilin 1		Q6PAR3	7	47	16	↑↓	↑↓	↑↓
301	Isocitrate dehydrogenase alpha		Q9D6R2	7	30	0	↑↓	↓	↑↓
302	Histone		Q3B7Z8	9	57	16	↑↓	↑↓	↓
303	Histone		Q8CGP3	10	33	9	↑↓	↓	↑↓
304	Lysozyme C type M	Lysozyme C-2	Q3U5Q2	15	158	1	↑↓	↓	↑
305	Histone		P43275	7	26	16	↑↓	↓	↑
306	Histone		Q3TW79	10	43	16	↑↓	↓	↑↓
307	Histone		P84228	12	131	16	↑↓	↑↓	↓
308	Glucosidase 1		Q3U026	5	9	9	↑↓	↓	↑
309	Lamin-B receptor	Lamin-B R	Q3U9G9	9	82	9	↑↓	↓	↑↓
310	Noxp70		Q9CQB5	9	17	4	↑↓	↑↓	↑↓
311	Myosin Ic		O08834	3	3	9	↑↓	~	↑↓
312	SMC hinge domain containing 1		Q6P5D8	5	7	9	↑↓	↓	↑↓
313	Putative protein		Q3UJA1	3	8	4	↑↓	↑↓	↑↓
314	G gamma 2		Q3TYE8	9	15	4	↑↓	↑	↑↓

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
315	Plexin-B2		Q3UH76	8	433	16	↑↓	↑↓	↑
316	Nuclear protein		Q8R081	7	330	49	↑↓	↑↓	↑↓
317	Signal-regulatory protein alpha	SIRPalha	Q6P6I8	10	142	9	↑↓	↑↓	↑↓
318	Serine hydroxymethyl transferase 2		Q3TFD0	7	44	16	↑↓	↑↓	↑↓
319	Solute carrier family 12 member 7	K-Cl co-transporter	Q3UE50	7	67	4	↑↓	↓	↑↓
320	Ribosomal protein		Q3TVV6	10	162	16	↑↓	↓	↑↓
321	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	PMCA1	Q8K314	6	60	25	↑↓	↓	↑↓
322	Scavenger receptor B1	SR B	Q3TZ42	13	124	9	↑↓	↓	↑
323	Solute carrier family 16 member 1	MCT1	Q8BPS5	9	90	16	↑↓	↑↓	↑↓
324	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	SERCA2	O55143	9	60	0	↑↓	↓	↑↓
325	RhoG		Q3UDZ1	12	47	9	↑↓	↑↓	↑
326	Secretory carrier membrane protein 2		Q3TAL2	13	64	4	↑↓	↑↓	↑↓
327	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	SNAT2	Q8CD21	12	78	9	↑↓	↓	↑
328	Scavenger receptor A	SR A	Q3U2C3	18	300	25	↑↓	↓	↑
329	Solute carrier family 2 member 6	GLUT6	Q3UDF0	8	43	4	↑↓	↑↓	↑↓
330	Ribosomal protein		Q9D6G1	7	67	1	↑↓	↑↓	↑↓
331	Ribosomal protein		Q3TKY3	10	33	16	↑↓	↑	↑↓
332	SNF2L4		Q3URH5	4	10	4	↑↓	↓	↑↓
333	Reticulon 4		Q8BH78	7	16	16	↑↓	↓	↑↓
334	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	CALM	Q3TD51	9	30	9	↑↓	↓	↑↓
335	Presenilin 1	PSEN1	Q3TDW2	7	17	4	↑↓	↑↓	↑↓
336	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	P-type ATPase	Q3TC38	7	53	4	↑↓	↑↓	↑↓
337	Secretory carrier membrane protein 3		Q3TDM8	12	69	1	↑↓	↓	↑
338	Ribosomal protein		Q3THU4	7	23	4	↑↓	↓	↑↓
339	Transgelin 2		Q3TIB8	11	218	16	↑↓	↑	↑↓
340	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2		Q9DB77	7	48	16	↑↓	↓	↑↓
341	ZIP4	ZIP4	Q8CHL4	10	23	16	↑↓	↑↓	↑↓
342	V1-ATPase C		Q9Z1G3	9	83	49	↑↓	↑	↑↓
343	Topoisomerase		Q01320	3	15	4	↑↓	↑↓	↑↓
344	Solute carrier family 7 member 5	CD98 lc	Q3UQM7	11	202	25	↑↓	↓	↑↓
345	Solute carrier family 7 member 1	CAT1	Q3TQZ8	10	25	9	↑↓	↑↓	↑↓
346	Transketolase		Q3U7Y1	7	15	9	↑↓	↑↓	↑↓
347	VAMP-3		Q3TH70	11	67	4	↑↓	↑↓	↓
348	Trifunctional protein alpha		Q5U5Y5	6	12	9	↑↓	↓	↑↓
349	Surfeit 4		Q3U7E6	5	20	4	↑↓	↑↓	↑↓
350	TYRO		Q3U419	10	51	4	↑↓	↓	↑↓
351	TRAP-gamma		Q4FK79	10	19	1	↑↓	↓	↑↓
352	SWI/SNF A		Q8BVB6	3	7	1	↑↓	~	↑↓

#	Protein Name	Short name	Uniprot	Replicates	T peptides	U peptides	DRM	DSM	Ratio
		Table Legend	Replicates	Number of times that at least one prorated peptide was attributed to this protein in one of the 18 samples (DRM and DSM from 3 timepoints in triplicates)					
			T peptides	Total peptide count					
			U peptides	Uniques peptides count					
			DRM	Variation of the prorated peptide count in Detergent Resistant Membranes (~ Membrane Rafts) subfraction					
			DSM	Variation of the prorated peptide count in Detergent Soluble Membranes (Rest of the phagosome) subfraction					
			Ratio	DRM/DSM					
			↑	Increasing peptide count					
			↓	Decreasing peptide count					
			↑↓	Maximal peptide count at 30-30					
			S	Stable in DRM					
			~	Stable or lower at 30-30 in DSM					
			H	Ratio stable near 1					
			()	Replicates using total peptides insted of prorated peptides count					

Supplementary Table 3 Protein-protein interactions from PCA

Supplementary Table 3. Protein-protein interactions from PCA

#	Yeast ID 1	Mouse ID 1	Protein 1	Yeast ID 2	Mouse ID 2	Protein 2
1	YPL119C	O09060	Helicase	YOR204W	O09060	Helicase
2	YNL313C	O70201	TIAP	YOR133W	Q3TMY8	Ribosomal protein
3	YNL138W	P40124	CAP 1	YLR370C	Q3TAT0	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3
4	YNL138W	P40124	CAP 1	YIL034C	Q3TRH8	CapZ beta
5	YNL138W	P40124	CAP 1	YNR035C	Q3U870	Actin-related protein 2/3
6	YNL138W	P40124	CAP 1	YIL062C	Q3UA72	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5
7	YNL138W	P40124	CAP 1	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
8	YNL138W	P40124	CAP 1	YGR080W	Q9Z0P5	Twinfilin-2
9	YNL007C	P60904	CSP	YGL206C	Q5SXR6	Clathrin heavy polypeptide
10	YOR327C	P63044	VAMP-2	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D
11	YOR327C	P63044	VAMP-2	YGL206C	Q5SXR6	Clathrin heavy polypeptide
12	YOR327C	P63044	VAMP-2	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
13	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
14	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1	YBR241C	Q3TD17	Solute carrier family 2 member 1
15	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1	YBR068C	Q3TQZ8	Solute carrier family 7 member 1
16	YNL031C	P84228	Histone	YPL127C	P15864	Histone
17	YNL031C	P84228	Histone	YPL127C	P43274	Histone
18	YNL031C	P84228	Histone	YPL127C	P43275	Histone
19	YNL031C	P84228	Histone	YNL030W	Q0VDL9	Histone
20	YNL031C	P84228	Histone	YPL127C	Q9CRM8	Histone
21	YFL038C	Q0PD49	Rab-8B	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
22	YFL038C	Q0PD49	Rab-8B	YER136W	Q61598	Rab GDI beta-2
23	YFL038C	Q0PD50	Rab-8A	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
24	YFL038C	Q0PD50	Rab-8A	YER136W	Q61598	Rab GDI beta-2
25	YFL038C	Q0PD66	Rab-1B	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
26	YFL038C	Q0PD66	Rab-1B	YER136W	Q61598	Rab GDI beta-2
27	YBR009C	Q0VDL9	Histone	YNL031C	P84228	Histone
28	YBR009C	Q0VDL9	Histone	YNL030W	Q0VDL9	Histone
29	YBR009C	Q0VDL9	Histone	YNL031C	Q3TW79	Histone
30	YLR370C	Q3TAT0	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	YGL206C	Q5SXR6	Clathrin heavy polypeptide
31	YLR370C	Q3TAT0	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
32	YGL006W	Q3TC38	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	YJL154C	Q3TKU6	Vacuolar protein sorting 35
33	YGL006W	Q3TC38	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F
34	YGL006W	Q3TC38	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	YPR036W	Q3U9S9	V1-ATPase H
35	YGL006W	Q3TC38	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D
36	YOR327C	Q3TH70	VAMP-3	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D
37	YOR327C	Q3TH70	VAMP-3	YGL206C	Q5SXR6	Clathrin heavy polypeptide
38	YOR327C	Q3TH70	VAMP-3	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
39	YPL265W	Q3TQZ8	Solute carrier family 7 member 1	YBR068C	Q3TQZ8	Solute carrier family 7 member 1
40	YPL265W	Q3TQZ8	Solute carrier family 7 member 1	YGR055W	Q3UQM7	Solute carrier family 7 member 5
41	YIL034C	Q3TRH8	CapZ beta	YNR035C	Q3U870	Actin-related protein 2/3
42	YIL034C	Q3TRH8	CapZ beta	YIL062C	Q3UA72	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5
43	YIL034C	Q3TRH8	CapZ beta	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
44	YOR261C	Q3TW61	Proteasome 26S non-ATPase regulatory subunit 7	YDR427W	Q3TB19	Proteasome 26S non-ATPase regulatory subunit 13
45	YNL031C	Q3TW79	Histone	YPL127C	P15864	Histone
46	YNL031C	Q3TW79	Histone	YPL127C	P43274	Histone

#	Yeast ID 1	Mouse ID 1	Protein 1	Yeast ID 2	Mouse ID 2	Protein 2
47	YNL031C	Q3TW79	Histone	YPL127C	P43275	Histone
48	YNL031C	Q3TW79	Histone	YNL030W	Q0VDL9	Histone
49	YNL031C	Q3TW79	Histone	YPL127C	Q9CRM8	Histone
50	YLR025W	Q3TXM7	CHMP4b	YDR486C	Q3UI64	SNF7 protein 2
51	YMR054W	Q3TXT5	V0-ATPase a1	YGL006W	Q3TC38	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
52	YMR054W	Q3TXT5	V0-ATPase a1	YPR036W	Q3U9S9	V1-ATPase H
54	YMR054W	Q3TXT5	V0-ATPase a1	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D
55	YMR054W	Q3TXT5	V0-ATPase a1	YGL006W	Q8K314	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
56	YDR388W	Q3U1Q4	Growth factor receptor bound protein 2	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
57	YPL006W	Q3U2B2	Niemann Pick type C1	YGL006W	Q3TC38	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
58	YPL006W	Q3U2B2	Niemann Pick type C1	YGL006W	Q8K314	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
59	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F	YOR270C	Q3TXT5	V0-ATPase a1
60	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F	YPR036W	Q3U9S9	V1-ATPase H
61	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D
62	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F	YOR270C	Q9JHF5	V0-ATPase a3
63	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F	YKL080W	Q9Z1G3	V1-ATPase C
64	YGR284C	Q3U7E6	Surfeit 4	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
65	YGR284C	Q3U7E6	Surfeit 4	YLR378C	Q3TXA5	Sec61 alpha-1
66	YGR284C	Q3U7E6	Surfeit 4	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I
67	YGR284C	Q3U7E6	Surfeit 4	YAR002C-A	Q9CX02	Tmed9
68	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
69	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I	YBR241C	Q3TD17	Solute carrier family 2 member 1
70	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I	YBR068C	Q3TQZ8	Solute carrier family 7 member 1
71	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I	YLR378C	Q3TXA5	Sec61 alpha-1
72	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I	YAR002C-A	Q9CX02	Tmed9
73	YNR035C	Q3U870	Actin-related protein 2/3	YLR370C	Q3TAT0	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3
74	YNR035C	Q3U870	Actin-related protein 2/3	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
75	YBL026W	Q3U9X2	snRNA-associated	YER112W	Q9QXA5	snRNA-associated
76	YPR052C	Q3UAZ7	HMG- 2	YPL127C	P15864	Histone
77	YPR052C	Q3UAZ7	HMG- 2	YPL127C	P43274	Histone
78	YPR052C	Q3UAZ7	HMG- 2	YPL127C	P43275	Histone
79	YPR052C	Q3UAZ7	HMG- 2	YOL012C	Q6RJ37	Histone
80	YPR052C	Q3UAZ7	HMG- 2	YBR154C	Q8R0H0	Polr2e
81	YPR052C	Q3UAZ7	HMG- 2	YPL127C	Q9CRM8	Histone
82	YEL002C	Q3UC51	Ribophorin 1	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I
83	YEL002C	Q3UC51	Ribophorin 1	YAR002C-A	Q9CX02	Tmed9
84	YDR331W	Q3UE99	Legumain	YDR434W	Q6PD26	GPI transamidase component PIG-S
85	YJL109C	Q3UNW7	Putative protein	YDR324C	Q3UJY3	Cirhin
86	YJL109C	Q3V1X6	Putative protein	YDR324C	Q3UJY3	Cirhin
87	YER031C	Q3V1Z6	Rab-11A	YER136W	Q61598	Rab GDI beta-2
88	YFL038C	Q4FJL0	Rab-10	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
89	YFL038C	Q4FJL0	Rab-10	YER136W	Q61598	Rab GDI beta-2
90	YGR060W	Q543V8	Methylsterol monooxygenase	YBR241C	Q3TD17	Solute carrier family 2 member 1
91	YGR060W	Q543V8	Methylsterol monooxygenase	YLR378C	Q3TXA5	Sec61 alpha-1
92	YGR060W	Q543V8	Methylsterol monooxygenase	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I
93	YGR060W	Q543V8	Methylsterol monooxygenase	YAR002C-A	Q9CX02	Tmed9
94	YLR447C	Q54A57	V0-ATPase d	YOR270C	Q3TXT5	V0-ATPase a1
95	YLR447C	Q54A57	V0-ATPase d	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F
96	YLR447C	Q54A57	V0-ATPase d	YPR036W	Q3U9S9	V1-ATPase H
97	YLR447C	Q54A57	V0-ATPase d	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D
98	YLR447C	Q54A57	V0-ATPase d	YOR270C	Q9JHF5	V0-ATPase a3
99	YLR447C	Q54A57	V0-ATPase d	YKL080W	Q9Z1G3	V1-ATPase C

