

Université de Montréal

L'évolution du phagosome

Par
Jonathan Boulais

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D)
en Pathologie et Biologie Cellulaire

31 décembre, 2010

© Jonathan Boulais, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

L'évolution du phagosome

Présenté par :

Jonathan Boulais

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dorian-Lucian Ghitescu, président-rapporteur

Michel Desjardins, directeur de recherche

Sébastien Lemieux, membre du jury

Jérôme Garin, examinateur externe

Nathalie Arbour, représentante du doyen de la FES

À mon papa, le grand boxeur au cœur d'or

Résumé

La phagocytose est un processus cellulaire par lequel de larges particules sont internalisées dans une vésicule, le phagosome. Lorsque formé, le phagosome acquiert ses propriétés fonctionnelles à travers un processus complexe de maturation nommé la biogénèse du phagolysosome. Cette voie implique une série d'interactions rapides avec les organelles de l'appareil endocyttaire permettant la transformation graduelle du phagosome nouvellement formé en phagolysosome à partir duquel la dégradation protéolytique s'effectue. Chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, la phagocytose est employée pour ingérer les bactéries de son environnement afin de se nourrir alors que les organismes multicellulaires utilisent la phagocytose dans un but immunitaire, où des cellules spécialisées nommées phagocytes internalisent, tuent et dégradent les pathogènes envahissant de l'organisme et constitue la base de l'immunité innée. Chez les vertébrés à mâchoire cependant, la transformation des mécanismes moléculaires du phagosome en une organelle perfectionnée pour l'apprêtement et la présentation de peptides antigéniques place cette organelle au centre de l'immunité innée et de l'immunité acquise. Malgré le rôle crucial auquel participe cette organelle dans la réponse immunitaire, il existe peu de détails sur la composition protéique et l'organisation fonctionnelles du phagosome. Afin d'approfondir notre compréhension des divers aspects qui relie l'immunité innée et l'immunité acquise, il devient essentiel d'élargir nos connaissances sur les fonctions moléculaires qui sont recrutées au phagosome.

Le profilage par protéomique à haut débit de phagosomes isolés fut extrêmement utile dans la détermination de la composition moléculaire de cette organelle. Des études provenant de notre laboratoire ont révélé les premières listes protéiques identifiées à partir de phagosomes murins sans toutefois déterminer le ou les rôle(s) de ces protéines lors du processus de la phagocytose (Brunet *et al*, 2003; Garin *et al*, 2001). Au cours de la première étude de cette thèse (Stuart *et al*, 2007), nous avons entrepris la caractérisation fonctionnelle du protéome entier du phagosome de la drosophile en combinant diverses techniques d'analyses à haut débit (protéomique, réseaux d'interactions protéique et ARN interférent). En utilisant cette

stratégie, nous avons identifié 617 protéines phagosomales par spectrométrie de masse à partir desquelles nous avons accru cette liste en construisant des réseaux d'interactions protéine-protéine. La contribution de chaque protéine à l'internalisation de bactéries fut ensuite testée et validée par ARN interférent à haut débit et nous a amené à identifier un nouveau régulateur de la phagocytose, le complexe de l'exocyst. En appliquant ce modèle combinatoire de biologie systémique, nous démontrons la puissance et l'efficacité de cette approche dans l'étude de processus cellulaire complexe tout en créant un cadre à partir duquel il est possible d'approfondir nos connaissances sur les différents mécanismes de la phagocytose.

Lors du 2^e article de cette thèse (Boulais *et al*, 2010), nous avons entrepris la caractérisation moléculaire des étapes évolutives ayant contribué au remodelage des propriétés fonctionnelles de la phagocytose au cours de l'évolution. Pour ce faire, nous avons isolé des phagosomes à partir de trois organismes distants (l'amibe *Dictyostelium discoideum*, la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* et la souris *Mus musculus*) qui utilisent la phagocytose à des fins différentes. En appliquant une approche protéomique à grande échelle pour identifier et comparer le protéome et phosphoprotéome des phagosomes de ces trois espèces, nous avons identifié un cœur protéique commun à partir duquel les fonctions immunitaires du phagosome se seraient développées. Au cours de ce développement fonctionnel, nos données indiquent que le protéome du phagosome fut largement remodelé lors de deux périodes de duplication de gènes coïncidant avec l'émergence de l'immunité innée et acquise. De plus, notre étude a aussi caractérisée en détail l'acquisition de nouvelles protéines ainsi que le remodelage significatif du phosphoprotéome du phagosome au niveau des constituants du cœur protéique ancien de cette organelle. Nous présentons donc la première étude approfondie des changements qui ont engendré la transformation d'un compartiment phagotrophe à une organelle entièrement apte pour la présentation antigénique.

Mots clés : Protéomique, phagocytose, évolution, phosphoprotéomique, biologie systémique, exocyst, interactome, génomique comparative, immunité acquise, immunité innée et phagotrophie.

Abstract

Phagocytosis is a cellular process by which large particulate material are internalized in a newly formed vesicle, the phagosome. Once formed, the phagosome acquires its functional properties through a complex maturation process called phagolysosome biogenesis. This pathway involves a series of rapid interactions with organelles of the endocytic apparatus, enabling the gradual transformation of newly formed phagosomes into phagolysosomes in which proteolytic degradation occurs. The amoeba *Dictyostelium discoideum* uses phagocytosis as a predation mechanism for feeding, whereas multicellular organisms utilize this process as an immune mechanism where specialized cells named phagocytes internalize, kill and degrade pathogens found through the host, forming the basis of innate immunity. In jawed vertebrates however, the phagosome links innate and adaptive immunity by processing and presenting antigenic peptides. Despite its crucial role in immunity, little is known about the composition and the functional organization of the phagosome. It is therefore essential to characterize in details the functional properties that are recruited to the phagosome.

High-throughput proteomics analysis of isolated phagosomes has been tremendously helpful for the molecular comprehension of this organelle. Studies of our lab notably have revealed the first proteomics identification of mouse phagosomes without determining the roles of these proteins through the complex process of phagocytosis (Brunet *et al*, 2003; Garin *et al*, 2001). In the first study of this thesis (Stuart *et al*, 2007), we characterized the functions of the entire drosophila phagosome proteome by combining high-throughput proteomics, interactive networks and RNAi. By applying this strategy, we've identified 617 phagosomal proteins by mass spectrometry from which we've expanded this list by building the phagosome interactome. The contribution of each protein to bacterial internalization was tested and validated by RNAi and led to the identification of a new regulator of phagocytosis, the exocyst complex. 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.

In the second study of this thesis (Boulais *et al*, 2010), we characterized some of the key steps that contributed to the remodeling of phagosomes functional properties during evolution. To do so, we isolated this organelle from three distant organisms: the amoeba *Dictyostelium discoideum*, the fruit fly *Drosophila melanogaster*, and mouse (*Mus musculus*) that use phagocytosis for different purposes. By performing and comparing proteomics and phosphoproteomics analyses of isolated phagosomes from the three species, we identified an ancient core of phagosomal proteins around which the immune function of this organelle have likely organized. Our data indicate that a larger proportion of the phagosome proteome, has been acquired through gene duplication at periods coinciding with the emergence of innate and adaptive immunity. Our study also characterizes in detail the acquisition of novel proteins and the significant remodeling of the phagosome phosphoproteome that contributed to modify the core constituents of this organelle in evolution. Our work thus provides the first thorough analysis of the changes that enabled the transformation of the phagosome from a phagotrophic compartment into an organelle fully competent for antigen presentation.

Keywords : Proteomics, phagocytosis, evolution, phosphoproteomics, systems biology, exocyst, interactome, comparative genomics, innate immunity, adaptive immunity, phagotrophy.