#	Yeast ID 1	Mouse ID 1	Protein 1	Yeast ID 2	Mouse ID 2	Protein 2
100	YFL038C	Q5SW88	Rab-1A	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
101	YFL038C	Q5SW88	Rab-1A	YER136W	Q61598	Rab GDI beta-2
102	YGL049C	Q5XKD8	Initiation factor	YOR204W	O09060	Helicase
103	YDR398W	Q68FC6	WD repeat-containing protein 43	YDR324C	Q3UJY3	Cirhin
104	YDR398W	Q68FC6	WD repeat-containing protein 43	YJL109C	Q3UNW7	Putative protein
105	YDR398W	Q68FC6	WD repeat-containing protein 43	YJL109C	Q3V1X6	Putative protein
106	YHR001W	Q69ZJ4	Oxysterol-binding protein	YGR055W	Q3UQM7	Solute carrier family 7 member 5
107	YHR001W	Q69ZJ4	Oxysterol-binding protein	YKR003W	Q69ZJ4	Oxysterol-binding protein
108	YGL049C	Q6NZJ6	Initiation factor	YOR204W	O09060	Helicase
109	YDL029W	Q6PI31	Actin-like 2	YLR370C	Q3TAT0	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3
110	YDL029W	Q6PI31	Actin-like 2	YNR035C	Q3U870	Actin-related protein 2/3
111	YDL029W	Q6PI31	Actin-like 2	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
112	YOL012C	Q6RJ37	Histone	YPL127C	P15864	Histone
113	YOL012C	Q6RJ37	Histone	YPL127C	P43274	Histone
114	YOL012C	Q6RJ37	Histone	YPL127C	P43275	Histone
115	YOL012C	Q6RJ37	Histone	YPL127C	Q9CRM8	Histone
116	YOR357C	Q6ZWQ5	Sorting nexin 12	YGL203C	Q9D625	Serine carboxypeptidase
117	YAL016W	Q76MZ3	PP2A-alpha	YKL080W	Q9Z1G3	V1-ATPase C
118	YOR357C	Q78ZM0	Sorting nexin 3	YGL203C	Q9D625	Serine carboxypeptidase
119	YNL243W	Q80TM2	Talin-1	YLR370C	Q3TAT0	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3
120	YNL243W	Q80TM2	Talin-1	YNR035C	Q3U870	Actin-related protein 2/3
121	YNL243W	Q80TM2	Talin-1	YIL062C	Q3UA72	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5
122	YNL243W	Q80TM2	Talin-1	YGL206C	Q5SXR6	Clathrin heavy polypeptide
123	YNL243W	Q80TM2	Talin-1	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
124	YFL048C	Q8BJL4	Lectin mannose-binding 2	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
125	YFL048C	Q8BJL4	Lectin mannose-binding 2	YGL006W	Q3TC38	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
126	YFL048C	Q8BJL4	Lectin mannose-binding 2	YBR241C	Q3TD17	Solute carrier family 2 member 1
127	YFL048C	Q8BJL4	Lectin mannose-binding 2	YGR284C	Q3U7E6	Surfeit 4
128	YFL048C	Q8BJL4	Lectin mannose-binding 2	YML012W	Q3U717	TMP21-I
129	YFL048C	Q8BJL4	Lectin mannose-binding 2	YGL006W	Q8K314	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
130	YML092C	Q8BKE0	Proteasome alpha 2	YGR135W	Q3TL95	Proteasome component C9
131	YOR327C	Q8BSN6	VAMP4	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D
132	YOR327C	Q8BSN6	VAMP4	YGL206C	Q5SXR6	Clathrin heavy polypeptide
133	YOR327C	Q8BSN6	VAMP4	YBR234C	Q9WV32	Actin-related protein 2/3
134	YPR029C	Q8BSZ7	AP-1 gamma-1	YJR125C	Q3UPG6	Epsin 4
135	YPR029C	Q8BSZ7	AP-1 gamma-1	YHR108W	Q3V4C6	Target of Myb 1
136	YPR029C	Q8BSZ7	AP-1 gamma-1	YKL135C	Q5SVG5	AP-1 beta-1
137	YPR029C	Q8BSZ7	AP-1 gamma-1	YGL206C	Q5SXR6	Clathrin heavy polypeptide
138	YPR029C	Q8BSZ7	AP-1 gamma-1	YKL135C	Q9DBG3	AP-2 beta-1
139	YLR083C	Q8C7F9	Transmembrane 9 superfamily member 2	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
140	YLR083C	Q8C7F9	Transmembrane 9 superfamily member 2	YGL203C	Q9D625	Serine carboxypeptidase
141	YGL006W	Q8K314	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	YJL154C	Q3TKU6	Vacuolar protein sorting 35
142	YGL006W	Q8K314	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F
143	YGL006W	Q8K314	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	YPR036W	Q3U9S9	V1-ATPase H
144	YGL006W	Q8K314	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D

#	Yeast ID 1	Mouse ID 1	Protein 1	Yeast ID 2	Mouse ID 2	Protein 2
145	YLR262C	Q8VEE5	Rab-6A	YER136W	Q61598	Rab GDI beta-2
146	YDR188W	Q8VEI1	TCP-1-zeta	YLR045C	Q80U79	Cytoskeleton-associated protein 5
147	YJR068W	Q99J62	Replication factor	YNL290W	Q3UDK3	Replication factor
148	YAR002C-A	Q9CX02	Tmed9	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
149	YAR002C-A	Q9CX02	Tmed9	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I
150	YGL203C	Q9D625	Serine carboxypeptidase	YDL192W	P84078	ADP-ribosylation factor 1
151	YGL203C	Q9D625	Serine carboxypeptidase	YGR020C	Q3U6X0	V1-ATPase F
152	YGL203C	Q9D625	Serine carboxypeptidase	YGR055W	Q3UQM7	Solute carrier family 7 member 5
153	YIL043C	Q9DB73	NADH-cytochrome b5 reductase 1	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I
154	YIL043C	Q9DB73	NADH-cytochrome b5 reductase 1	YAR002C-A	Q9CX02	Tmed9
155	YIL043C	Q9DCN2	Cytochrome b5 reductase	YML012W	Q3U7I7	TMP21-I
156	YIL043C	Q9DCN2	Cytochrome b5 reductase	YAR002C-A	Q9CX02	Tmed9
157	YGL087C	Q9ERI7	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	YDR092W	Q3TSL6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2
158	YMR054W	Q9JHF5	V0-ATPase a3	YGL006W	Q3TC38	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
159	YMR054W	Q9JHF5	V0-ATPase a3	YPR036W	Q3U9S9	V1-ATPase H
160	YMR054W	Q9JHF5	V0-ATPase a3	YEL051W	Q3UK81	V1-ATPase D
161	YMR054W	Q9JHF5	V0-ATPase a3	YGL006W	Q8K314	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
162	YER112W	Q9QXA5	snRNA-associated	YOR204W	O09060	Helicase
163	YER112W	Q9QXA5	snRNA-associated	YDR378C	Q542U7	Ribosomal protein

Supplementary Table 4 VATPase subunits identified on the phagosome

Supplementary Table 4. VATPase subunits identified on the phagosome

Subunit	Uniprot	DSM	DRM	ratio 30-0	ratio 30-30	ratio 30-240	Ratio
V0-ATPase a1	Q3TXT5	x	increase	0%	100%	100%	increase*
V0-ATPase a3	Q9JHF5	up-and-down	increase	50%	92%	100%	increase*
V0-ATPase d	Q54A57	up-and-down	increase	89%	33%	100%	increase*
V1-ATPase S1	Q3UWN7	x	increase	0%	100%	100%	increase*
V1-ATPase A1	Q3TKS0	up-and-down	increase	0%	7%	8%	increase
V1-ATPase B2	Q3TL62	increase	increase	0%	4%	12%	increase
V1-ATPase C	Q9Z1G3	increase	low	0%	3%	0%	up-and-down
V1-ATPase D	Q3UK81	increase	increase	0%	25%	29%	increase
V1-ATPase E	Q3UK59	increase	low	13%	0%	3%	decrease
V1-ATPase F	Q3U6X0	increase	x	0%	0%	0%	no-raft
V1-ATPase G1	Q9CR51	increase	x	0%	0%	0%	no-raft
V1-ATPase G1	Q3U7E0	increase	x	0%	0%	0%	no-raft
V1-ATPase H	Q3U9S9	increase	x	0%	0%	0%	no-raft

ratio = (DSM redundant peptide count (RPC) + DRM RPC) / DRM RPC

* ratio higher than 50%



Supplementary Table 5 List of the phospholipids of the phagosome identified in the negative ionization mode

Supplementary Table 5 : SNAREs identified on the phagosome

R-SNAREs	Temporal profile	Spatial profile	SNARE partners	Trafficking Pathways
VAMP2	↑	noraft	STX4-SNAP23 (Stow et al., 2006)	Exocytosis of granules and SV.
VAMP3	↑↓	↑↓ ratio↓	STX6-STX7-Vti1b, STX4-SNAP23 (Stow et al., 2006)	Exocytosis of granules and SV. Phagocytosis, RE-phagosome fusion
VAMP4	↓	↑ ratio↑	STX6-STX16-Vit1a (Mallard et al., 2002). (STX1-4)-SNAP23 (Kanehisa, 2009). STX6-STX13-Vit1a .	EE/RE to TGN retrograde
VAMP7	↑↓	↑ ratio↑	STX4-? STX6-STX7- Vti1b	Exocytosis of granules and SV. AG-phagosome fusion . LE-phagosome fusion. LE homotypic fusion.
Sec22b	↑↓	↑ ratio↑	STX18, D12	ER-phagosome fusion.
Q-SNAREs	Temporal profile	Spatial profile	SNARE partners	Trafficking Pathways
GS27	↑↓	noraft	GS28-STX5-YKT6, Sec22b, (Hay et al., 1997; Kanehisa, 2009)	Cis/medial-Golgi to the TNG.
GS28	↑	↑ ratio↑	GS27-STX5-YKT6, Sec22b (Hay et al., 1997)	ER to the Golgi apparatus. Intra-Golgi transport.
SNAP23	↑↓	↑ ratio↑	STX2-?, STX3-(VAMP7,8), STX4-(VAMP1,2,3,8)	Exocytosis of SV, granules, DG and lysosomes. TNF secr. and phagocytosis. RE-phagosome fusion.
SNAP29	↑	↑ ratio↑**	STX 1a, 3, 4, 7, 13, 17 (Steegmaier et al., 1998)	A general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in
STX2	↓	noraft	SNAP23-?	Exocytosis of alpha-granules, DG, and lysosomes.
STX3	↑	↑ ratio-	SNAP23-(VAMP7,8)	
STX4	↓	noraft	SNAP23-(VAMP1,2,3,8)	Exocytosis of SV, granules, DG and lysosomes. TNF secr. and phagocytosis. RE-phagosome fusion.
STX5	↑↓	noraft	GS27-Sec22b (Hay et al., 1997; Kanehisa, 2009). GS28- YKT6 (Hay et al., 1997; Kanehisa, 2009) NSFL1C- VCP. Vti1p, Bet1p (Tsui and Banfield, 2000).	ER to Golgi
STX6	↑↓	noraft	STX7-Vti1b-VAMP3	Exocytosis of granules and SV. TNF secr. and phagocytosis
STX7	↑↓	noraft	STX6-Vti1b-VAMP3. STX8-Viti1b-VAMP7.	TNF secr. and phagocytosis LE homotypic fusion
STX8	↑	↑ ratio↑	STX7-Viti1b-VAMP7	LE homotypic fusion
STX12*	=	noraft	STX8-Vti1a (Kanehisa, 2009). Ykt6-Vti1 (Dilcher et al., 2001).	EE/LE to RE. LE to TNG. Phagosome maturation
STX16	↑	noraft	STX6-Vti1a (Kanehisa, 2009)	EE/RE to TGN (retrograde)
Vti1a	↑↓	↑ ratio↑	STX6-STX12/13-VAMP4, STX6-STX16-VAMP4	EE homotypic fusion, EE/LE to TGN (retrograde)
Vti1b	↑↓	↑ ratio↑	STX6-STX7-VAMP3 STX6-STX7-VAMP7	TNF secr. LE homotypic fusion
SNAREs associated proteins	Temporal profile	Spatial profile	Function and SNAREs interactors	
VAP-A	↑	↑	Heterodimer with VAP-B	

		ratio↑	VAMP1, VAMP2, STX1A, BET1, SEC22C
VAP-B	↑	↑	Heterodimer with VAP-A
		ratio↑	VAMP1, VAMP2
SNAP-alpha	↑	↑	VAMP8, USE1L, RINT1, STX18
		ratio↑	Couple the energy of ATP binding and hydrolysis to the disassembly of SNARE
SNAP-gamma	↑	↑	Stabilize a 20 S complex consisting of NSF, alpha-SNAP, and SNAREs
		ratio↑	Interacts directly with NSF, as well as Gaf-1/Rip11, but not with SNAREs (Tani et al.,
Snapin	↓	noraft	SNAP23 and SNAP25 (Bao et al., 2008)
NSF		noraft	Couple the energy of ATP binding and hydrolysis to the disassembly of SNARE

Legend	Temporal	↑	Increase in phagosome
		↓	Decrease in phagosome
		↑↓	Transient in phagosome
	Spacial	↑	Increase in DRM
		↓	Decrease in DRM
		↑↓	Transient in DRM
		ratio	DSM (RPC) + DRM RPC / DRM RPC

Supplementary Table 6 List of the phospholipids identified in the negative ion mode of the Fourier Transform mass spectrometer

Supplementary Table 6. List of the phospholipids identified in the negative ion mode of the Fourier Transform mass spectrometer