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>IV</i>
<i>Abstract</i>	<i>VII</i>
<i>Table des matières</i>	<i>IX</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>XIII</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>XIV</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>XVI</i>
<i>Remerciements</i>	<i>XXV</i>
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. Historique de la phagocytose	2
2. La phagocytose et la biogénèse du phagolysosome	4
3. L'évolution de la phagocytose	9
3.1 <i>L'origine de la phagocytose et l'eucaryogenèse</i>	<i>13</i>
4. La phagocytose chez l'amibe <i>Dictyostelium discoideum</i> : la phagotrophie	15
4.1 <i>Les récepteurs phagocytiques de l'amibe <i>Dictyostelium discoideum</i></i>	<i>18</i>
4.2 <i>L'internalisation lors de la phagocytose chez l'amibe <i>Dictyostelium discoideum</i></i>	<i>19</i>
4.3 <i>La maturation du phagosome chez l'amibe <i>Dictyostelium discoideum</i></i>	<i>20</i>
5. La multicellularité et l'immunité innée	22
6. La phagocytose chez la drosophile	24
6.1 <i>Les récepteurs phagocytaires : comparaison drosophile - mammifères</i>	<i>25</i>
6.1.1 Les récepteurs DSCAM.....	26
6.1.2 Les récepteurs « scavenger » (éboueurs).....	29
6.1.3 Les récepteurs à domaines répétés EGF-like.....	29
6.1.4 Les lectines.....	30
6.1.5 Les récepteurs du complément	30
7. Les récepteurs Fcγ et TLR de l'immunité innée	32

7.1	<i>Les récepteurs Fcγ</i>	32
7.2	<i>Les récepteurs TLR</i>	32
8.	L'immunité acquise et la phagocytose chez les vertébrés à mâchoire.....	36
8.1	<i>L'origine de l'immunité acquise</i>	37
8.1.1	L'hypothèse de la mâchoire.....	40
8.1.2	Les gènes RAG.....	42
8.2	<i>La duplication génomique</i>	43
8.3	<i>La phagocytose et la présentation antigénique</i>	45
8.3.1	La présentation antigénique sur CMH de classe II.....	46
8.3.2	La présentation antigénique sur CMH de classe I.....	48
9.	Le protéome du phagosome.....	51
9.1	<i>Le réticulum endoplasmique et la phagocytose</i>	54
10.	Objectifs et méthodologie des travaux.....	56
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS.....		58
11.	Article I.....	59
11.1	<i>Résumé</i>	60
11.2	<i>Abstract</i>	62
11.3	<i>Results and discussion</i>	63
11.4	<i>Methods</i>	68
11.4.1	GO Miner.....	69
11.5	<i>References</i>	70
11.6	<i>Figure legends</i>	73
11.7	<i>Supplementary Information</i>	88
11.7.1	Supplementary discussion.....	88
11.7.1.1	Validation of phagosome purity.....	88
11.7.1.2	Interactome analysis.....	89
11.7.1.3	Gene Ontology classification of phagosome proteins.....	90
11.7.1.4	Conclusions and perspectives on phagocytosis.....	92
11.7.1.5	Supplementary Discussion References.....	94
11.7.2	Supplementary Methods M1.....	95

11.7.2.1	Phagosome isolation	95
11.7.2.2	Assessment of contamination by 2-dimensional gel electrophoresis	96
11.7.2.3	Trypsin digestion and peptide extraction	96
11.7.2.4	Mass spectrometry analysis	97
11.7.2.5	Bioinformatics analysis and Protein identification	98
11.7.2.6	Supplementary Methods M1 References	100
11.7.3	Supplementary Methods M2.....	101
11.7.3.1	Building and optimisation of the phagosome interactome - Network inference and analysis	101
11.7.3.2	Supplementary Methods M2 References	105
11.7.4	Supplementary Methods M3.....	106
11.7.4.1	Generation of dsRNA and treatment of S2 cells.....	106
11.7.4.2	RNAi screening to identify genes involved in phagocytosis	107
11.7.4.3	Supplementary Methods M3 References	108
12.	Article II.....	109
12.1	<i>Résumé</i>	110
12.2	<i>Abstract</i>	112
12.3	<i>Introduction</i>	113
12.4	<i>Results</i>	115
12.4.1	Proteomics analyses of phagosomes.....	115
12.4.2	Origin of the mouse phagosome proteome	117
12.4.3	Refinement of the phagosome functions occurred during two major periods of gene duplication	118
12.4.4	Evolution of the phagosome phosphoproteome.....	119
12.4.5	Evolution of phagosomal protein networks	121
12.5	<i>Discussion</i>	123
12.6	<i>Methods</i>	127
12.6.1	Phagosomes preparation	127
12.6.2	Phagosomal protein identification by SDS-PAGE and Mass Spectrometry.....	127
12.6.3	Phosphopeptide enrichment and Mass Spectrometry	128
12.6.4	Peptide identification	129
12.6.5	Bioinformatics	129
12.6.6	Phosphorylation site localization	131
12.6.7	Conservation of phosphosites in <i>Dictyostelium</i> , <i>Drosophila</i> and mouse phagosomal phosphoproteins	132

12.6.8	Conservation of phosphosites among chordates	132
12.6.9	Network analyses.....	133
12.7	<i>Acknowledgements</i>	134
12.8	<i>References</i>	135
12.9	<i>Figure legends</i>	141
CHAPITRE 3 : Discussion		160
	<i>Discussion générale</i>	161
12.10	<i>La protéomique dans l'étude de la phagocytose</i>	161
12.11	<i>L'analyse de la phagocytose chez la drosophile par biologie systémique</i>	162
12.12	<i>Le complexe de l'exocyst est associé au phagosome</i>	163
12.13	<i>Analyses protéomiques des phagosomes de l'amibe, la drosophile et la souris</i>	165
12.14	<i>Comparaison protéomique des phagosomes de l'amibe, de la drosophile et de la souris</i>	166
12.15	<i>Analyses par génomique comparative de l'origine évolutive du protéome phagosomal de la souris</i>	168
12.16	<i>Le remodelage fonctionnel du phagosome à travers l'évolution</i>	169
12.16.1	La transformation du phagosome murin a eu lieu lors de deux périodes de duplication de gènes.....	169
12.16.2	Innovations moléculaires sur le phagosome murin suite à l'établissement de l'immunité acquise.....	171
12.16.3	Remodelage des sites de phosphorylation des anciennes protéines du phagosome murin.....	172
12.17	<i>La contamination des phagosomes de billes de latex</i>	173
12.18	<i>Conclusion</i>	175
Références		177
Annexes I. Article III		197
Annexes II. Article IV		200
Annexes III. Article V		203
Annexes IV. Articles VI.....		206

Liste des tableaux

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Tableau I | Orthologues des récepteurs de surface de la drosophile chez les mammifères..... 26

CHAPITRE II : RÉSULTATS - Article II

**Tableau I | Interaction levels of the phagosome network within different phagocytosis purpose....
..... 154**

Liste des figures

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1. Modèle moderne des récepteurs et voies de signalisation impliqués lors de la phagocytose de microorganismes.	5
Figure 2. Le processus de maturation du phagosome.	7
Figure 3. L'évolution du mécanisme de la phagocytose.	12
Figure 4. Arbre phylogénétique des eucaryotes.	16
Figure 5. Les immunoglobulines DSCAM des insectes et des mammifères démontrent des caractéristiques fonctionnelles communes.	28
Figure 6. Reconnaissance de PAMP par les récepteurs TLRs.	34
Figure 7. Stades évolutifs du système immunitaire des deuterostomes.	39
Figure 8. Voie de la présentation antigénique des CMH de classe II.	46
Figure 9. Modèle de la présentation croisée d'antigènes exogènes effectuée dans le phagosome des vertébrés.	50
Figure 10. Le premier phagosome virtuel publié en 2001.	53

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS - Article I

Figure 1: Generation of the 'phagosome interactome'.	79
Figure 2: Optimized phagosome networks.	80
Figure 3: Functional genomics to identify protein complexes and components involved in engulfment.	81
Figure 4: Identification of the exocyst as a functional component of the phagosome.	82
Supplementary Figure SF1. Schema of systems biology strategy used to analyse the <i>Drosophila</i> phagosome.	83
Supplementary Figure SF2. Assessment of <i>Drosophila</i> S2 phagosome purity.	84
Supplementary Figure SF3. 2-dimensional gel electrophoresis assessment of phagosome purity in <i>Drosophila</i> S2 cells.	85
Supplementary Figure SF4. Assessment of organelle contamination using J774.	86
Supplementary Figure SF5. Bioinformatic identification of functional biomodules using gene ontology classifications GoMiner.	87
Fig. J1. Algorithm optimization.	103
Fig. J2. Network statistics.	104

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS - Article II

Figure 1. Shared components define the ‘ancient’ phagosome.	150
Figure 2. Origin of the mouse phagosome proteome.....	151
Figure 3. Novel components of the mouse phagosome emerged through two major periods of gene duplication.....	152
Figure 4. Evolution of the phagosome phosphoproteome.....	153
Figure 5. Evolution of the phagosome proteins network.	155
Figure 6. Role of molecular machines of mixed origin in phagosome functions.....	156
Figure S1. Conservation of phagosome proteins of mouse, Drosophila and Dictyostelium identified by mass spectrometry.....	157
Figure S3. Gene duplications events of smooth and rough endoplasmic reticulum (RER and SER) proteins and Drosophila phagosome proteome.....	158
Figure S4. Evolutionary origin of IFN-γ-regulated phosphoproteins of mouse phagosome and conservation of phosphorylation sites within the phagosome phosphoproteomes of mouse, Drosophila and Dictyostelium.....	159

Liste des abbreviations

2D	Two dimensions
5'/5'	5 minutes pulse/ 5 minutes chase
9TM	9 transmembrane domains
A2M	Alpha-2-macroglobulin
ABP-120	Actin binding protein 120
ACN	Acetonitrile
ADN	Deoxyribonucleic acid
AID	Activation-induced deaminase
Alix	ALG-2-interacting protein X
Amph	Amphiphysin
APAR	Agnathan Paired receptors resembling Antigen Receptors
ARF6	ADP-ribosylation factor 6
ARN	Ribonucleic acid
Arp2/3	Actin-related protein 2/3
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
ATPase	Adenosine-5'-triphosphatase
BCR	B Cell Receptor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Ca ²⁺	Calcium

CD36	Cluster of differentiation 36
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CLIP	Class-II associated invariant chain peptide
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CP-p34	Cystein proteinase protein 34
CR3	Complement receptor 3
CyCAP	Galectin-3-binding protein
Da	Dalton
DAG	Directed acyclic graph
DC	Dendritic cell
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DSCAM	Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
E.A.	Early adaptive immunity
E1	Ubiquitin-activating enzymes
E2	Ubiquitin carrier or conjugation protein
E3	Ubiquitin protein ligase
EE	Early endosome

EEA1	Early endosome antigen 1
EGF	Epidermal growth factor
EM	Electron microscopy
ER	Endoplasmic reticulum
ERp57	Endoplasmic reticulum resident protein 57
EST	Expressed sequence tag
Exp.	Expected
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FcR	Fc Receptor
FDR	False discovery rate
FERM	4.1 protein, Ezrin, Radixin, Moesin
Gal-3	Galectin-3
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GO	Gene ontology
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
GTPase	Guanosine triphosphatase
H	Hydrolases
HSC71	Heat shock cognate protein 71

HSP70	Heat shock protein 70
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IEL	Intraepitheliale
IFN-g	Interferon gamma
IgG	Immunoglobuline de type G
IgSF	Immunoglobulin superfamily
In.	Innate immunity
IRG47/Irgm1	Immunity-related GTPase family M protein 1
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
L.A.	Late adaptive immunity
L30	39S ribosomal protein L30
LAMP1	Lysosomal associated membrane protein 1
LAMP2	Lysosomal associated membrane protein 2
LDL	Low-density lipoprotein
LE	Late endosome
LIMP	Lysosomal integral membrane protein
LMP2	Proteasome subunit beta type-9
LmpB	Lysosomal membrane protein B
LPS	Lipopolysaccharides

LRP	Lipoprotein receptor-related protein
LTA	Lipoteichoic acid
Ly	Lysosome
MCR	Macroglobulin-complement related protein
MEGF	Multiple epidermal growth factor (EGF)-like domain
MG160	Golgi apparatus protein 1
Mm	<i>Mus musculus</i>
MPS1	Macrophage expressed gene 1
MS/MS	Tandem mass spectrometry
Mya	Million years
n	Number
N.D.	Non-déterminé/Not determined
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nano-LC	Nano Liquid Chromatography
NDK-B	Nucleoside diphosphate kinase B
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NH ₄ OH	Ammonium hydroxide
NICIR	Novel Immunoreceptor tyrosine-based activation motif-Containing Immunoglobulin superfamily Receptor
nL/min	nanoliter/minute
NLR	NOD-like receptor

NOX2	NADPH oxydase 2
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
Obs.	Observed
Olf749	Olfactory receptor 749
ON	Overnight
<i>P</i>	Probability
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PDI	Protein disulfide isomerase
PGM-b	Phosphoglucomutase B
PGRP	Peptidoglycan-recognition protein
Ph.	Phagotrophy
Phox	Phagosomal oxydase
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PKCa	Protein kinase C alpha
ppm	particule par million
PRR	Pathogen recognition receptor
PTM	Post-translational modification
Rab-GDI	Rab-GDP-dissociation inhibitor
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAG	Recombination-activating gene

Ras	Rat sarcoma
rER	Rough endoplasmic reticulum
Rho	Ras homolog
RhoA	Ras homolog gene family member A
RNAi	RNA interference
S/T/Y	Sérine/Thréonine/Tyrosine
S19	40S ribosomal protein S19
SDS	Sodium lauryl sulfate
sER	Smooth endoplasmic reticulum
SNAP	Synaptosomal-associated protein
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
SR	Scavenger Receptor
SREC	Scavenger receptor expressed by endothelial cells
TAP1	Antigen peptide transporter 1
TAP2	Antigen peptide transporter 2
TCA	Tricarboxylic acid
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCL	Total cell lysate
TCR	T Cell Receptor
TEP	Thioester-containing protein

tf	Transferrin
TFA	Trifluoro acetic acid
TGN	Trans-Golgi network
TGN38	Trans-Golgi network integral membrane protein 38
Tim23	Translocase of inner mitochondrial membrane 23
TiO ₂	Titanium dioxyde
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
TLR	Toll Like Receptor
TM	Total Membrane
TMP-21	Transmembrane protein 21
TRAIL	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10
Ub	Ubiquitin
v2.20	Version 2.20
Vamp7	Vesicle associated membrane protein 7
V-ATPase	Adénosine triphosphatase de type vacuolaire
VCBP	V-region containing chitin-binding protein
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
VLR	Variable Lymphocyte Receptor
vs.	Versus
Vti1	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1

WASP Wiskott-Aldrich syndrome protein

Remerciements

J'aimerais d'abord grandement remercier Mélissa (ma « chérie ») pour son énorme soutien et sa compréhension, mes parents et ma sœur Karynne pour m'avoir encouragé et soutenu pendant toutes ces années d'études. Merci à mes collègues Luc English, Guillaume Goyette, Magali Chemali, Annie Laplante, Christiane Rondeau, Sophie Duclos, Diana Matheoud, François-Xavier Campbell-Valois, Isabelle Jutras, Mathias Trost et Sylvain Brunet pour la merveilleuse ambiance de travail, leurs conseils, leur soutien moral, ainsi que les grandes discussions scientifique et de la vie. Vous êtes des gens de qualité dont j'ai rarement rencontré. Merci beaucoup à Magali pour avoir pris le temps de lire et corriger ma thèse. Un grand merci à Sylvain Brunet (« Dr. Bru-Bru ») avec lequel nous avons établi les bases d'une nouvelle forme d'analyse protéomique par bioinformatique.