Molecular Formula	Class	Carbons	DB	Ether linkages	Phagosomes (MS Intensity)				TCM (MS Intensity)
					15/0	30/0	30/30	30/240	
C34H67NO3	Cer	34	1		0,0000000	0,0006348	0,0007780	0,0004158	#N/A
C31H61O8P	PA	28	0		0,0010426	0,0000000	0,0028497	0,0010486	#N/A
C33H65O8P	PA	30	0		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0012515
C33H63O8P	PA	30	1		0,0040771	0,0050222	0,0089094	0,0044665	#N/A
C35H71O7P	PA	32	0	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0007907
C35H67O8P	PA	32	1		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0021972
C35H69O8P	PA	32	0		0,0000000	0,0015956	0,0006988	0,0007478	0,0086966
C37H69O8P	PA	34	2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0012107
C37H71O8P	PA	34	1		0,0004222	0,0000000	0,0027401	0,0025743	0,0056187
C37H73O8P	PA	34	0		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0013600
C39H73O8P	PA	36	2		0,0003122	0,0013846	0,0000000	0,0000000	0,0020708
C39H75O8P	PA	36	1		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0009257
C42H71O8P	PA	39	6		0,0008795	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0036601
C43H73O8P	PA	40	6		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0042644
C44H75O8P	PA	41	6		0,0067807	0,0065334	0,0000000	0,0050822	0,0153047
C45H77O7P	PA	42	7	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0045387
C45H75O8P	PA	42	7		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0018322
C45H77O8P	PA	42	6		0,0021069	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0159083
C45H81O7P	PA	42	5	ether	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0009170	#N/A
C45H79O8P	PA	42	5		0,0011280	0,0000000	0,0000000	0,0005275	0,0046394
C46H79O8P	PA	43	6		0,0066061	0,0067189	0,0000000	0,0049283	0,0165140
C47H77O8P	PA	44	8		0,0098539	0,0078364	0,0130004	0,0118272	0,0026522
C47H79O8P	PA	44	7		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0081981
C47H81O8P	PA	44	6		0,0020521	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0120074
C36H72NO8P	PC	28	0		0,0090135	0,0118859	0,0221025	0,0124416	#N/A
C38H70NO8P	PC	30	3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0008186
C38H72NO8P	PC	30	2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0028236
C40H74NO8P	PC	32	3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0008086
C42H78NO7P	PC	34	4	ether	0,0003150	0,0017410	0,0000000	0,0015062	0,0013393
C42H76NO8P	PC	34	4		0,0000000	0,0017993	0,0000000	0,0009699	#N/A
C34H66NO8P	PE	29	1		0,0000000	0,0000000	0,0020823	0,0008251	#N/A
C35H70NO8P	PE	30	0		0,0016500	0,0053798	0,0117163	0,0063947	#N/A
C37H72NO7P	PE	32	2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0018765
C37H72NO8P	PE	32	1		0,0021511	0,0039025	0,0024705	0,0022129	0,0044765
C39H74NO7P	PE	34	3	ether	0,0023215	0,0019799	0,0009246	0,0007798	0,0021043
C39H76NO7P	PE	34	2	ether	0,0353600	0,0320086	0,0261827	0,0179406	0,0123953
C39H72NO8P	PE	34	3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0033044
C39H74NO8P	PE	34	2		0,0030670	0,0036574	0,0004899	0,0016036	0,0044401
C39H76NO8P	PE	34	1		0,0105064	0,0119058	0,0083757	0,0090183	0,0181840
C41H72NO7P	PE	36	6	ether	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0011527	0,0018072
C41H74NO7P	PE	36	5	ether	0,0547425	0,0489901	0,0442944	0,0310529	0,0141775
C41H76NO7P	PE	36	4	ether	0,0055258	0,0053023	0,0035873	0,0019354	0,0031915
C41H78NO7P	PE	36	3	ether	0,0104155	0,0101402	0,0059110	0,0037707	0,0054851
C41H80NO7P	PE	36	2	ether	0,0071766	0,0088927	0,0064652	0,0037530	0,0043258
C41H74NO8P	PE	36	4		0,0003866	0,0000000	0,0018520	0,0000000	0,0021393
C41H76NO8P	PE	36	3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0000000
C41H78NO8P	PE	36	2		0,0102170	0,0108282	0,0084425	0,0068559	0,0120924
C41H80NO8P	PE	36	1		0,0010398	0,0045286	0,0025806	0,0021421	0,0072795
C43H74NO7P	PE	38	7	ether	0,0217240	0,0186761	0,0158406	0,0115304	0,0061223
C43H76NO7P	PE	38	6	ether	0,0354222	0,0310686	0,0279993	0,0219382	0,0168804
C43H78NO7P	PE	38	5	ether	0,0120811	0,0131387	0,0094635	0,0050429	0,0048437
C43H80NO7P	PE	38	4	ether	0,0003875	0,0000000	0,0000000	0,0000000	#N/A
C43H76NO8P	PE	38	5		0,0004134	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0030165
C43H78NO8P	PE	38	4		0,0023817	0,0030555	0,0006003	0,0008903	0,0044844
C43H80NO8P	PE	38	3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0000000
C45H78NO7P	PE	40	7	ether	0,0048201	0,0048193	0,0027700	0,0005515	0,0201341
C45H80NO7P	PE	40	6	ether	0,0003931	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0018529
C45H82NO7P	PE	40	5	ether	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0005350	0,0017143
C45H78NO8P	PE	40	6		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0015015

Molecular Formula	Class	Carbons	DB	Ether linkages	Phagosomes (MS Intensity)				TCM (MS Intensity)
					15/0	30/0	30/30	30/240	
C45H80NO8P	PE	40	5		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0007879
C47H82NO7P	PE	42	7		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0009515
C38H71O10P	PG	32	2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0000000
C38H73O10P	PG	32	1		0,0003129	0,0022448	0,0052640	0,0124395	0,0058816
C38H75O10P	PG	32	0		0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0045767	0,0020258
C40H75O10P	PG	34	2		0,0044388	0,0124180	0,0233176	0,0393646	0,0156454
C40H77O10P	PG	34	1		0,0275616	0,0369502	0,0506549	0,0776981	0,0434554
C40H79O10P	PG	34	0		0,0106052	0,0100608	0,0077491	0,0065936	0,0034179
C42H75O9P	PG	36	5		0,0059038	0,0060733	0,0000000	0,0044274	0,0028722
C42H77O10P	PG	36	3		0,0003226	0,0036486	0,0071329	0,0113833	0,0052187
C42H79O10P	PG	36	2		0,0246503	0,0464390	0,0769620	0,1030167	0,0462119
C42H81O10P	PG	36	1		0,0013622	0,0029385	0,0075477	0,0174450	0,0061809
C44H75O10P	PG	38	6		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0010615
C44H77O10P	PG	38	5		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0010565
C44H79O10P	PG	38	4		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0007372
C44H81O10P	PG	38	3		0,0000000	0,0030092	0,0045742	0,0074421	0,0038051
C44H83O10P	PG	38	2		0,0000000	0,0000000	0,0017415	0,0061759	0,0036672
C46H81O9P	PG	40	6	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0032294
C46H77O10P	PG	40	7		0,0000000	0,0056439	0,0121135	0,0106847	0,0067773
C46H79O10P	PG	40	6		0,0000000	0,0000000	0,0013510	0,0021841	0,0000000
C48H83O9P	PG	42	7		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0011115
C48H85O9P	PG	42	6		0,0010254	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0052180
C40H79O12P	PI	31	0	ether	0,0005599	0,0000000	0,0010047	0,0005556	0,0048923
C42H81O12P	PI	33	1	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0028536
C43H83O12P	PI	34	1	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0009786
C43H79O13P	PI	34	2		0,0051952	0,0073327	0,0061242	0,0103835	0,0061980
C43H81O13P	PI	34	1		0,0178926	0,0210474	0,0213108	0,0247796	0,0146368
C43H83O13P	PI	34	0		0,0008670	0,0012371	0,0006943	0,0006852	#N/A
C44H83O13P	PI	35	1		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0016072
C44H85O13P	PI	35	0		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0008200
C45H85O12P	PI	36	2	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0020122
C45H79O13P	PI	36	4		0,0038567	0,0055610	0,0038807	0,0020760	0,0032729
C45H81O13P	PI	36	3		0,0117729	0,0128822	0,0091581	0,0092242	0,0113460
C45H83O13P	PI	36	2		0,0698230	0,0702834	0,0638364	0,0707079	0,0584172
C45H85O13P	PI	36	1		0,0057571	0,0078113	0,0058971	0,0093718	0,0111346
C47H81O13P	PI	38	5		0,0201105	0,0188985	0,0166490	0,0135965	0,0145654
C47H83O13P	PI	38	4		0,0489930	0,0476167	0,0387013	0,0303965	0,0319487
C47H85O13P	PI	38	3		0,0241925	0,0241782	0,0164358	0,0166811	0,0211327
C47H87O13P	PI	38	2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0069952
C49H83O13P	PI	40	6		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0008557
C49H85O13P	PI	40	5		0,0006040	0,0009176	0,0004185	0,0006311	0,0019879
C49H87O13P	PI	40	4		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0008650
C38H72NO10P	PS	32	1		0,0292733	0,0231433	0,0209138	0,0166310	0,0114974
C39H74NO9P	PS	33	2	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0023658
C39H74NO10P	PS	33	1		0,0061776	0,0059734	0,0031876	0,0018153	0,0117446
C40H78NO9P	PS	34	1	ether	0,0004437	0,0000000	0,0000000	0,0006548	0,0017165
C40H74NO10P	PS	34	2		0,0078220	0,0057235	0,0022256	0,0037887	0,0035651
C40H76NO10P	PS	34	1		0,1222488	0,1015393	0,0935202	0,0905929	0,0396796
C41H76NO9P	PS	35	3	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0017715
C41H78NO9P	PS	35	2	ether	0,0016850	0,0000000	0,0045218	0,0041665	0,0125510
C41H76NO10P	PS	35	2		0,0004603	0,0007541	0,0003008	0,0000000	0,0066587
C41H78NO10P	PS	35	1		0,0341346	0,0301891	0,0202984	0,0106580	0,0377517
C41H80NO10P	PS	35	0		0,0263443	0,0295790	0,0846969	0,0588319	0,0141196
C42H76NO9P	PS	36	4	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0009829
C42H78NO10P	PS	36	2		0,0466003	0,0383602	0,0307356	0,0288195	0,0168326
C42H80NO10P	PS	36	1		0,1066760	0,0939337	0,0847329	0,0827519	0,0396453
C43H80NO9P	PS	37	3	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0045830
C43H82NO9P	PS	37	2	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0044258
C43H76NO10P	PS	37	4		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0023208
C43H78NO10P	PS	37	3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0012829
C43H80NO10P	PS	37	2		0,0109485	0,0089695	0,0055173	0,0046595	0,0201984

Molecular Formula	Class	Carbons	DB	Ether linkages	Phagosomes (MS Intensity)				TCM (MS Intensity)
					15/0	30/0	30/30	30/240	
C43H82NO10P	PS	37	1		0,0258613	0,0233958	0,0154127	0,0105851	0,0279750
C44H80NO9P	PS	38	4	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0023393
C44H78NO10P	PS	38	4		0,0019953	0,0015589	0,0009340	0,0004872	0,0000000
C44H80NO10P	PS	38	3		0,0035855	0,0037830	0,0016147	0,0009485	0,0012665
C44H82NO10P	PS	38	2		0,0040155	0,0026809	0,0012611	0,0020635	0,0026194
C44H84NO10P	PS	38	1		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0010807
C45H76NO10P	PS	39	6		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0016043
C45H78NO10P	PS	39	5		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0026422
C45H80NO10P	PS	39	4		0,0008300	0,0012189	0,0003647	0,0000000	0,0058323
C45H82NO10P	PS	39	3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0016650
C45H84NO10P	PS	39	2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0009722
C46H78NO10P	PS	40	6		0,0082347	0,0075739	0,0055763	0,0043761	0,0016108
C46H80NO10P	PS	40	5		0,0095303	0,0103066	0,0081326	0,0066185	0,0048844
C46H82NO10P	PS	40	4		0,0005530	0,0006982	0,0004062	0,0006635	#N/A
C47H80NO10P	PS	41	6		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0054151
C47H82NO10P	PS	41	5		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0025636
C48H96NO9P	PS	42	0	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0029436
C48H80NO10P	PS	42	7		0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0009882	0,0043051
C48H82NO10P	PS	42	6		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0273535
C48H84NO10P	PS	42	5		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0040951
C50H82NO10P	PS	44	8		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0154197
C50H84NO10P	PS	44	7		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0091845

Legend:

DB	Double bonds
PA	Phosphatidic acid
PC	Phosphatidyl Choline
PE	Phosphatidyl Ethanolamine
PG	Phosphatidyl Glycerol
PI	Phosphatidyl Inositol
PS	Phosphatidyl Serine
Cer	Ceramide

Supplementary Table 7 List of the phospholipids identified in the positive ion mode of the Fourier Transform mass spectrometer

Supplementary Table 7. List of the phospholipids identified in the positive ion mode of the Fourier Transform mass spectrometer

Molecular Formula	Class	Carbons	DB	Ether linkages	Phagosomes (MS Intensity)				TCM (MS Intensity)
					15/0	30/0	30/30	30/240	
C38H78NO7P	PC	30	0	ether	0,0028911	0,0000000	0,0000000	0,0031731	0,0183640
C38H70NO8P	PC	30	3		0,5157228	0,6078325	0,6184430	0,6064189	0,0444795
C38H74NO8P	PC	30	1		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0071821
C38H76NO8P	PC	30	0		0,0144148	0,0024910	0,0058419	0,0066055	0,0327417
C38H78NO7P	PC	30	0	ether	0,0028911	0,0000000	0,0000000	0,0031731	0,0183640
C39H78NO8P	PC	31	0		0,0349663	0,0211560	0,0222396	0,0378452	0,0045489
C40H80NO7P	PC	32	1	ether	0,0147135	0,0050870	0,0048974	0,0065529	0,0551005
C40H82NO7P	PC	32	0	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0443469
C40H74NO8P	PC	32	3		0,0016622	0,0000000	0,0000000	0,0012733	0,0113111
C40H76NO8P	PC	32	2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0047393
C40H78NO8P	PC	32	1		0,0108518	0,0045332	0,0035999	0,0062615	0,1008583
C40H80NO8P	PC	32	0		0,0187406	0,0091335	0,0083927	0,0124415	0,0404405
C40H78NO8P	PC	32	1	ether	0,0108518	0,0045332	0,0035999	0,0062615	0,1008583
C40H80NO8P	PC	32	0	ether	0,0187406	0,0091335	0,0083927	0,0124415	0,0404405
C39H79N2O6P	PC	32	3		0,0112837	0,0198219	0,0178198	0,0184894	0,0492069
C41H82NO7P	PC	33	1	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0017084
C41H74NO8P	PC	33	4		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0017781
C41H76NO8P	PC	33	3		0,0253276	0,0236503	0,0320602	0,0349072	#N/A
C41H78NO8P	PC	33	2		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0023748
C41H80NO8P	PC	33	1		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0035018
C42H78NO7P	PC	34	4	ether	0,0043722	0,0077213	0,0057848	0,0086218	0,0132643
C42H80NO7P	PC	34	3	ether	0,0043692	0,0083725	0,0069334	0,0104475	0,0075968
C42H82NO7P	PC	34	2	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0132099
C42H84NO7P	PC	34	1	ether	0,0207722	0,0119328	0,0093375	0,0107314	0,0981945
C42H86NO7P	PC	34	0	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0038180
C42H76NO8P	PC	34	4		0,0363397	0,0480900	0,0324432	0,0359916	0,0346932
C42H78NO8P	PC	34	3		0,0170717	0,0215520	0,0134938	0,0208068	0,0129345
C42H80NO8P	PC	34	2		0,0043609	0,0000000	0,0034913	0,0014505	0,0454569
C42H82NO8P	PC	34	1		0,0334063	0,0171970	0,0134938	0,0139650	0,1440816
C42H84NO8P	PC	34	0		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0030173
C44H80NO7P	PC	36	5	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0017611
C44H82NO7P	PC	36	4	ether	0,0105285	0,0142610	0,0115281	0,0125505	0,0199670
C44H86NO7P	PC	36	2	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0158464
C44H88NO7P	PC	36	1	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0059836
C44H78NO8P	PC	36	5		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0122852
C44H80NO8P	PC	36	4		0,0405792	0,0495492	0,0346166	0,0346664	0,0412531
C44H82NO8P	PC	36	3		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0029000
C44H84NO8P	PC	36	2		0,0048589	0,0000000	0,0000000	0,0013876	0,0613867
C44H86NO8P	PC	36	1		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0088599
C46H84NO7P	PC	38	5	ether	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0022269
C46H82NO8P	PC	38	5		#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	0,0158821
C49H98NO8P	PC	41	0		0,0000000	0,0000000	0,0024775	0,0000000	#N/A
C39H79N2O6P	SM	16	0		0,0112837	0,0198219	0,0178198	0,0184894	0,0492069
C47H93N2O6P	SM	24	1		0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0010834	0,0046186

Legend:

DB	Double bonds
PC	Phosphatidyl Choline
SM	Sphigomyelin

Annexe III. Article 3

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

CLSM

For CLSM, cells pulsed with 3 μm LB (Polyscience, coated with OVA-FITC conjugates) were allowed to adhere on polylysine-coated coverslips. Before fixation (4% paraformaldehyde-PBS, 10 min), cells were permeabilized before staining (PBS-saponin 0.2%, 10 min; except for Fig. 1a, class I MHC staining was performed before permeabilization in order to selectively stain cell surface with the anti H-2K^b Y3 antibody) and stained and washed in PBS BSA 0.1% saponin 0.1%. After mounting, coverslips were analysed on a Leica SP2 confocal microscope.