Enfin, un grand merci à mon directeur de thèse, Michel, qui m'a soutenu et conseillé pendant des périodes difficiles. Michel m'a fait confiance et m'a donné toute la latitude nécessaire pour développer un projet dont nous n'avions pratiquement aucune connaissance, mais que nous avons développé et approfondi avec succès.

“Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution”

- Theodosius Dobzhansky

(Figure marquante du néodarwinisme)

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. Historique de la phagocytose

Par sa découverte du processus de la phagocytose en 1882, Ilya Ilitch Metchnikov devint le père-fondateur de l'immunologie comparative et de l'immunologie « naturelle », un système de défense désormais popularisé sous le nom d'immunité innée. Remarquablement avant-gardiste, Metchnikov anticipa plusieurs aspects de l'immunobiologie moderne en valorisant la nécessité d'une approche comparative comme le démontrent ses lectures sur la comparaison des pathologies inflammatoires (Metchnikov, 1954; Tauber & Chernyak, 1989).

C'est en implantant des épines de roses sur des larves d'étoiles de mer que Metchnikov observa pour la première fois la migration et l'agglomération au site de la lésion d'un nouveau type cellulaire similaire aux amibes : les phagocytes. Inspiré par ses premières recherches scientifiques portant sur la digestion intracellulaire chez les invertébrés, Metchnikov établit rapidement une relation directe entre l'internalisation de microorganismes par les phagocytes et leur digestion ou persistance intracellulaire à l'intérieur de vacuoles. Fortement influencé par Darwin et sa théorie révolutionnaire sur l'évolution des espèces, il extrapola ses résultats à l'homme et développa la notion de « macrophages » : cellules myéloïde qui détruisent les corps étrangers ayant pénétré dans l'organisme, et, par le fait même, saisit l'importance de ces cellules dans la défense immunitaire (Desowitz, 1987; Tauber & Chernyak, 1989). Cette nouvelle défense immunitaire dite « cellulaire » fut cependant fortement critiquée par la découverte parallèle d'un second type de défense immunitaire nommée « humorale » montée par les anticorps (préalablement surnommés « ambocepteurs ») et le complément (préalablement appelé « alexine »). D'ardents débats entre ces deux écoles de pensées de l'immunologie, menées par Metchnikov (« cellulariste ») et l'allemand Paul Ehrlich (« humoraliste »), ont eu lieu mais furent conclus par un dénouement particulier lorsque Metchnikov et Ehrlich partagèrent en 1908 le prix Nobel de Médecine (Gordon, 2008; Tauber & Chernyak, 1989). La popularité croissante de l'immunité humorale laissa toutefois dans l'ombre l'immunité innée, mais la découverte quelques années plus tard de la

complémentarité de ces deux types de défenses dans la mise en place de la réponse immunitaire des mammifères a relevé toute l'importance de l'immunologie cellulaire dans les processus immuns.

2. La phagocytose et la biogénèse du phagolysosome

La phagocytose est un processus cellulaire permettant l'internalisation de larges particules menant à la séquestration et, éventuellement, à la digestion de ces particules dans une vacuole intracellulaire nommée phagosome. Ce mécanisme d'internalisation est initialisé suite à la reconnaissance et la liaison, par des récepteurs extracellulaires, de ligands moléculaires de surface. Par cette reconnaissance, le phagocyte enclenche, via l'activation de voies de signalisation, une panoplie de processus cellulaires clés tels que le réarrangement du cytosquelette d'actine, le trafic membranaire, l'activation de mécanismes microbicides, la production de protéines essentielles à la présentation antigénique, ainsi que la synthèse de cytokines et de chémokines anti-inflammatoires (voir **Figure 1**).

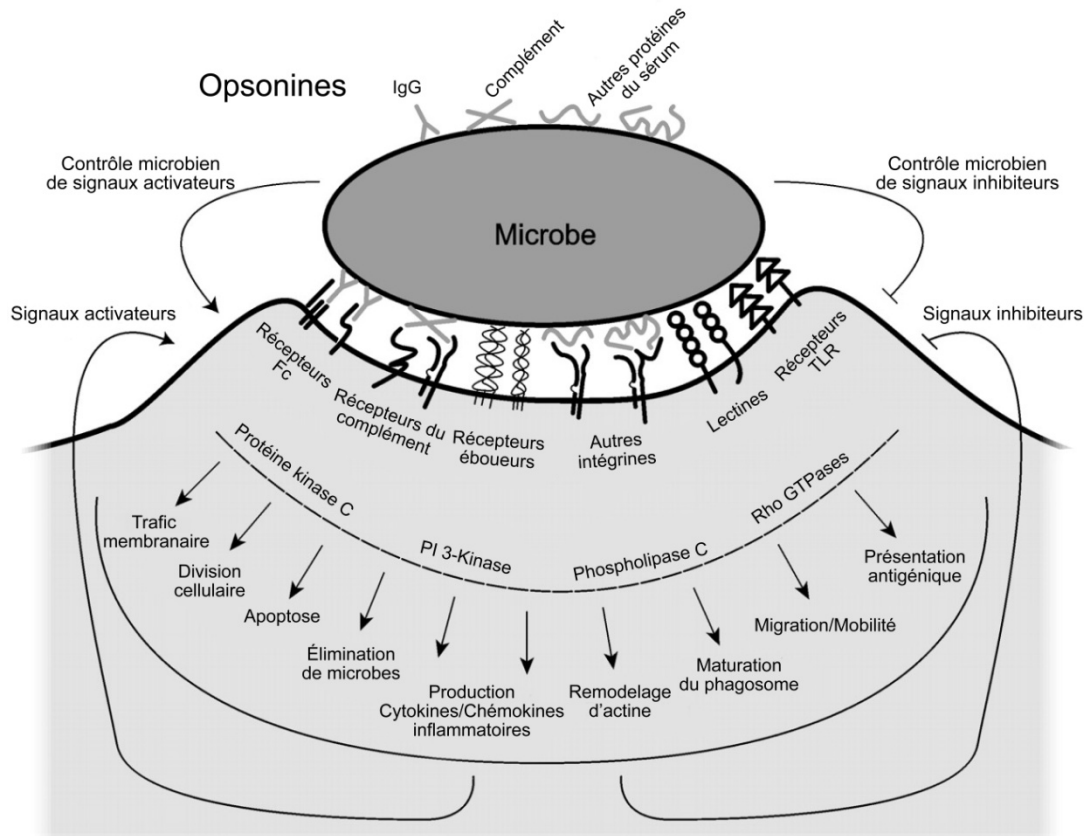


Figure 1. Modèle moderne des récepteurs et voies de signalisation impliqués lors de la phagocytose de microorganismes.

De multiples récepteurs reconnaissent des microbes par liaison directe ou par liaison à l'aide d'opsonines à la surface microbienne. L'engagement du récepteur avec son ligand induit des signaux intracellulaires et ces signaux peuvent subséquemment activer ou inhiber le taux de phagocytose de la cellule ou induire des réponses antimicrobiennes. Certains pathogènes peuvent activement réguler la réponse du phagocyte. TLR, Toll-like receptor; IgG, Immunoglobuline de type G. Image adaptée de (Underhill & Ozinsky, 2002).