In vitro TAP and loading assays

A TAP transport assay was performed¹⁹. The same procedure was used for HLA-A2 loading assay, except that HLA-A2 bound peptide was immunoprecipitated on anti-HLA-A2- or control Sepharose. See Supplementary Information SD4.

Cross-presentation assays

3 μm LB were coated with OVA (or BSA) protein by passive adsorption (incubation in 10 mg ml⁻¹ PBS solutions for 18 h at 4°C) and extensively washed in PBS. DCs were pulsed and chased for indicated times with OVA-beads or BSA-beads. After fixation (0.08% glutaraldehyde 3 min, stopped in glycine 0.2 M) cells were washed and put in culture (10⁵ per well in 96 flat well plates) for 18 h with the B3Z CD8⁺ T-cell hybridoma specific for the H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complex (10⁵ per well)²⁰. B3Z activation was monitored by the induction of lacZ reporter under NF-AT elements using the CPRG substrate (Roche)²⁰. For lactacystin inhibition assays, DCs were preincubated for 20 min before beads pulse with 18 μM lactacystin and lactacystin was kept during the entire pulse period.

T-cell activation using purified phagosomal membranes

D1 cells were pretreated or not with 18 μM lactacystin and pulsed with OVA-beads or BSA-beads for 30 min. After a 2-h chase (in the continuous presence of lactacystin or not), the cells were homogenized and the phagosomes were purified as before. The phagosomal membranes were then disrupted by freeze-thaw, separated from the beads by low-speed centrifugation and pelleted by ultracentrifugation (100,000g, 1 h). Anti-H-2K^b/OVA transgenic OT-1 effector T cells (obtained by *in vitro* stimulation with peptide-pulsed DCs and culture for 3 to 15 days in the presence of IL-2) were then added and IFN- γ secretion was measured after an 18-h incubation in supernatants with an ELISA test (Pharmingen).

Cryoelectron microscopy and G-6-Pase staining

D1 cells were incubated with 0.8 μm LB for 1 h (Fig. 1c) or 3 μm LB for 30 min (Fig. 1d), before fixation in 2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde. Then cells were processed for ultrathin cryosectioning and immunogold labelling as described²¹. For G-6-Pase staining, D1 cells were incubated with 3 μm LB for 1 h and the Epon sections were processed as previously described¹⁹. When indicated, the cells pretreated with 100 nM wortmannin and then pulsed for 1 h with the LB in the continuous presence of the drug.

Received 17 March; accepted 10 July 2003; doi:10.1038/nature01911.

- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 620–667 (2002).
- Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 47–64 (2001).
- Yewdell, J. W., Norbury, C. C. & Bennink, J. R. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8⁺ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv. Immunol.* **73**, 1–77 (1999).
- Kovacsovic-Bankowski, M. & Rock, K. L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**, 243–246 (1995).
- Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. & Watts, C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 280–288 (1997).
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature Cell Biol.* **1**, 362–368 (1999).
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. & Dierich, G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* **172**, 21–28 (1999).
- Gagnon, E. *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119–131 (2002).
- Ramachandra, L., Sramkoski, R. M., Canaday, D. H., Boom, W. H. & Harding, C. V. Flow analysis of MHC molecules and other membrane proteins in isolated phagosomes. *J. Immunol. Methods* **213**, 53–71 (1998).
- Griffiths, G., Quinn, P. & Warren, G. 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 (1983).
- Porgador, A., Yewdell, J. W., Deng, Y., Bennink, J. R. & Germain, R. N. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* **6**, 715–726 (1997).
- Lemonnier, F. A. The utility of H-2 class I knockout mice. *Virus Res.* **82**, 87–90 (2002).
- Rock, K. L., York, I. A., Saric, T. & Goldberg, A. L. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* **80**, 1–70 (2002).
- Reits, E. *et al.* Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**, 97–108 (2003).
- Hogquist, K. A. *et al.* T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17–27 (1994).

- Winzler, C. *et al.* Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* **185**, 317–328 (1997).
- Thery, C. *et al.* Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* **147**, 599–610 (1999).
- Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G. & Griffiths, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* **124**, 677–688 (1994).
- Daniel, S., Caillat-Zucman, S., Hammer, J., Bach, J. F. & van Endert, P. M. Absence of functional relevance of human transporter associated with antigen processing polymorphism for peptide selection. *J. Immunol.* **159**, 2350–2357 (1997).
- Karttunen, J., Sanderson, S. & Shastri, N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 6020–6024 (1992).
- Raposo, G., Kleijmeer, M. J., Posthuma, G., Slot, J. W. & Geuze, H. J. in *Handbook of Experimental Immunology* 5th edn, Ch. 208, 1–11 (Elsevier, Cambridge, MA, 1997).
- Houde, M. *et al.* Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402–406 (2003).

Supplementary Information accompanies the paper on www.nature.com/nature.

Acknowledgements We want to thank S. Hugues for help with the OT-1 effector cells, J. Griffith for technical assistance and A. Lennon-Dusmenil for critical reading of the manuscript. P.G. is a Fellow of the ARC and CNRS. This work was supported by the Institut Curie, the INSERM and the Ligue de Contre le Cancer.

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

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.A. (sebastian.amigorena@curie.fr).

Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation

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

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

²Laboratory of Parasitic Diseases, and ³Laboratory of Viral Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA

⁴Caprion Pharmaceuticals Inc., Montréal, Québec, H4S 2C8, Canada

* These authors contributed equally to this work

The ability to process microbial antigens and present them at the surface of cells is an important aspect of our innate ability to clear infections. It is generally accepted that antigens in the cytoplasm are loaded in the endoplasmic reticulum and presented at the cell surface on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, whereas peptides present in endo/phagocytic compartments are presented on MHC class II molecules^{1,2}. Despite the apparent segregation of the class I and class II pathways, antigens from intracellular pathogens including mycobacteria, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella abortus* and *Leishmania*, have been shown to elicit an MHC class-I-dependent CD8⁺ T-cell response^{3–7}, a process referred to as cross-presentation². The cellular mechanisms allowing the cross-presentation pathway are poorly understood. Here we show that phagosomes display the elements and properties needed to be self-sufficient for the cross-presentation of exogenous antigens, a newly ascribed function linked to phagocytosis mediated by the endoplasmic reticulum.

Until recently, little was known about the molecular mechanisms and cellular structures enabling the cross-presentation pathway. A

requirement for peptide regurgitation from the phagosome lumen, allowing their direct binding to MHC class I molecules at the surface of presenting cells, was ruled out and a phagosome to cytosol pathway for the retrotranslocation of exogenous peptides was shown to exist⁸. Although peptide transport activity allowing for the retrotranslocation of exogenous molecules from the phagosome lumen to the cytoplasm has been observed in dendritic cells⁹, the phagosomal proteins involved in this process have not been identified. After peptide transfer to the cytosol, the proposed steps for cross-presentation involve: (1) ubiquitination and proteasomal degradation in the cytoplasm to generate the correct peptides for MHC class I loading, (2) peptide transport in the endoplasmic reticulum (ER) lumen through the TAP complex to form MHC class-I-peptide complexes, and (3) transport to the cell surface through the secretory pathway. The finding that phagocytosis in macrophages proceeds by ER recruitment at the cell surface, a process referred to as ER-mediated phagocytosis¹⁰, suggested that antigens from intracellular pathogens could have direct access, within phagosomes, to the ER machinery needed for MHC class I presentation.

Indications that phagosomes could be competent organelles for antigen cross-presentation came from proteomics analyses showing that proteins required for each step of the cross-presentation pathway, described above, are present on latex-bead-containing phagosomes (Supplementary Table 1). The cross-presentation of exogenous peptides requires a retrotranslocation step from the phagosome lumen to the cytoplasm to be processed by the proteasome. Confocal analysis showed that after internalization of latex beads opsonized with fluorescent ovalbumin, a fluorescent signal is observed in the cytoplasm near phagosomes (Fig. 1). Although the retrotranslocation machinery allowing this transfer is not known, a protein that might play this role on phagosomes is Sec61.

Indeed, Sec61 has been shown to mediate the retrotranslocation of proteins from the ER lumen to the cytoplasm^{11–12}, including the A1 subunit of cholera toxin (CTA1)¹³. When fluorescent CTA1 was examined in place of ovalbumin, a strong signal was also observed in the cytoplasm (Fig. 1), further suggesting that Sec61 might be involved in phagosomal retrotranslocation. In contrast to ovalbumin, which starts to be visible in the cytoplasm 60 min after phagocytosis of latex-OVA beads, the CTA1 signal is visible within 30 min. This difference might be explained by the fact that intra-phagosomal processing of ovalbumin is required before its retrotranslocation¹⁴. Interestingly, although the signal for CTA1 was also observed in the cytoplasm of cells not treated with MG-132, fluorescent ovalbumin was not observed in these conditions (results not shown). Because CTA1 is believed to be resistant to proteasomal degradation¹⁵, these results suggest that ovalbumin could be rapidly degraded by proteasomes close to or associated with phagosomes.

Further experiments performed to investigate the distribution of proteasomes in J774 murine macrophages showed that although proteasomes are present in the total cell lysate, indicative of a cytoplasmic localization, they are also observed in the total membrane preparation, largely made of ER in these cells, and on phagosomes where multiple proteasome α -subunits were detected (Fig. 2a). These results, in accordance with previous studies showing the presence of proteasomes in the cytoplasm, the nucleus and the ER^{16,17}, extend the cellular localization of this structure to phagosomes. Thus, the proteasomes present on phagosomes could come from the ER during ER-mediated phagocytosis. Analysis of the kinetics of association of proteasomes to phagosomes indicated that while Sec61 is recruited at the earliest time point, proteasome α -subunits associate transiently to phagosomes and reach a peak at around 60 min after their formation (Fig. 2b). This indicates that proteasomes do not come directly from the ER during phagosome formation, but rather assemble on phagosomes to play a function at a precise point during phagolysosome biogenesis.

Immunofluorescence analysis supported the western blot data by

showing a diffuse labelling for proteasome α - and β -subunits in the cytoplasm and around phagosomes (Fig. 2c). Immunofluorescence on isolated phagosomes¹⁰ indicated that about 70% of phagosomes displayed a discontinuous labelling for the proteasome α - and β -subunits (Fig. 2c, inset). Although this pattern of labelling is similar to the one previously observed for flotillin-1, a marker of lipid rafts on phagosomes¹⁸, proteasomes are not present in phagosome rafts (Fig. 2d). The proteasomes present on phagosomes are part of high-molecular-weight complexes, as shown by western blotting of purified phagosome preparations separated by non-denaturing blue native electrophoresis¹⁹ (Fig. 2e), in which the $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\beta 1$, and $\beta 5$ subunits have been identified by mass spectrometry analyses. Finally, we were also able to show that proteasomes associate to the cytoplasmic side of phagosomes, based on their sensitivity to pronase (Fig. 2f).

Polyubiquitinated proteins are also present on the cytoplasmic side of phagosomes (pronase-sensitive) where they colocalize with proteasomes (Fig. 3a). A link between the ubiquitination process and proteasomal degradation on phagosomes was further highlighted when J774 macrophages were treated with the proteasome inhibitor MG-132. Indeed, the amount of polyubiquitinated proteins present on phagosomes increased with time when proteasome activity was inhibited (Fig. 3b), whereas it was lower and remained constant in untreated cells. These results are consistent with a continuous arrival and degradation of polyubiquitinated proteins on phagosomes. The nature of the polyubiquitinated proteins present on phagosomes was investigated using a proteomics approach, which allowed for the identification of 23 proteins, including ovalbumin (QTAMVLVNAIV and NVMEERK) present in at least five bands (Supplementary Table 2).

The improved ability of cells to process and present antigens on MHC class I molecules upon interferon- γ (IFN- γ) treatment is related to the upregulation of subsets of proteasomes, referred to as immunoproteasomes, differing from their 'steady state' counter-

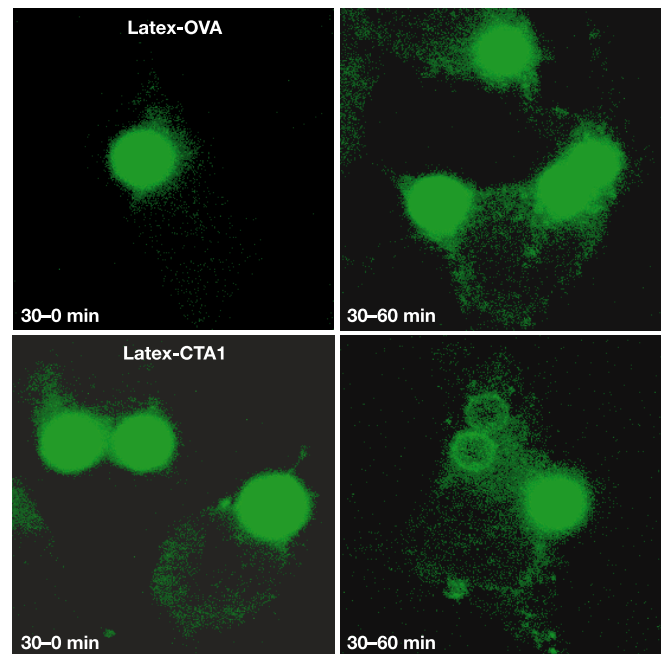


Figure 1 Exogenous proteins internalized by phagocytosis are retrotranslocated to the cytoplasmic side of phagosomes. For latex-OVA, after the initial 30 min of fluorescent ovalbumin-latex bead internalization, the fluorescent signal was contained within phagosomes (30 min–0 min). A fluorescent signal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

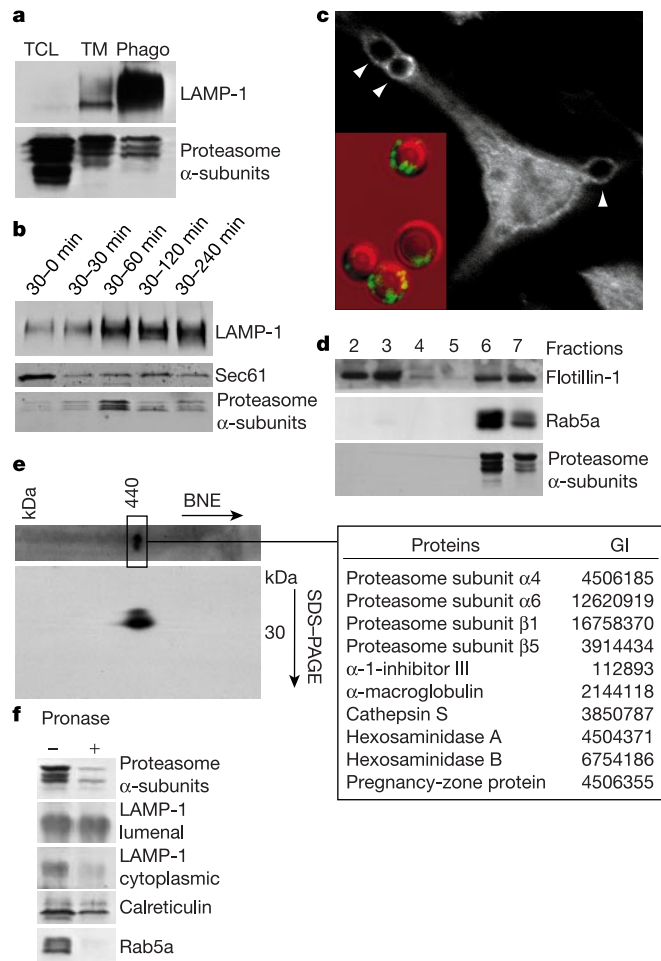


Figure 2 Proteasomes are present on phagosomes. **a**, Proteasome α -subunits are detected in the total cell lysate (TCL), the total membrane fraction (TM), and phagosomes (Phago). **b**, Proteasomes associate with phagosomes transiently, contrasting with the late association of LAMP1, and the early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

parts by the substitution of three β -subunits for the homologous subunits LMP2, LMP7 and MECL1. Treatment of J774 macrophages with IFN- γ resulted in the upregulation of the immunoproteasome subunit LMP2, as shown by immunofluorescence (Fig. 4a). Furthermore, western blot analysis indicated that immunoproteasomes associate with phagosomes upon IFN- γ treatment, a result confirmed by direct immunofluorescence on isolated organelles (Fig. 4a, inset). The peptides generated by proteasomal degradation could potentially gain access to the phagosome lumen since the TAP complex is present on this organelle, as shown by western blotting (Fig. 4b). Critical points that remained to be established were the presence of ovalbumin peptide/MHC class I complexes in the phagosome lumen, and how they are delivered to the cell surface for presentation to CD8⁺ T cells.