La liaison récepteur-ligand induit la polymérisation d'actine permettant un mouvement membranaire rétrograde essentiel à l'internalisation des particules reconnues (Swanson, 2008). Une fois formé, le phagosome se débarrasse, par une dépolymérisation rapide, de son cytosquelette d'actine ainsi que des protéines qui y sont associées. C'est alors que le phagosome naissant devient libre d'entreprendre, en traversant la voie endo-lysosomale, les fissions et fusions vésiculaires nécessaires à sa maturation en phagolysosome, par un processus connu sous le nom de « kiss and run » (voir Figure 2) (Desjardins *et al*, 1994b; Vieira *et al*, 2002). Encore incapable

de dégrader les particules internalisées, le néo-phagosome acquiert progressivement les outils microbicides et hydrolytiques nécessaires à la dégradation et à l'élimination des particules internalisées. Différentes armes, telles que des enzymes hydrolytiques, des peptides cationiques, la NADPH oxydase et un milieu hautement acide sont alors mobilisées vers le phagosome afin de digérer la majorité des macromolécules biologiques des particules internalisées (Steinberg *et al*, 2007). Essentiel à sa maturation, le processus d'acidification du phagosome est engendré par la pompe à protons V-ATPase (ATPase de type vacuolaire), un complexe enzymatique multimérique qui s'associe à la membrane du néo-phagosome et qui importe activement, par l'hydrolyse d'ATP, des protons vers le lumen du phagosome (Beyenbach & Wiczorek, 2006). En plus d'affecter directement la croissance microbienne, l'acidification du phagosome rehausse l'efficacité des autres composés microbicides. Diverses enzymes hydrolytiques sont sensibles aux pH luminal du phagosome et la majorité d'entre elles possède une activité protéolytique optimale variant d'un pH acide de 5.5 à 6.5 (Claus *et al*, 1998; Lennon-Dumenil *et al*, 2002).

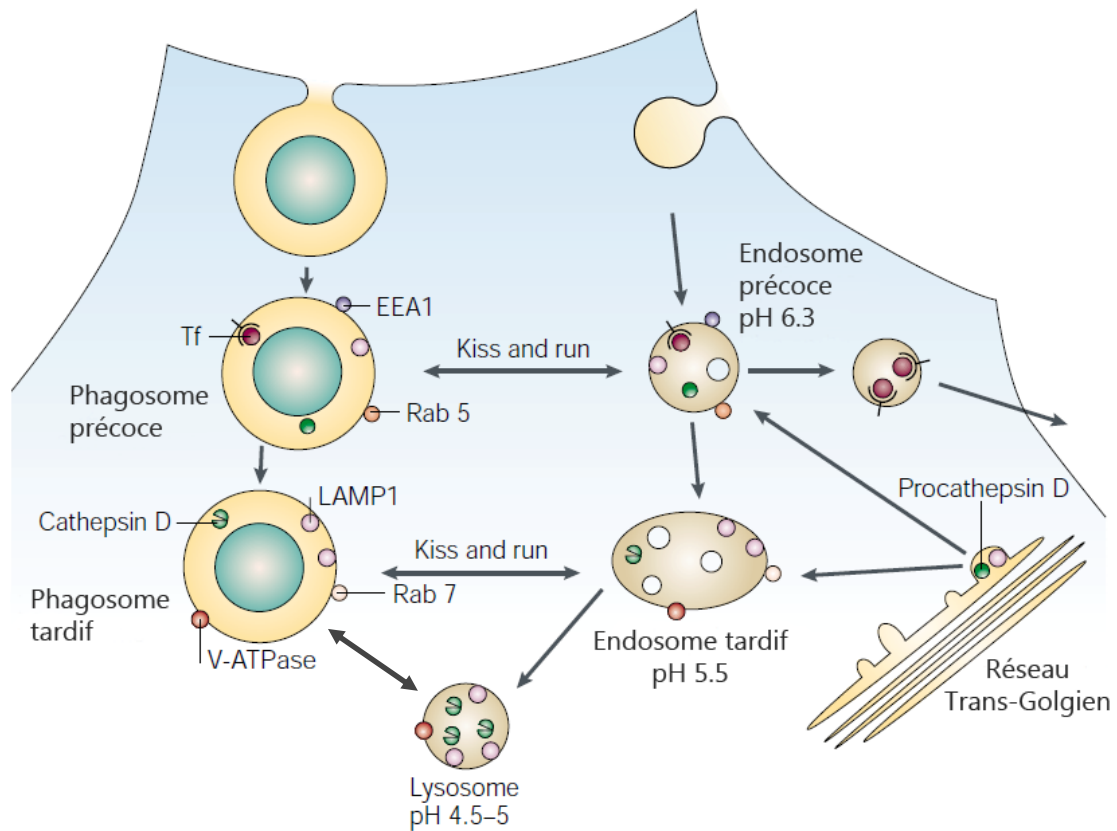


Figure 2. Le processus de maturation du phagosome.

La biogénèse du phagosome est un processus de maturation, où le cargo demeure fixe, tandis que la vacuole est remodelée par des événements de fusion et fission nommés « Kiss and run » (Duclos et al, 2000). Lors de cette maturation, les phagosomes interagissent de façon transitoire avec le réseau des endosomes. Suivant l'internalisation, le phagosome montre un accès transitoire à la voie de recyclage, tel que l'atteste la présence de la protéine transferrin (tf) qui marque cette voie. Pendant ce stade initial, le phagosome présente des marqueurs d'endosomes précoces tels que EEA1 et Rab5. Par la suite, le phagosome acquiert rapidement des protéines associées aux endosomes tardifs comme Rab7 et LAMP1. Les pro-formes d'hydrolases de lysosomes, telles que la procathepsine D apparaissent aussi dans ces phagosomes précoces. La maturation de la cathepsine D semble coïncider avec l'augmentation rapide en pompes à protons V-ATPase et avec une chute drastique du pH luminal du phagosome. Image adaptée de (Russell, 2001).

La maturation du phagosome vers sa forme finale de phagolysosome dégradatif est un processus soigneusement organisé. Elle implique de nombreuses fusions séquentielles, par l'entremise d'une variété de SNARE, à travers la voie endo-

lysosomale, où le phagosome nouvellement formé se transforme en phagosome précoce, puis tardif pour finalement devenir phagolysosome en fusionnant avec les lysosomes (**voir Figure 2**). Cette progression est finement régulée, en partie, par les phosphoinositides de la membrane et les Rab de la famille des GTPases spécifiquement assignés à leur compartiment endosomal respectif (Zerial & McBride, 2001). La fusion entre phagosomes et endosomes précoces est stimulée par la petite GTPase Rab5 (Duclos *et al*, 2003). De ce fait, Rab5 s'avère être un excellent marqueur des phagosomes précoces. En recrutant la PI 3-kinase (VPS34) pour la synthèse de PI 3-phosphate (PI(3)P) au niveau membranaire, Rab5 permet de mobiliser, avec le PI(3)P, la protéine EEA1 (Early Endosomal Antigen 1) qui intervient dans la fusion vésiculaire (Gaulhier *et al*, 2000). Au cours de leur progression vers l'état de phagolysosome, les phagosomes acquièrent progressivement les marqueurs des lysosomes et des endosomes tardifs tels que Rab7, LAMP1 et LAMP2, tout en perdant les marqueurs précoces comme Rab5 (Desjardins *et al*, 1994b; Rink *et al*, 2005). Rab7 est un régulateur important du transport membranaire entre les endosomes précoces et tardifs, en plus d'être impliqué dans la biogénèse des lysosomes (Bucci *et al*, 2000; Vitelli *et al*, 1997). Bien que leur fonction précise ne soit encore élucidée, les marqueurs lysosomaux, LAMP1 et LAMP2 (Lysosomal-Associated Membrane Protein 1/2) semblent être aussi impliqués dans le processus de maturation du phagosome, puisqu'en leur absence, la maturation du phagosome s'arrête avant l'acquisition du marqueur Rab7 (Huynh *et al*, 2007).

3. L'évolution de la phagocytose

Le développement du système immunitaire est le résultat de la transformation progressive des fonctions basales impliquées dans la survie des organismes ancestraux dans leur environnement hostile. Avant même le développement du premier mécanisme immunitaire, il fut essentiel pour les ancêtres des eucaryotes de développer un mécanisme pouvant distinguer leur corps des membres de leur propre espèce et de ceux des prédateurs et des parasites. L'innovation du premier mécanisme de reconnaissance du soi et du non-soi nécessita la création de senseurs chimiques et de voies de signalisation suffisamment spécifiques pour discriminer avec efficacité les ennemis des partenaires (Dzik, 2010). Sans ce mécanisme, aucun eucaryote sexué n'aurait survécu, puisque l'habileté de distinguer le soi du non-soi est non seulement cruciale à la reconnaissance de la compatibilité sexuelle, mais limite aussi le cannibalisme.

Ce système de reconnaissance est d'ailleurs inhérent à la défense immunitaire, où le rôle primaire du système immunitaire consiste à discerner avec rapidité les antigènes du « soi » des pathogènes invasifs (« non-soi »). Les molécules solubles et membranaires de l'hôte interagissent avec ces pathogènes et stimulent une réaction immunitaire appropriée envers l'élément reconnu. Étant donné la forte propension des pathogènes à muter, il existe une dynamique évolutive au niveau des interactions hôte-pathogène qui impose un rythme permanent d'adaptation et de contre-adaptation sélectives au niveau des molécules de surface des deux espèces compétitrices. À travers cette guerre biologique, les phagocytes professionnels ont développé un éventail de récepteurs phagocytaires, nommés PRR (« Pathogen Recognition Receptors »), capables de reconnaître des motifs moléculaires uniques et communs aux pathogènes que l'on nomme PAMPs (« Pathogen Associated Molecular Patterns »). Puisqu'ils possèdent des rôles essentiels dans la biologie des agents infectieux, ces PAMPs sont sujets à un taux mutationnel faible et de ce fait, s'avèrent des cibles de choix qui sont notamment exploitées par le système immunitaire inné des métazoaires (Janeway, 1992). Ces motifs incluent entre autres : les mannanes de la paroi des levures, les peptides formylés des bactéries, le LPS (lipopolysaccharides)

des bactéries à Gram négatif et le LTA (acide lipotéichoïque) de la membrane des bactéries à Gram positif.

Bien que la phagocytose soit évolutivement conservée et, de ce fait, fortement utilisée par une vaste diversité d'organismes allant des amibes à l'humain, il s'avère que ce processus a sans contredit été modifié depuis plus de 1,2 milliards d'années. Chez les organismes unicellulaires tels que la paramécie et l'amibe, la phagocytose est employée à des fins nutritives (un mode d'alimentation connu sous le nom de phagotrophie). Les phagosomes formés chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* tuent et dégradent les bactéries ingérées, afin de générer les blocs nutritifs nécessaires à la croissance de l'amibe (voir **Figure 3a**) (Gotthardt *et al.*, 2006). Ce processus s'avère un système digestif très efficace à partir duquel le phagosome aurait développé, suite à un remodelage protéomique complexe, de nouvelles habiletés fonctionnelles nécessaires au remodelage tissulaire, à la coordination de l'immunité innée et acquise, et à l'élimination de cellules apoptotiques (Desjardins *et al.*, 2005).

Ce raffinement mécanistique de la phagocytose est d'ailleurs observé chez la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* par la présence de phagocytes professionnels (hémocytes) qui patrouillent l'hémolymphe prêts à ingérer et détruire les pathogènes infectieux. Dépourvue d'un système immunitaire acquis, la mouche à fruit élicite néanmoins une réponse immunitaire innée soutenue et suffisante envers une large gamme de pathogènes (voir **Figure 3b**). En effet, la reconnaissance de pathogènes par les phagocytes induit la synthèse et la sécrétion de plus de 20 peptides antimicrobiens. Ces peptides antimicrobiens qui constituent la réponse immunitaire humorale de la mouche à fruit permettent d'attaquer avec une spécificité partielle les bactéries à Gram négatif (Diptericine, Drosocine et Attacine), les bactéries à Gram positif (Defensine) et les fungi (Drosomycine et Metchnikowin) (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

Chez les vertébrés à mâchoire (gnathostomes), on note l'apparition des complexes majeurs d'histocompatibilités (CMH de classe I et II) et parallèlement, la spécialisation de la phagocytose au niveau de ses processus moléculaires impliqués dans la dégradation des pathogènes internalisés (hydrolases, NADPH oxydase,

immunoprotéasome et voies de signalisation). Cette optimisation du phagosome, couplée à l'innovation de mécanismes nécessaires à la présentation antigénique (TAP1-2, Tapasin, ERp57, B7-1 et ICAM-1), permet de contrôler avec finesse la dégradation des pathogènes et de générer des peptides antigéniques qui seront présentés en surface couplés aux CMH de classe I et II (voir **Figure 3c**) (Kasahara *et al.*, 2004). Chez les vertébrés à mâchoire, la transformation des mécanismes moléculaires du phagosome place cette organelle au centre du système immunitaire, reliant l'immunité innée et l'immunité acquise.

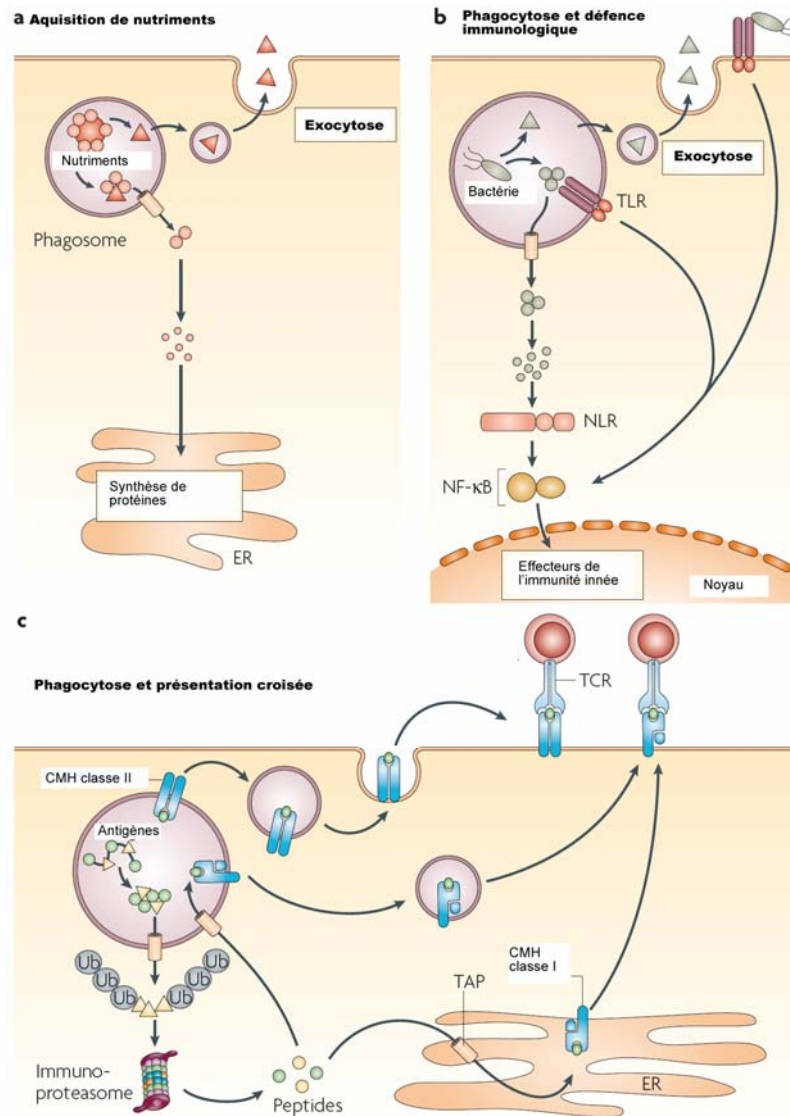


Figure 3. L'évolution du mécanisme de la phagocytose.

a) Chez les unicellulaires la phagocytose est utilisée à des fins nutritives. Les bactéries internalisées sont dégradées à l'aide d'enzymes et les nutriments générés sont exportés vers le cytoplasme et utilisés pour la croissance cellulaire. b) Chez les organismes multicellulaires, la phagocytose joue un rôle clé dans l'immunité innée. Les phagocytes professionnels reconnaissent, tuent et dégradent les pathogènes infectieux. Lors de la défense immunitaire, l'hôte peut détecter à l'aide de récepteurs PRR (« Pattern-Recognition Receptors ») les produits de dégradation dans le lumen du phagosome ou dans le cytoplasme (NLR) et induire la production et la sécrétion d'effecteurs tels que des peptides antimicrobiens. c) Chez les vertébrés à mâchoire, la phagocytose est essentielle à la présentation antigénique et à l'immunité acquise. La dégradation des bactéries phagocytées génère des peptides antigéniques qui sont présentés en surface par voie classique (exogène) sur les CMH de classe II ou par la voie non-classique (endogène) via la présentation croisée sur les CMH de class I. Image adaptée de (Stuart & Ezekowitz, 2008).