We showed that after phagocytosis of latex-OVA beads in BMA3.1A cells, the SIINFEKL ovalbumin peptide/MHC class I

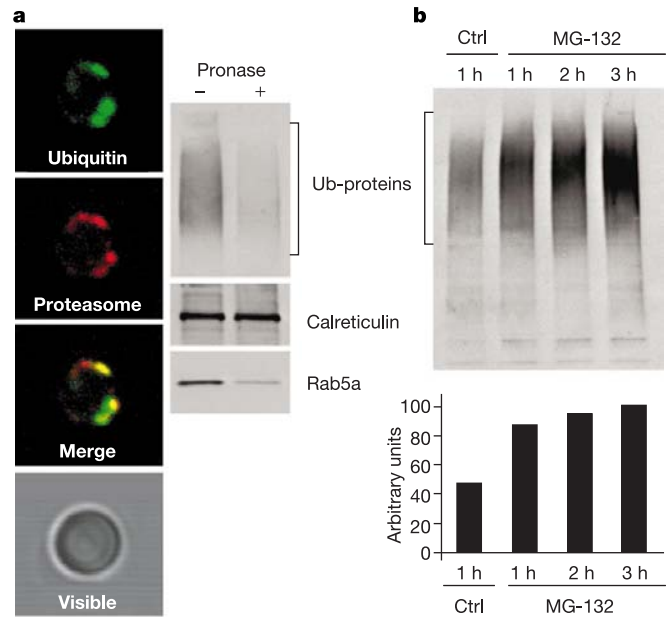


Figure 3 Ubiquitinated proteins associate with proteasomes on the cytoplasmic side of phagosomes. **a**, Ubiquitinated proteins colocalize with proteasomes on phagosomes (left panels show one phagosome). The pronase assay (right panels) indicates that polyubiquitinated proteins are present on the cytoplasmic side of phagosomes. **b**, The level of ubiquitinated proteins present on phagosomes isolated at different time points after formation remained constant (the 1-h time point is shown). In contrast, inhibition of proteasome activity with MG-132 led to the accumulation of polyubiquitinated proteins on phagosomes. Ctrl, control.

complex, recognized by the monoclonal antibody 25D1.16 (ref. 20), is present in the phagosome lumen (Fig. 4c), reaching a maximum level around 60–120 min after phagocytosis (not shown). Approximately 11% of the phagosomes contained detectable complexes in these conditions, an eightfold increase compared with phagosomes formed by the internalization of non-opsonized latex beads. The low signal here is due to the permeabilization procedure needed to detect molecules in the phagosome lumen. In these conditions, the value obtained for LAMP1 (around 20% in contrast to about 80–90% in non-permeabilized phagosome preparations) is the maximum expected value with that assay.

Bone-marrow-derived macrophages from B/6 mice that had internalized latex-OVA beads stimulated the proliferation of OT-1 CD8⁺ T cells and their secretion of IFN- γ (Fig. 4d, e), as shown previously⁸. Identical results were obtained with the C57BL/6-derived macrophage cell lines BMA3.1A and BMC2 (not shown). CD8⁺ T-cell proliferation and IFN- γ secretion were abolished when bone marrow-derived macrophages from TAP1^{-/-} mice were used, indicating the involvement of a transport event through TAP (Fig. 4d, e). Evidence that these events are triggered by MHC-peptide complexes originating from the phagosome lumen was obtained using a system measuring the percentage of OT-1 CD8⁺ T cells producing IFN- γ after a co-culture with macrophages infected with recombinant vaccinia viruses expressing NP-SIINFEKL-GFP²¹ or macrophages that had internalized latex-OVA beads (Fig. 4f).

The conventional presentation of the abundant SIINFEKL peptide/MHC class I complexes generated from endogenously derived ovalbumin peptides, synthesized in the cell cytoplasm following vaccinia infection and reaching the surface through the secretory pathway, was almost completely inhibited by brefeldin A (Fig. 4f). In contrast, the presentation of complexes generated after phagocytosis of latex-OVA beads was only partially (35%) inhibited by this drug (Fig. 4f). The IFN- γ response was significantly greater than the

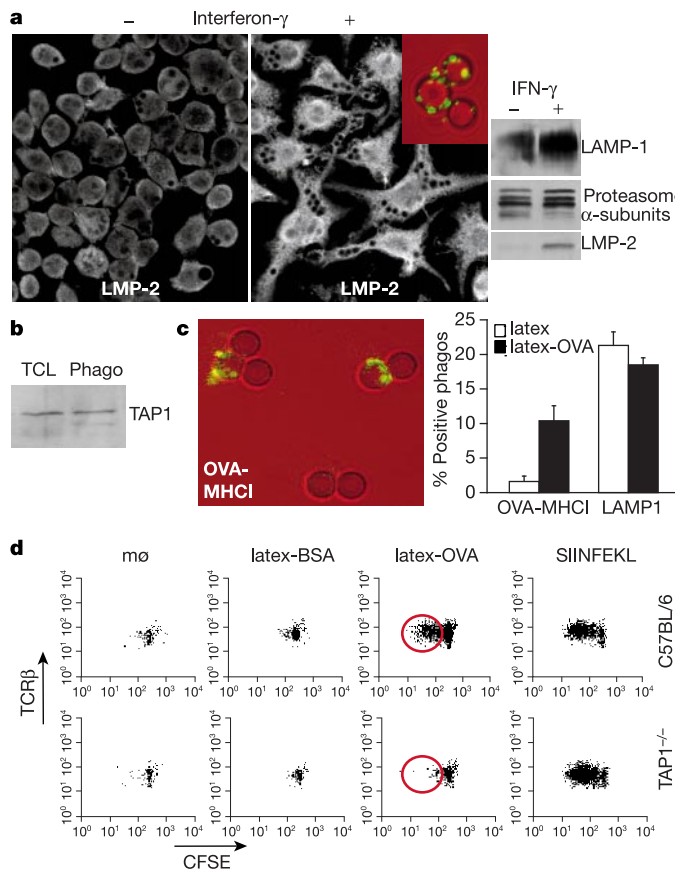
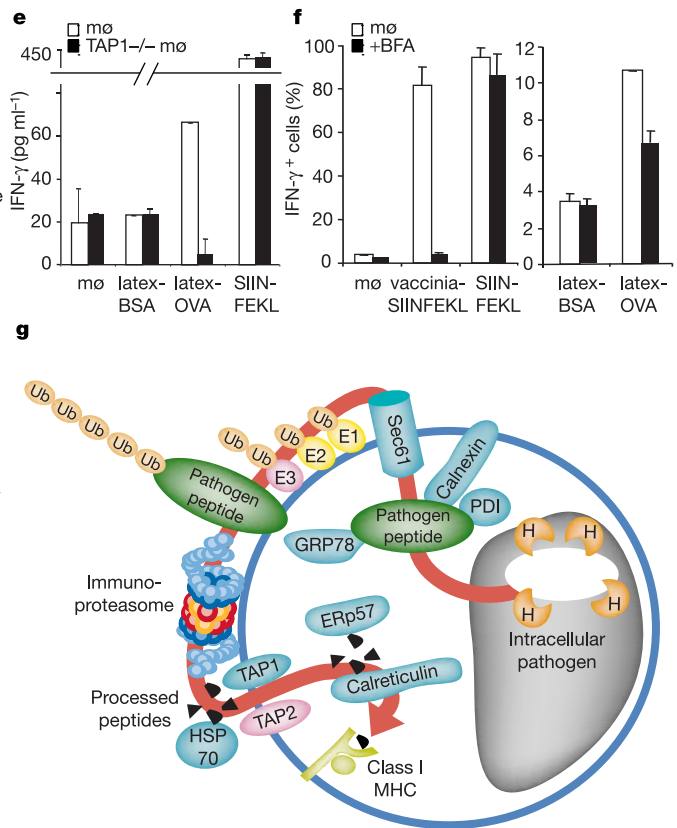


Figure 4 Exogenous proteins loaded in phagosomes can be presented by MHC class I complexes at the surface of macrophages and trigger a TAP-dependent CD8⁺ T-cell response. **a**, Treatment with IFN- γ increases the level of proteasome LAMP-2 subunits in J774 macrophages and their association to phagosomes. **b**, TAP is present on phagosomes. **c**, The SIINFEKL/MHC I complex is present in the phagosome lumen. **d**, Internalization of latex-OVA in C57BL/6 macrophages triggers the proliferation of OT-I transgenic CD8⁺ T-cells (red circle). Macrophages without bead (mo), or that had internalized latex-BSA did not induce the proliferation of T cells. As a positive control, incubation of macrophages with SIINFEKL peptide, allowing direct binding to MHC I at the cell surface, sustained the proliferation of T cells. The ability of macrophages to elicit a

background response elicited by macrophages following uptake of latex-BSA beads. The cell surface delivery of MHC-peptide complexes from endo/phagocytic organelles was also shown to occur via a brefeldin-A-insensitive route^{3,22}, so the significant level of cross-presentation of ovalbumin observed in the brefeldin-A-treated cells further supports the phagosome origin of the peptide/MHC class I complexes involved in CD8⁺ T-cell activation.

Our results demonstrate that phagosomes are able to process exogenous peptides for MHC class I cross-presentation, extending the competence of phagosomes previously shown to be functional for the processing of MHC class II complexes²³. Our working model (Fig. 4g) proposes that hydrolases (H) acquired sequentially during phagosome maturation initiate the processing of exogenous peptides in the phagosome lumen^{24–26}. Some of these peptides are then retrotranslocated to the cytoplasmic side of phagosomes by the Sec61/chaperones retrotranslocation machinery normally used for quality control^{11,27}. The translocated proteins then have access to the ubiquitin/proteasome complex assembled on the cytoplasmic side of phagosomes, leading to the generation of MHC class I binding peptides. Although some of these peptides are likely to be transported in the ER lumen, some reach the lumen of phagosomes through the TAP complex present on phagosomes. The membrane recycling machinery of endo/phagocytic organelles²⁸ could then be used for



CD8 response is TAP-dependent as shown by the absence of CD8⁺ T-cell proliferation after latex-OVA internalization by macrophages from TAP1^{-/-} mice. **e**, The same trend was observed for the secretion of IFN- γ by CD8⁺ T cells cultured with the various macrophages. **f**, A significant level of presentation of SIINFEKL/MHC I complexes following phagocytosis of latex-OVA is observed in cells treated with brefeldin A. In contrast, activation of T cells was almost completely abolished when macrophages infected with recombinant vaccinia viruses expressing NP-SIINFEKL-green fluorescent protein (GFP) were treated with BFA. BFA had no effect on the activation of T cells by the direct addition of the SIINFEKL peptide. **g**, Working model. See text.

the delivery of MHC class-I-peptide complexes to the surface.

The constant sampling of self and foreign molecules by the immune system is part of a complex quality control process ensuring the recognition and clearance of aberrant cell forms during development, tumorigenesis and infection by microbial pathogens. Our results, and those presented in an accompanying paper²⁹, establish that the use of ER, an organelle specialized in quality control, to form part of the phagosome membrane serves not only to minimize the utilization of the plasma membrane, but also confers properties allowing phagosomes to be fully integrated within the immune recognition system and play a direct role in cross-presentation. Our results, together with findings showing that ovalbumin linked to beads internalized by phagocytosis is presented with MHC class I molecules up to 1×10^4 -fold more efficiently than soluble ovalbumin³⁰, suggest that favouring the entry of exogenous peptides by phagocytosis could improve immunization procedures for vaccination protocols and the development of more efficient immunotherapies against cancer. □

Methods

Antibodies

Mouse anti-proteasome α -subunits monoclonal antibodies (mAb), rabbit anti-proteasome α/β -subunit polyclonal antibodies (pAb), rabbit anti-LAMP-2 pAb and mouse

anti-ubiquitin clone FK1 mAb were from Affiniti. Rabbit anti-rab5a pAb and goat anti-TAP1 mAb were from Santa Cruz. Rat anti-LAMP1 luminal ID4B mAb was from Developmental Studies Hybridoma Bank. Mouse anti-CD8 (CyChrome-conjugated), mouse anti-IFN- γ (PE-conjugated), and hamster anti-TCR (PE-conjugated) were from BD PharMingen. Rabbit anti-LAMP1 cytoplasmic pAb was a gift from S. Mésère. Rabbit anti-flotillin pAb was a gift from R. Parton. Rabbit anti-Sec61p pAb was a gift from C. Nicchitta. Rabbit anti-calreticulin pAb was a gift from L. Rokeach. Mouse anti-OVA-MHCI complex 25D1.16 mAb was a gift from R. Germain and J. Yewdell.

Phagosome formation and isolation

All cell types were cultured as described^{7,8,10}. Phagosomes were formed by the internalization of 0.8- μ m latex beads and isolated as described¹⁰. Phagosome lipid rafts were isolated after Triton X-100 solubilization and separation on an Optiprep gradient, as described¹⁸.

Retrotranslocation assay

To determine if exogenous proteins present within the phagosome lumen can be retrotranslocated, phagosomes were formed in J774 macrophages by a 30 min internalization of latex beads opsonized with ovalbumin or the α -subunit of cholera toxin labelled with Alexa Fluor 488 according to standard Molecular Probes protocol. After an additional 60 min of incubation in the presence of 5 μ M MG-132, an inhibitor of proteasome activity, cells were fixed and prepared for confocal microscopy.