3.1 L'origine de la phagocytose et l'eucaryogenèse

La transition évolutive des procaryotes aux eucaryotes (eucaryogenèse) fut sans contredit la plus grande transition cellulaire depuis le début de la vie sur terre. Théoriquement, il est reconnu que cette transition se serait effectuée par l'internalisation et l'acquisition d'une bactérie endosymbiote sous la forme de proto-mitochondrie (Cavalier-Smith, 2002; De Duve, 1969; Margulis, 1970). D'ailleurs, l'ancestralité de la phagotrophie est notamment renforcée par la vaste distribution de la phagocytose chez les eucaryotes (Simpson & Roger, 2004). L'innovation de la phagocytose chez l'ancêtre commun des eucaryotes s'est donc avérée un aspect central lors de l'eucaryogenèse, puisqu'elle aurait procuré, par la prédation et la digestion intracellulaire de bactéries, un avantage énergétique et évolutif immense.

L'ultra-structure rigide de la paroi cellulaire bactérienne nous indique que l'ancêtre le plus primitif des eucaryotes aurait tout d'abord aboli sa paroi cellulaire (nommée « néomuran » par Cavalier-Smith), afin de procurer, à partir de la membrane plasmique conséquemment exposée au milieu extracellulaire, la fluidité membranaire nécessaire au processus de la phagocytose (Cavalier-Smith, 1975; Cavalier-Smith, 2009). Bien qu'une telle perte de la paroi cellulaire eût conféré un avantage majeur par une résistance complète des néomurans aux antibiotiques membranaires, il n'en demeure pas moins que ce protoplaste n'aurait pu survivre en condition naturelle du fait de son extrême fragilité membranaire. Toutefois, il fut proposé que ce protoplaste aurait subsisté au cœur d'un biofilm bactérien, protégé des chocs chimiosmotiques et mécaniques environnants, tout en développant un cytosquelette de base à partir du système filamentaire des procaryotes, afin de stabiliser la tension membranaire nécessaire au trafic vésiculaire et à la phagocytose. Cependant, il est connu que la phagocytose diminue l'aire de la membrane plasmique et qu'elle n'aurait pu évoluer sans un mécanisme de compensation membranaire intracellulaire tel que l'exocytose vésiculaire et le recrutement du réticulum endoplasmique (Bajno *et al*, 2000; Gagnon *et al*, 2002). De ce fait, l'analyse phylogénétique des petites GTPases démontre que la fonction primaire du système endomembranaire élémentaire était de nature sécrétrice plutôt que phagocytaire

(Jekely, 2003). Précédant l'innovation de la phagocytose, le protoeucaryote, blotti dans un biofilm bactérien, aurait saisi l'immense opportunité énergétique de la colonie en sécrétant des enzymes digestives capables de digérer spécifiquement les parois cellulaires, lysant les cellules avoisinantes et important les nutriments libérés sans toutefois s'auto-digérer (Cavalier-Smith, 2009; Jekely, 2007). La transition de cette digestion extracellulaire vers une digestion intracellulaire par phagocytose aurait maximisé l'assimilation des nutriments digérés et engendré un avantage énergétique considérable.

Les eucaryotes auraient émergé d'un tricheur bénéficiaire des ressources d'un biofilm bactérien, lui permettant de stabiliser sa membrane plasmique par l'évolution d'un cytosquelette rudimentaire et d'un système endomembranaire primitif (Cavalier-Smith, 2002; Jekely, 2007). Ce tricheur qui lysait par exocytose les parois cellulaires des bactéries avoisinantes de la colonie aurait perfectionné sa digestion extracellulaire vers une digestion intracellulaire par l'innovation de la phagocytose, devenant ainsi le premier organisme phagotrophe.

4. La phagocytose chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* : la phagotrophie

Vivant au niveau des sols humides forestiers, l'unicellulaire *Dictyostelium discoideum* est l'exemple type du phagotrophe professionnel se nourrissant par phagocytose de bactéries. La phylogénie moléculaire indique que ce groupe d'amoebozoaires aurait divergé au sein des protozoaires avant l'émergence des métazoaires et des fungi il y a plus de 1.2 milliards d'années (voir **figure 4**) (Bhattacharya, 2009). Malgré cette divergence évolutive, plusieurs protéines de l'amibe *Dictyostelium* partagent une forte similarité avec leurs orthologues humains (Eichinger *et al*, 2005). La similarité génomique qui réside entre les amibes et les métazoaires est entre autres remarquée par une conservation fonctionnelle au niveau du processus de la phagocytose. Utilisé conjointement par les macrophages et les unicellulaires amiboïdes, ce processus est toutefois exploité à des fins distinctes. Le macrophage utilise la phagocytose dans un contexte de défense immunitaire, tandis que l'amibe l'utilise à une fin nutritive.

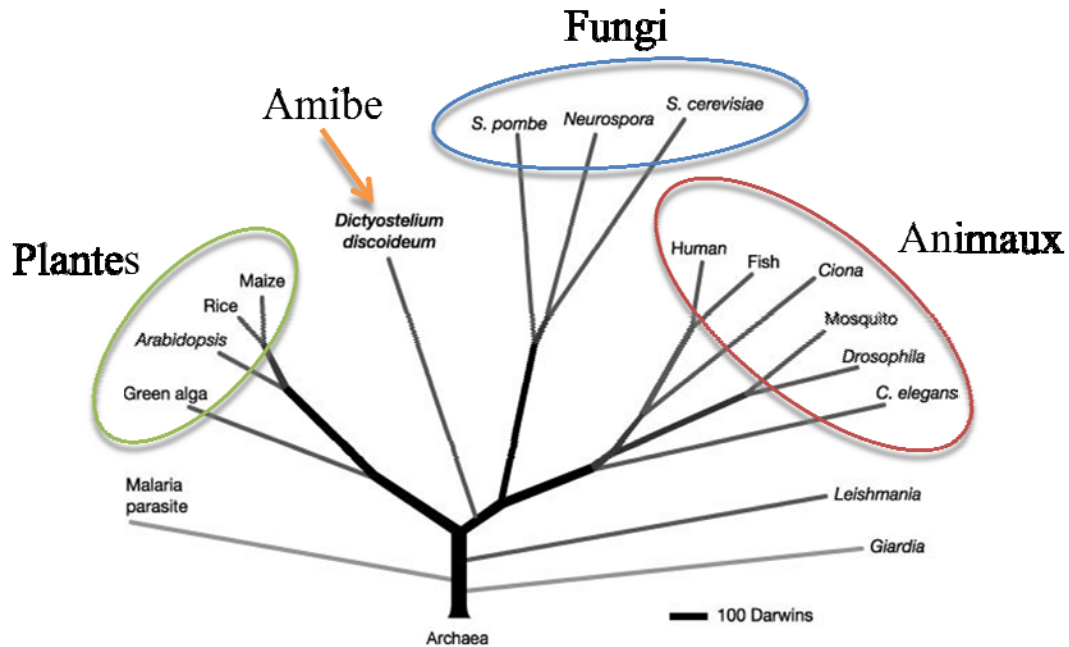


Figure 4. Arbre phylogénétique des eucaryotes.