Immunofluorescence on cells and isolated phagosomes

Immunofluorescence on cells was performed using standard procedures described previously¹⁰. For the immunoproteasome, J774 cells were treated with IFN- γ 36 h before phagosome formation. For all direct immunofluorescence analyses, isolated phagosomes containing 3.0- μ m latex beads were fixed in paraformaldehyde 4% for 10 min then washed three times with PBS/BSA 3% by quick spins. For the detection of the SIINFEKL/class I complex in the phagosome lumen, permeabilization was required. In this case, after fixation, phagosomes were treated with 1% Triton X-100 at room temperature for 10 min and then washed three times with PBS/BSA 3%. Phagosomes were then blocked for 30 min with PBS/BSA 3% and the primary antibody added for 45 min. Phagosomes were washed three times and fluorescent secondary antibody was added for 30 min. After three washes, phagosomes were prepared for the confocal microscope.

Blue native electrophoresis

To determine whether the proteasome subunits detected by fluorescence on phagosomes are present as a complex, we isolated phagosomes and performed blue native gel electrophoresis following a protocol described previously¹⁹.

T-cell proliferation

CD8⁺ T cells from OT-I CD8⁺ transgenic mice were negatively selected by magnetic separation (MACS system and CD8⁺ T-cell purification kit, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's indications. Purified CD8⁺ T cells were further labelled with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes). The cells were resuspended at 5×10^7 cells ml⁻¹ in PBS with 0.5 μ M CFSE for 10 min at 37 °C, and the reaction was stopped with 10% normal mouse serum. Cells were washed with cold PBS 0.1% BSA and plated at 10^6 per well in a 24-well plate in DMEM 10% FCS. Antigen-pulsed macrophages were added for 72 h, at which time the cells were fixed in 4% paraformaldehyde. T-cell proliferation was measured by flow cytometry as expressed by the intensity of CFSE labelling. The lymphocytes were identified by characteristic size and granularity, in combination with anti-TCR β chain and anti-CD8 surface staining. For each sample, a minimum of 20,000 events was collected and analysed using CellQuest software and a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Brefeldin A treatment and interferon secretion assays

To assess the transport of MHC-peptide complexes to the cell surface, BMA3.1A macrophages were incubated with latex-OVA or vaccinia-OVA²¹ with or without brefeldin A (10 μ g ml⁻¹) for 6–10 h, at which time CD8⁺ T cells were added for an additional 4 h with BFA. For detection of intracellular IFN- γ , CD8⁺ T cells were further fixed, permeabilized and stained following standard procedures⁷. IFN- γ production in 72 h cell culture supernatants was quantified by ELISA using Endogen's antibody matched pairs and following the manufacturer's protocol.

Proteomics analysis

Phagosome proteins were separated by SDS-PAGE on 5-cm minigels. Gel slices (24 in total) were excised, trypsin digested, and the resulting tryptic peptides extracted with 0.2 M urea in 50% aqueous acetonitrile. Each digested band was analysed by nanoLC-MS/MS using a Waters CapLC coupled to Q-TOF Ultima. A total of 460 proteins were identified, including several proteins involved in each step of cross-presentation (Supplementary Table 1). The nature of the polyubiquitinated proteins present on phagosomes was also investigated using proteomics. In this case, after phagosome isolation, the polyubiquitinated proteins present on this organelle were purified by affinity for the S5A subunit of the proteasome attached to Sepharose beads (Affiniti) (Supplementary Table 2). These proteins were then separated and analysed as above.

Received 14 March; accepted 15 July 2003; doi:10.1038/nature01912.

1. Watts, C. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation. *Semin. Immunol.* **13**, 373–379 (2001).

- Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Rev. Immunol.* **1**, 126–134 (2001).
- Pfeifer, J. D. *et al.* Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**, 359–362 (1993).
- Oliveira, S. C. & Splitter, G. A. CD8⁺ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2551–2557 (1995).
- Turner, J. & Dockrell, H. M. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8⁺ T cells *in vitro*. *Immunology* **87**, 339–342 (1996).
- Canaday, D. H. *et al.* Activation of human CD8⁺ alpha beta TCR⁺ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J. Immunol.* **162**, 372–379 (1999).
- Belkaid, Y. *et al.* CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.* **168**, 3992–4000 (2002).
- Kovacovics-Bankowski, M. & Rock, K. L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**, 243–246 (1995).
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature Cell Biol.* **1**, 362–368 (1999).
- Gagnon, E. *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119–131 (2002).
- Wiertz, E. J. *et al.* Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432–438 (1996).
- Tirosh, B., Furman, M. H., Tortorella, D. & Ploegh, H. L. Protein unfolding is not a prerequisite for ER-to-cytosol dislocation. *J. Biol. Chem.* **278**, 6664–6672 (2003).
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkler, A. & Herzog, V. Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell Biol.* **148**, 1203–1212 (2000).
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature Cell Biol.* **1**, 362–368 (1999).
- Hazes, B. & Read, R. J. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* **36**, 11051–11054 (1997).
- Rivett, A. J., Palmer, A. & Knecht, E. Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1165–1172 (1992).
- Brooks, P., Murray, R. Z., Mason, G. G., Hendil, K. B. & Rivett, A. J. Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **352**, 611–615 (2000).
- Dermine, J. F. *et al.* Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 18507–18512 (2001).
- Schagger, H., Cramer, W. A. & von Jagow, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220–230 (1994).
- Porgador, A., Yewdell, J. W., Deng, Y., Binnink, J. R. & Germain, R. N. Localization, quantitation, and *in situ* detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* **6**, 715–726 (1997).
- Princiotta, M. F. *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**, 343–354 (2003).
- MacAry, P. A. *et al.* Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 3982–3987 (2001).
- Ramachandra, L., Song, R. & Harding, C. V. Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide: class II MHC complexes. *J. Immunol.* **162**, 3263–3272 (1999).
- Garin, J. *et al.* The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* **152**, 165–180 (2001).
- Muno, D., Kominami, E. & Mizuochi, T. Generation of both MHC class I- and class II-restricted antigenic peptides from exogenously added ovalbumin in murine phagosomes. *FEBS Lett.* **478**, 178–182 (2000).
- Lennon-Dumenil, A. M. *et al.* Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J. Exp. Med.* **196**, 529–540 (2002).
- Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 246–255 (2002).
- Mahnke, K. *et al.* The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* **151**, 673–684 (2000).
- Guermontprez, P. *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397–402 (2003).
- Kovacovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B. & Rock, K. L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 4942–4946 (1993).

Supplementary Information accompanies the paper on www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank C. Rondeau, S. Tessier and A. Carrier for technical assistance and G. Milon for discussions. We thank K. Rock for the BMA3.1A and BMC2 cell lines. We also thank D. Boismenu and J. Bergeron from the Montreal Proteomics Network for help with the mass spectrometry analyses of the blue native gel samples. This work was supported by the Canadian Institute for Health Research, Genome Canada/Québec (M.D.), and the NIH (D.S.).

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

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.D. (michel.desjardins@umontreal.ca).

Annexe IV. Article 4

Stuart, L. M., Boulais, J., Charriere, G. M., Hennessy, E. J., Brunet, S., Jutras, I., Goyette, G., Rondeau, C., Letarte, S., Huang, H., Ye, P., Morales, F., Kocks, C., Bader, J. S., Desjardins, M., Ezekowitz, R. A. B. (2007) A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature* 445, 95-101

A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome

L. M. Stuart^{1,2}, J. Boulais³, G. M. Charriere¹, E. J. Hennessy¹, S. Brunet³, I. Jutras³, G. Goyette³, C. Rondeau³, S. Letarte³, H. Huang⁴, P. Ye⁴, F. Morales⁵, C. Kocks¹, J. S. Bader⁴, M. Desjardins³ & R. A. B. Ezekowitz^{1,†}

Phagocytes have a critical function in remodelling tissues during embryogenesis and thereafter are central effectors of immune defence^{1,2}. During phagocytosis, particles are internalized into 'phagosomes', organelles from which immune processes such as microbial destruction and antigen presentation are initiated³. Certain pathogens have evolved mechanisms to evade the immune system and persist undetected within phagocytes, and it is therefore evident that a detailed knowledge of this process is essential to an understanding of many aspects of innate and adaptive immunity. However, despite the crucial role of phagosomes in immunity, their components and organization are not fully defined. Here we present a systems biology analysis of phagosomes isolated from cells derived from the genetically tractable model organism *Drosophila melanogaster* and address the complex dynamic interactions between proteins within this organelle and their involvement in particle engulfment. Proteomic analysis identified 617 proteins potentially associated with *Drosophila* phagosomes; these were organized by protein–protein interactions to generate the 'phagosome interactome', a detailed protein–protein interaction network of this subcellular compartment. These networks predicted both the architecture of the phagosome and putative biomodules. The contribution of each protein and complex to bacterial internalization was tested by RNA-mediated interference and identified known components of the phagocytic machinery. In addition, the prediction and validation of regulators of phagocytosis such as the 'exocyst'⁴, a macromolecular complex required for exocytosis but not previously implicated in phagocytosis, validates this strategy. In generating this 'systems-based model', we show the power of applying this approach to the study of complex cellular processes and organelles and expect that this detailed model of the phagosome will provide a new framework for studying host–pathogen interactions and innate immunity.

Proteomic analysis of the mammalian phagosome has highlighted the complexity of this subcellular organelle^{5–7}. To probe this complexity further we chose to study *Drosophila* S2 cells, an embryonic haemocyte-derived cell line that is readily amenable to RNA-mediated interference (RNAi) and whose phagocytic properties have been extensively characterized^{8,9} (see Supplementary Fig. S1 for a diagram of the approach). We first undertook a proteomic analysis of latex-bead-containing phagosomes isolated from S2 cells that were highly enriched for phagosome components (estimated contamination less than 5%; see Supplementary Methods and Supplementary Figs S2–S4). SDS polyacrylamide gelelectrophoresis and tandem mass spectrometry analysis identified 617 proteins potentially associated with *Drosophila* phagosomes (Supplementary Table

S1 and Supplementary Methods). Of these phagosome proteins, 122 (19.8%) were predicted to have transmembrane domains and 103 were previously undefined (defined only by the prefix CG, for computed gene). The phagosome components were classified, identifying orthologues in *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, mouse and humans. Mammalian orthologues were identified for 70% of the *Drosophila* phagosome proteins (Supplementary Table S1). Of the 140 proteins previously identified in the mammalian phagosome, 100 (70%) had orthologues within the *Drosophila* phagosome^{5–7}, indicating that S2 cells were a valid system from which to derive a model of phagocytosis.

Proteomic analyses of phagosomes have been enlightening but have limitations when interpreted in isolation¹⁰. First, the false negative rates are unknown but may be significant. Pertinent to this organelle, the data are derived from a single time point in the dynamic evolution of maturing phagosomes and hence might fail to include proteins transiently recruited either as the phagosome forms or while it undergoes maturation. Second, because of the sensitivity of mass spectrometry methods, minor contaminants that purify together with phagosomes may be identified as false positives. Third, proteomics provides no information about the physical or functional organization of the phagosome components. We therefore chose to apply a systems-based analysis to evaluate and organize these proteomic data further (Supplementary Fig. S1).

To place the phagosome proteins in biological context, the proteomic data were used to generate a protein–protein interaction network of this organelle^{11–13}. A base network of protein–protein interactions was first generated from confidence-rated interactions observed in five large-scale, high-throughput, experimental screens (Supplementary Methods). Mapping interactions across species provided an additional advantage because it predicted 'interologues' (protein interactions between orthologous proteins in different species) and facilitated aligning protein interaction networks^{14,15}. Statistical confidence in a predicted interaction was calculated from the confidence of observed orthologous interactions across species (Supplementary Methods)¹³. This approach yielded a base network incorporating 53,775 observed and inferred protein–protein interactions and associations of complexes in *Drosophila*. The 617 primary component proteins identified in the phagosome proteomics were then used to anchor a network of protein–protein interactions within this larger network. Various methods have been reported for exploratory analysis of confidence-weighted or probabilistic protein interaction networks, with a theme of extending a network through high-probability links^{12,16}. We adopted a modified approach on the basis of the expectation that the primary components identified by

¹Laboratory of Developmental Immunology, Massachusetts General Hospital/ Harvard Medical School, 55 Fruit Street, Boston, Massachusetts 02114, USA. ²MRC Centre for Inflammation Research, The University of Edinburgh, The Queen's Medical Research Institute, 47 Little France Crescent, Edinburgh EH16 4TJ, UK. ³Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. ⁴Department of Biomedical Engineering and High-Throughput Biology Center, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA. ⁵Department of Biomedical Engineering, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada. †Present address: Merck Research Laboratories, RY80K-107, PO Box 2000, Rahway, New Jersey 07065, USA.

experimental proteomics should remain central to the network. Using this strategy we were able to map 214 of the 617 phagosome proteins with high confidence. This map was then extended by prediction of secondary components, proteins absent from the proteomics but predicted from our interaction mapping as potentially associated with the phagosome (Supplementary Methods). The densest network contained 281 total vertices (primary and secondary components) and 806 edges (interactions) (Fig. 1). In addition, the highly sensitive network is shown in Fig. 2 in which clear clusters of potential functional complexes can be defined.

The building of protein–protein interaction networks complemented our original proteomic data in two ways. First, by extending the ‘starting players’ (primary components) we identified 50–80

secondary components (Supplementary Table S7). These include an unconventional myosin (*didum*), *Amph* (an amphiphysin orthologue) and *diaphanous* (Figs 1 and 2), all implicated in phagocytosis in certain mammalian systems^{17–19}. These represent potential false negatives not identified by tandem mass spectrometry perhaps because they are recruited to the phagosome transiently or only with specific cargo and are therefore absent from the latex-bead phagosomes used for proteomics. Second, we reasoned that these networks would provide information concerning the organization of the phagosome. The networks were in keeping both with a global interconnectivity throughout the organelle and with the organization of the phagosome into protein complexes and functional biomodules (identified as topologically interconnected proteins) (Figs 2 and

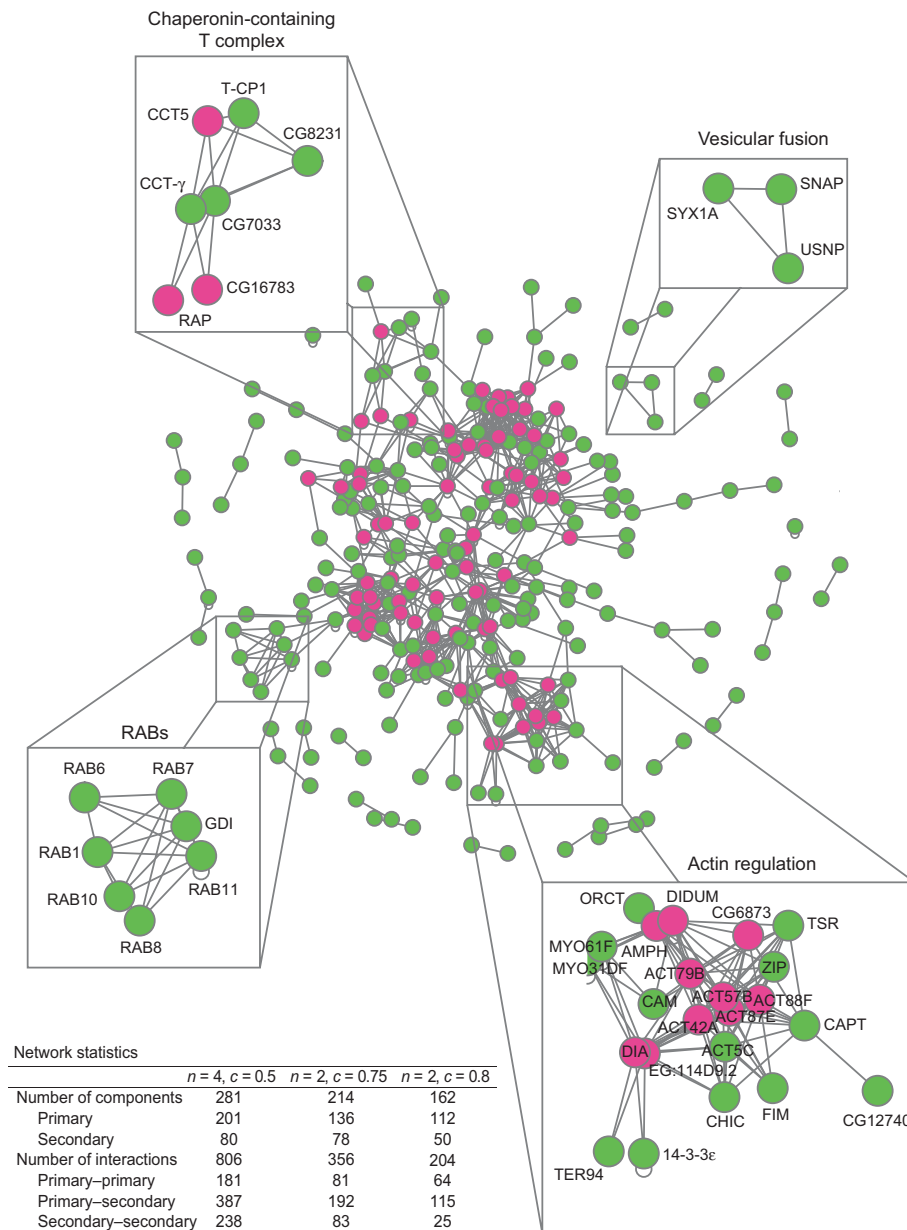


Figure 1 | Generation of the ‘phagosome interactome’. The network of high-confidence predicted protein–protein interactions between primary phagosome components was generated from yeast two-hybrid screens from *Drosophila* and orthologous proteins in *C. elegans* and yeast as well as using the hybridgenics yeast mass spectrometry pull-down data set. The network corresponding to $(n, c) = (4, 0.5)$ is shown. Only high-confidence interactions ($c > 0.5$) are shown, and vertices with no predicted interactions are omitted for clarity. Green vertices represent ‘primary components’ (that

is, those proteins identified by proteomics). Pink vertices are ‘secondary components’ (proteins predicted to interact by at least four high-confidence connections to primary phagosome proteins (that is, $n = 4$) but not present in our proteomic analysis). Higher-resolution maps with gene names are available on the Developmental Immunology website (<http://www.massgeneral.org/devimmunol/phagosome/>). Network statistics for three values of (n, c) are tabulated.

3d). Many of these were also confirmed with Gene Ontology (GO) as an independent means of classification (see Supplementary Tables S2–S5 and Supplementary Fig. S5).

Finally, to ascribe function to the phagosome components and to begin to validate the interaction map, we used RNAi and an assay based on fluorescence-activated cell sorting^{9,20} to screen 837 genes (including the 617 identified by proteomics) for their role in the phagocytosis of the Gram-positive and Gram-negative pathogens *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (Supplementary Table S6). In addition, we tested the role of the secondary components (Supplementary Table S7); 28% of the RNAi treatments affected phagocytosis, either increasing or decreasing bacterial uptake. This represented a fivefold enrichment over our previous screen, in which

randomly generated double-stranded RNAs were used²⁰ ($P = 2 \times 10^{-40}$ for enrichment; see Supplementary Table S9 for hit-rate enrichment analyses). Using this RNAi strategy we identified genes previously implicated in phagocytosis, including those encoding Rac, Cdc42, Rabs and proteins regulating vesicle trafficking. Although some were required for uptake of both organisms, we also identified components involved in the internalization of specific organisms (for example, the engulfment of *S. aureus*, but not that of *E. coli*, occurred primarily by a Rac2/RhoL-dependent mechanism). Genes were classified into three groups by using a more than 30% decrease as our hit limit: first, 31 genes decreased the internalization of both *S. aureus* and *E. coli* (23 with *z* scores of less than -1.5); second, 34 genes decreased only *S. aureus* internalization (44 with *z* scores of less than -1.5); and

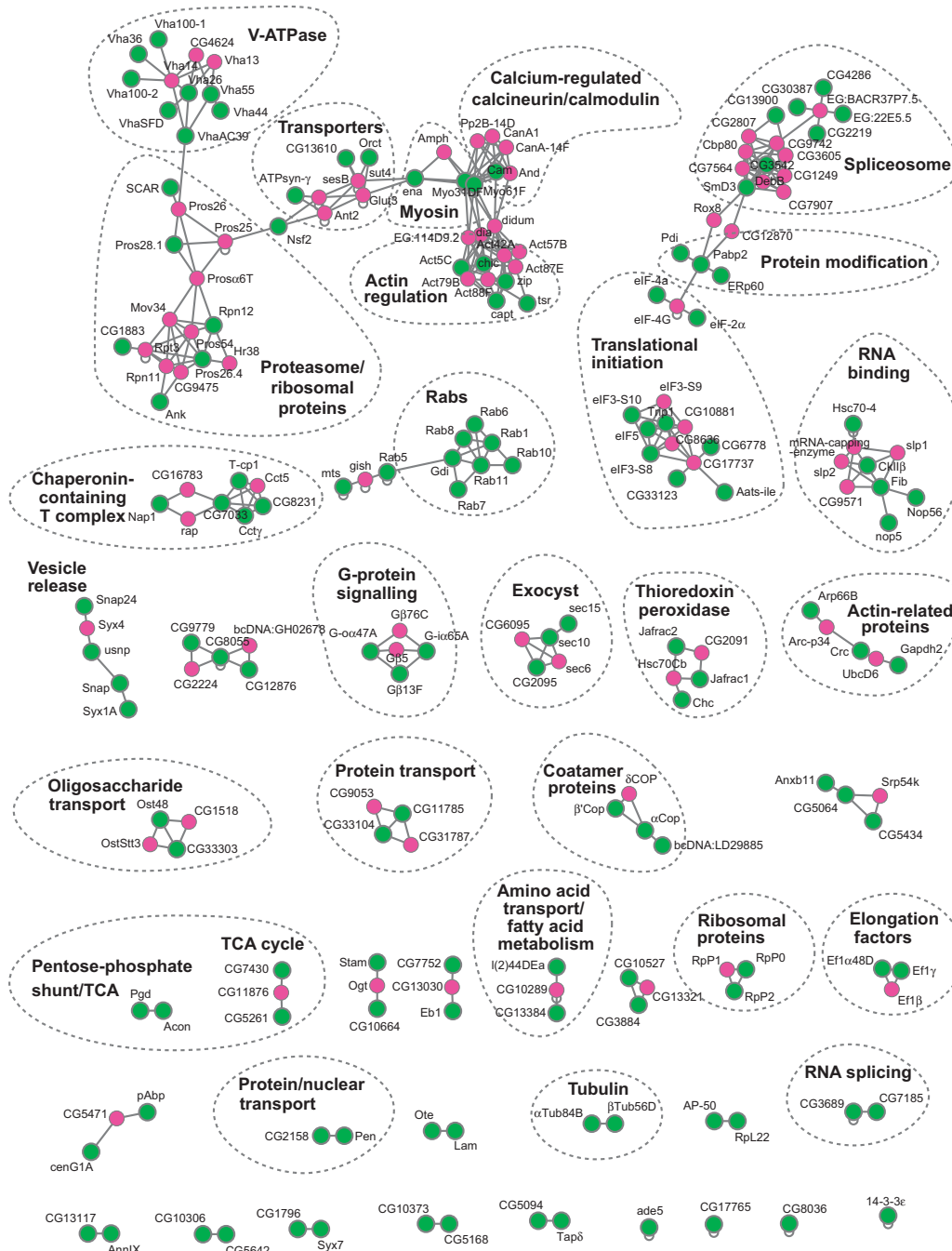


Figure 2 | Optimized phagosome networks. The interaction map was optimized (see Supplementary Methods) to define the most sensitive alternative. This map, corresponding to $(n,c) = (2,0.75)$, clearly defines

clusters of functional modules and protein complexes. Green vertices are primary components and pink vertices are secondary components. TCA, tricarboxylic acid.

third, 100 genes decreased only *E. coli* internalization (53 with *z* scores of less than -1.5). Silencing of certain genes increased the uptake of bacteria by more than 50%, potentially representing negative regulators of phagocytosis (38 genes increased *S. aureus* uptake, 55 with *z*

scores of more than 2.0; 34 genes increased *E. coli* internalization, 63 with *z* scores of more than 2.0; Fig. 3, and Supplementary Tables S6 and S7). Silencing of only one gene (*CG4046*, encoding a ribosomal protein) increased the uptake of both organisms.

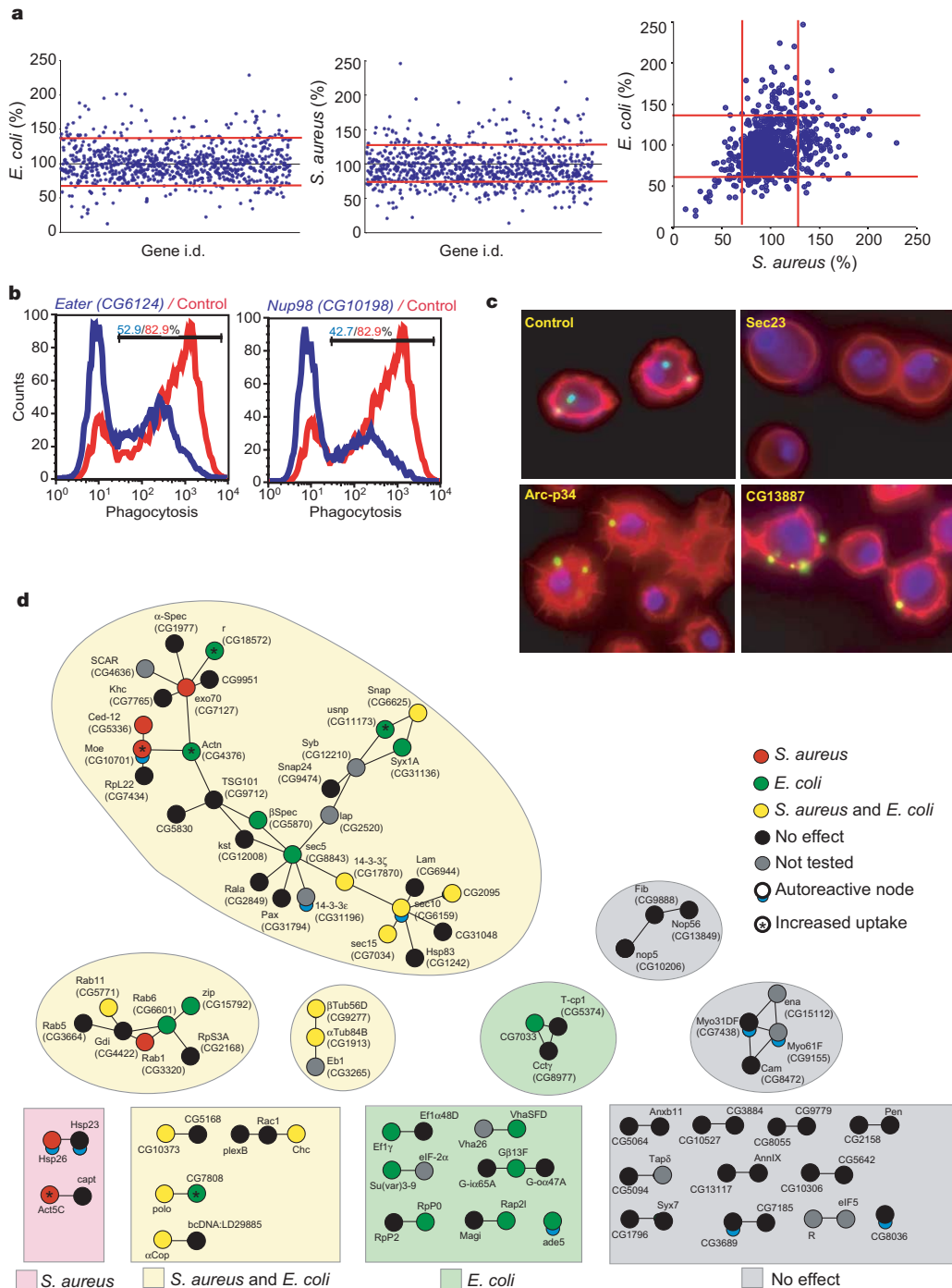


Figure 3 | Functional genomics to identify protein complexes and components involved in engulfment. **a**, The phagocytic index values after RNAi silencing of all phagosome genes on uptake of *S. aureus* and *E. coli*. Data are normalized to the mean of controls for each plate. **b**, Representative FACS plots of the phagocytosis assay demonstrating decreased *S. aureus* uptake after silencing of the two positive control genes, *CG6124* (*Eater*) and *CG10198* (*Nup98*) (blue histograms) compared with untreated controls (red histograms). **c**, Microscopy of changes in cell morphology and F-actin staining in cells with phagocytic defects after gene silencing. Silencing of *Sec23* resulted in marked abnormality in actin polymerization and a total absence of bacterial binding; silencing of *Arc-p34* (a member of the *Arp2/3* complex) resulted in cells showing the formation of prominent filopodia and

a failure to internalize bound bacteria; silencing of *CG13887* resulted in cells showing normal binding but failing to internalize bacteria. **d**, A protein–protein interaction network based on the high-confidence interactions between primary phagosome components was generated and the RNAi data were overlaid on this map to identify complexes involved in engulfment. Green nodes represent genes involved in *E. coli* uptake, red nodes represent genes involved in *S. aureus* uptake and yellow nodes are genes affecting uptake of both organisms. Unscreened genes are grey, and black nodes indicate genes with no effect on bacterial internalization. Complexes were arranged by effect on *S. aureus* (red areas), *E. coli* (green areas) and those regions affecting both organisms (yellow areas).

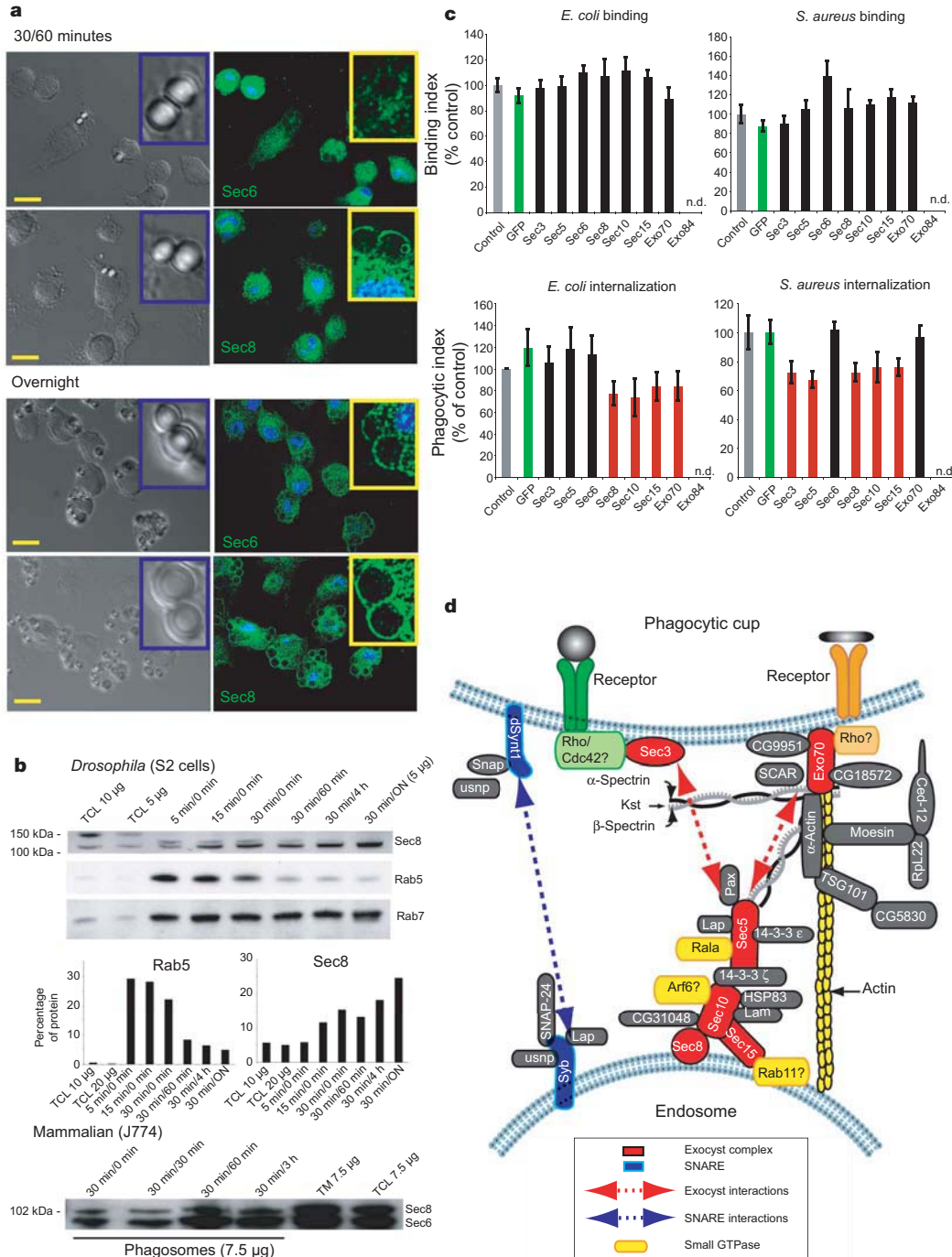


Figure 4 | Identification of the exocyst as a functional component of the phagosome. **a**, Fluorescence microscopy of Sec6/8 recruitment to mammalian 30 min/60 min (that is, 30 min binding on ice followed by 60 min of internalization at 37 °C) and late phagolysosomes. **b**, Western blots probed for the exocyst component Sec8 on isolated *Drosophila* phagosomes and Sec6 and Sec8 on mammalian phagosomes demonstrate the kinetics or recruitment of the exocyst to *Drosophila* and mammalian phagosomes. ON, overnight; TCL, total cell lysate; TM, total membrane. **c**, Effect of silencing exocyst components on bacterial binding and uptake. Red bars indicate RNAi treatments with a significant decrease compared with the irrelevant green fluorescent protein (GFP) control RNAi (green bar). n.d., not detected and hence not tested. Data are shown as means ± s.e.m. **d**, Model of the role of the exocyst derived from our combined iterative approach. Proteins were organized as predicted from the protein interaction data in Fig. 3d and oriented on the basis of the assumption that Exo70 and Sec3 would be recruited to the plasma

membrane and Sec8–Sec10–Sec15 present on endosomes. These maps identify known exocyst interactors such as the small GTPase Rala and predicted previously unknown potential regulators and interactors of the exocyst. Integrating the proteomics with the RNAi data leads us to propose the following role for the exocyst during phagosome biogenesis. First, phagocytic receptors induce the differential activation of GTPases Rac, Rho and Cdc42 (for example the *Drosophila S. aureus* receptor is Rac2/RhoL dependent) to mediate engulfment. Second, depending on the ligands encountered and receptors engaged, the GTPase differentially recruits either Sec3 or Exo70 to the area of the plasma membrane from which the particle will be internalized. Third, Exo70 and/or Sec3 provide docking sites for the exocyst components Sec8, Sec10 and Sec15, which are present on the endosome membrane, thus facilitating the recruitment and tethering of endosomes to the phagocytic cup. Fourth, once endosomes and the phagocytic cup are in close proximity, SNAREs mediate membrane fusion. Exocyst components are shown in red.

In addition, to identify those protein modules that had a function in phagocytosis, the results of the RNAi screen were overlaid on the protein–protein interaction networks (Fig. 3d). This analysis identified the tubulin, Rab–GDI (Rab–GDP-dissociation inhibitor) and chaperonin-containing T-complexes as important for the internalization of bacteria (Fig. 3d). In addition the large cluster consisting of components of the fusome and exocyst also contained several molecules that affected phagocytosis. Certain complexes segregated into only one of the two pathogen-specific pathways (Fig. 3d). These data indicate that only certain phagosome components are involved in engulfment and suggest other functions for the remaining proteins associated with this organelle.

As an illustrative example we chose to focus on the exocyst⁴. The eight components of the exocyst complex (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 and Exo84) can exist as separate proteins or as discrete subcomplexes or can assemble into an octodimeric complex. The exocyst assembles between the plasma membrane and secretory vesicles, tethering them before membrane fusion during exocytosis²¹ and is also required for the transport of vesicles to lateral membranes in polarized cells, for the branching of neurites and for the formation of synapses. In addition to its role in exocytosis, exocyst components also concentrate in recycling endosomes and regulate receptor recycling and delivery of membrane to areas of localized plasma-membrane expansion^{22,23}. Pertinent to phagocytosis, the exocyst components Sec10 and Sec15 interact directly with ADP-ribosylation factor 6 and Rab11, respectively, both of which regulate the recruitment of endosomes and membrane to the phagocytic cup^{22,24–26}. Although the exocyst had hitherto not been implicated in phagocytosis, six of the eight known exocyst components were identified by proteomics and were also clustered within the interactome and by GoMiner ($P < 0.0001$).

Using immunofluorescence (Fig. 4a) and western blotting (Fig. 4b), we confirmed assembly of the exocyst on mammalian and *Drosophila* phagosomes, suggesting an evolutionarily conserved role for this complex in phagocytosis. We proposed that the exocyst might be involved either in the delivery of receptors during early phagocytosis or in membrane recruitment. Silencing of exocyst components did not decrease bacteria binding at 27 °C (conditions permissive for exocytosis (Fig. 4c), indicating that the exocyst was not required for receptor delivery. However, silencing of Sec8, Sec10 and Sec15 resulted in a 25–30% decrease in internalization (Fig. 4c), demonstrating a role for these components in the uptake of both *S. aureus* and *E. coli*. Sec3, Sec5 and Exo70 were differentially involved in uptake of the different organisms. These observations are consistent with observations that the exocyst acts not as a single macromolecular complex but assembles as distinct subcomplexes^{27,28}. Specifically, Sec3 and Exo70 localize to target membranes, providing the docking site for other exocyst components²¹ that are delivered from subcellular vesicles, such as endosomes, in which they concentrate^{22,23}. It is possible that the involvement of Exo70 and Sec3 reflects differential receptor engagement by different pathogens. Unlike other regulators of early phagocytosis, Sec6 and Sec8 continued to accumulate on maturing phagosomes, with maximal association occurring after the loss of Rab5, a marker of immature phagosomes, and remained associated with latex-bead phagolysosomes for up to 16 h (Fig. 4a, b). These observations indicate that the exocyst might have additional roles in mature phagosomes. However, because silencing of the exocyst affected the efficient internalization of particles and the generation of phagosomes, we were unable to test this possibility definitively. These data lead us to propose a model (outlined in Fig. 4d) of a hitherto unknown but evolutionarily conserved role for the exocyst complex in phagocytosis. We suggest that receptor engagement (through the activation of small GTPases) recruits membrane exocyst components, Sec3 or Exo70, which act as docking localization sites on phagocytic cups. Subsequently, Sec8–Sec10–Sec15 assembles between endosomes and the phagocytic cup to facilitate membrane

delivery and internalization. Additional roles of the exocyst on mature phagosomes remain to be defined.

The essential contribution of phagocytosis to innate and adaptive immunity underscores the importance of understanding the regulation of particle internalization and the organization of the phagosome. Using a combination of systems biology approaches we have generated a detailed model of the phagosome, identified novel regulators of phagocytosis and highlighted potentially unknown molecules and pathways involved in host defence. We suggest that some of these may be important, previously unidentified, targets for pathogens that evade host defence within the phagosome or disrupt functions of this organelle. Our ‘systems-based model’ has provided new insight into the functional organization of the phagosome and the necessary framework on which to build, in an iterative manner, to further our understanding of phagocytosis. We provide evidence that this model can be extended to mammalian phagocytosis, adding new dimensions to our understanding of the host–pathogen interaction and other aspects of innate and adaptive immunity.

METHODS

Phagosome isolation, proteomics and protein identification were performed as described previously²⁹; and detailed methods are available in Supplementary Methods. Generation of the phagosome interactome and network inference and analysis were performed as described in the text and in Supplementary Methods. Double-stranded RNA was generated from a *Drosophila* RNAi library containing 13,000 genes (Geneservice) and the RNAi screen was performed as described previously²⁰. Primer sequences used to generate each double-stranded RNA can be located using the MRCg plate and well identifications in Supplementary Table S8 and the Geneservice website (<http://www.geneservice.co.uk/home/>) (further information is available in Supplementary Methods).

GO Miner. Gene ontology classifications were drawn from the Gene Ontology website (<http://www.geneontology.org>). The enrichment factor (Re) found in the DAG (directed acyclic graph) files and the P value for statistical significance were calculated by GO Miner as follows. The enrichment factor Re is defined as $(n_i/n)/(N_i/N)$, where n_i is phagosome proteins in a specific category, n is the total number of phagosome proteins, N_i is the total number of proteins in a specific category in the representative data set, and N is the total number of proteins in the representative data set. GO Miner uses two-sided Fisher’s exact test to determine the P value for a category and tests the null hypothesis that the category is neither enriched in, nor depleted of, flagged genes with regard to what would have been expected by chance alone. Full data sets used to derive these data are available on request. In addition, GO Miner generated data on the enrichment of BioCarta pathways, details of which are available in Supplementary Table S5 or on the BioCarta website (<http://www.biocarta.com>).

Received 13 July; accepted 24 October 2006.

Published online 6 December 2006.

- Greenberg, S. & Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 136–145 (2002).
- Aderem, A. & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623 (1999).
- Stuart, L. M. & Ezekowitz, R. A. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**, 539–550 (2005).
- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D. & Novick, P. The exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 6483–6494 (1996).
- Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nature Rev. Immunol.* **3**, 280–291 (2003).
- Desjardins, M. & Griffiths, G. Phagocytosis: latex leads the way. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 498–503 (2003).
- Garin, J. et al. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* **152**, 165–180 (2001).
- Pearson, A. M. et al. Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.* **5**, 815–824 (2003).
- Ramet, M. et al. *Drosophila* scavenger receptor Cl is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* **15**, 1027–1038 (2001).
- Ge, H., Walhout, A. J. & Vidal, M. Integrating ‘omic’ information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet.* **19**, 551–560 (2003).
- Vidal, M. Interactome modeling. *FEBS Lett.* **579**, 1834–1838 (2005).
- Bader, J. S. Greedily building protein networks with confidence. *Bioinformatics* **19**, 1869–1874 (2003).
- Bader, J. S., Chaudhuri, A., Rothberg, J. M. & Chant, J. Gaining confidence in high-throughput protein interaction networks. *Nature Biotechnol.* **22**, 78–85 (2004).

14. Uetz, P. & Finley, R. L. Jr. From protein networks to biological systems. *FEBS Lett.* **579**, 1821–1827 (2005).
15. Matthews, L. R. *et al.* Identification of potential interaction networks using sequence-based searches for conserved protein–protein interactions or ‘interologs’. *Genome Res.* **11**, 2120–2126 (2001).
16. Asthana, S., King, O. D., Gibbons, F. D. & Roth, F. P. Predicting protein complex membership using probabilistic network reliability. *Genome Res.* **14**, 1170–1175 (2004).
17. Cox, D. *et al.* Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nature Cell Biol.* **4**, 469–477 (2002).
18. Gold, E. S. *et al.* Amphiphysin II α , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* **12**, 285–292 (2000).
19. Colucci-Guyon, E. *et al.* A role for mammalian diaphanous-related formins in complement receptor (CR3)-mediated phagocytosis in macrophages. *Curr. Biol.* **15**, 2007–2012 (2005).
20. Ramet, M., Manfruelli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B. & Ezekowitz, R. A. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* **416**, 644–648 (2002).
21. Boyd, C., Hughes, T., Pypaert, M. & Novick, P. Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J. Cell Biol.* **167**, 889–901 (2004).
22. Zhang, X. M., Ellis, S., Sriratanana, A., Mitchell, C. A. & Rowe, T. Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 43027–43034 (2004).
23. Prigent, M. *et al.* ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J. Cell Biol.* **163**, 1111–1121 (2003).
24. Bajno, L. *et al.* Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J. Cell Biol.* **149**, 697–706 (2000).
25. Niedergang, F., Colucci-Guyon, E., Dubois, T., Raposo, G. & Chavrier, P. ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J. Cell Biol.* **161**, 1143–1150 (2003).
26. Cox, D., Lee, D. J., Dale, B. M., Calafat, J. & Greenberg, S. A. Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 680–685 (2000).
27. Clandinin, T. R. Surprising twists to exocyst function. *Neuron* **46**, 164–166 (2005).
28. Mehta, S. Q. *et al.* Mutations in *Drosophila* sec15 reveal a function in neuronal targeting for a subset of exocyst components. *Neuron* **46**, 219–232 (2005).
29. Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G. & Griffiths, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* **124**, 677–688 (1994).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank R. Kearney and J. Bergeron from the Montreal Proteomics Network, and Genome-Quebec-Canada for their support. J.S.B., M.D. and R.A.B.E. thank their laboratories for their support. The work was supported by a Wellcome Trust Clinician Scientist Award to L.M.S., grants from the Whitaker Foundation and NIH/NIGMS to J.S.B., grants from the Canadian Institute for Health Research and Genome-Canada-Québec to M.D., and NIH grants to R.A.B.E. The work was conceived through discussions between the Laboratory of Developmental Immunology, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School and the Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal. The bioinformatics and RNAi screens were performed in the Laboratory of Developmental Immunology, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School; the protein–protein networks were generated in the Department of Biomedical Engineering and High-Throughput Biology Center, Johns Hopkins University; the proteomics, the annotation of the components and the phagosome isolation were performed in the Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal.

Author Contributions L.M.S. and J.B. contributed equally to this work. J.S.B., M.D. and R.A.B.E. contributed equally to this work. The manuscript was written by L.M.S. and the website linked to this paper was designed by G.M.C.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.M.S. (l.stuart@partners.org).