L'arbre phylogénétique des eucaryotes démontre la divergence de l'amibe *Dictyostelium* le long de la branche menant aux métazoaires peu après la divergence entre les plantes et les animaux. Image adaptée de (Eichinger *et al*, 2005).

Visuellement, la locomotion cellulaire de *Dictyostelium* ressemble à la diapédèse des macrophages, où l'amibe rampe à l'aide de lobopodes sur les substrats de son environnement. Malgré la distance évolutive qui sépare les amibes des animaux, ces organismes présentent néanmoins des mécanismes qui permettent la reconnaissance, l'internalisation et la destruction de particules étrangères. Tel qu'observé chez les phagocytes professionnels stimulés par leurs récepteurs Fc, la phagocytose chez *Dictyostelium* s'effectue par « fermeture éclair ». Au point de vue moléculaire, l'actine filamenteuse demeure un joueur clé lors de la formation de la coupe phagocytaire. Ainsi, la polymérisation d'actine et les membres de la famille WASP qui régulent le cytosquelette d'actine sont tous aussi importants lors du processus d'internalisation de la phagocytose (Lorenzi *et al*, 2000; May *et al*, 2000), de même pour les membres des familles Rho (RhoA, Rac1 et Cdc42) et Ras (Rap1 chez *Dictyostelium*) qui semblent universellement essentiels à la régulation de la phagocytose (Caron & Hall, 1998; Caron *et al*, 2000; Cox *et al*, 1997; Massol *et al*,

1998). Par ailleurs, les concentrations intracellulaires localisées de calcium (Ca^{2+}) nécessaires à l'internalisation ainsi qu'à la maturation du phagosome chez les phagocytes mammaliens demeurent requises chez *Dictyostelium* (Fajardo *et al*, 2004; Melendez & Tay, 2008). Enfin, lors de la biogénèse du phagosome on note une utilisation analogue des sources membranaires intracellulaires telles que le recrutement du réticulum endoplasmique (RE) et de l'exocytose localisée de vésicules régulée par les GTPases Arf et Rab (Bajno *et al*, 2000; Cox *et al*, 2000; Gagnon *et al*, 2002; Muller-Taubenberger *et al*, 2001).

Malgré ces ressemblances, il n'en demeure pas moins que l'efficacité d'internalisation de l'amibe surpasse largement les capacités phagocytiques des phagocytes professionnels. Il s'écoule 60 secondes entre l'initiation de la polymérisation et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine sous la coupe phagocytaire chez l'amibe (Maniak *et al*, 1995). Par ailleurs, *Dictyostelium* peut ingérer, tuer et digérer à un taux impressionnant de 300 bactéries à l'heure (Bozzaro *et al*, 2008). En restriction nutritive toutefois, les amibes freinent leur prolifération cellulaire et entrent en phase sociale où elles se regroupent par étapes en agrégats multicellulaires afin de finaliser un corps « fructifié » constitué d'une fine tige arborant à la cime une sphère de spores résistantes. Sous la forme intermédiaire de « limace » (avant la culmination en corps fructifié), la différenciation cellulaire de certaines cellules agrégées au sein de la limace (1%) engendre un nouveau type cellulaire, les cellules sentinelles, qui patrouillent l'agrégat multicellulaire dans le but de détoxifier et combattre les pathogènes (Chen *et al*, 2007). Remarquablement, ces cellules sentinelles semblent se comporter en tant que neutrophiles ou macrophages de vertébrés, suggérant une certaine forme primitive d'immunité innée retrouvée qu'à partir des organismes pluricellulaires.

4.1 Les récepteurs phagocytiques de l'amibe *Dictyostelium discoideum*

La recherche de récepteurs phagocytaires chez *Dictyostelium* s'est avérée peu concluante pendant de nombreuses années jusqu'à la découverte récente des récepteurs transmembranaires Phg1, SadA et SibA-E (Cornillon *et al*, 2006; Cornillon *et al*, 2000; Fey *et al*, 2002). D'un point de vue évolutif, il fut intéressant de constater que la stimulation extracellulaire du récepteur SibA engendre un mécanisme d'interactions moléculaires similaire à la phagocytose intégrine-dépendante des mammifères (tel que la phagocytose via le récepteur CR3). Cette similitude s'expliquerait par la structure de SibA qui possède des caractéristiques semblables aux chaînes β des intégrines, notamment du côté cytoplasmique où SibA interagit avec le complexe Talin-Myosin VII (doté d'un domaine FERM), essentiel aux processus d'adhésion et d'internalisation de la phagocytose (Niewohner *et al*, 1997; Tuxworth *et al*, 2005; Tuxworth *et al*, 2001).

L'étude récente des variations transcriptionnelles de *Dictyostelium* en mode de phagocytose a permis d'identifier un nouvel ensemble de récepteurs candidats tels qu'une protéine membranaire liant les hydrates de carbones (DDB0192108) surexprimée 8 fois plus que le contrôle, la protéine gp138-similar (DDB0217521) (Aiba *et al*, 1997), la protéine RTA1 à sept domaines transmembranaires (DDB0168536), la protéine putative tirC à domaine TIR-like (DDB0189226), la protéine bys1 (DDB0187994) et la protéine Tetraspanin C (DDB0216720) (Sillo *et al*, 2008). Ces protéines sont des candidates potentielles pouvant lier des bactéries, induire un signal intracellulaire et réguler l'internalisation des bactéries reconnues. D'ailleurs, les récepteurs liant les hydrates de carbones ont depuis longtemps été considérés comme des récepteurs potentiels de la phagocytose (Bozzaro & Roseman, 1983; Vogel *et al*, 1980). Les Tetraspanins quant à elles sont des blocs structurels majeurs provenant d'une classe spécialisée de microdomaines membranaires qui régulent le regroupement et la signalisation lors de l'adhésion cellulaire. Elles agissent plus précisément au niveau des récepteurs membranaires et de certains effecteurs (Yanez-Mo *et al*, 2009). Leur rôle chez *Dictyostelium* est présentement

inconnu, mais de récentes évidences chez les mammifères ont démontré leur implication dans le processus précoce de la phagocytose (Artavanis-Tsakonas *et al*, 2006; Chang & Finnemann, 2007). Les protéines TIR-like, tels que les récepteurs Toll et Toll-like, sont des régulateurs majeurs de la réponse immunitaire et de la phagocytose et chez les animaux (McCoy & O'Neill, 2008). Cependant, aucun récepteur Toll-like n'a été identifié chez *Dictyostelium* à ce jour, mais on y retrouve au moins deux gènes possédant un domaine TIR-like, soit *tirC* et *tirA*. Fait intéressant, *tirA* serait impliquée dans la réponse immune des cellules sentinelles lorsque l'amibe entre en phase sociale multicellulaire sous forme de « limace » (Chen *et al*, 2007). Enfin, d'autres gènes essentiels au processus d'adhésion, nommés 9TM (9 domaines transmembranaires), ont été identifiés chez *Dictyostelium* sans toutefois avoir été étudiés chez les mammifères malgré la présence d'homologues chez l'homme, la souris et la drosophile (Cornillon *et al*, 2000). L'étude de ces gènes 9TM pourrait permettre la découverte subséquente de nouvelles voies phagocytiques potentiellement analogues, mais encore inconnues chez les vertébrés.

4.2 L'internalisation lors de la phagocytose chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*

L'importance du cytosquelette d'actine, lors du processus d'internalisation de la phagocytose, s'avère tout aussi essentiel chez l'amibe. Des études ont révélé la présence et l'accumulation d'actine sous la coupe phagocytaire chez *Dictyostelium* (Pang *et al*, 1998). De plus, la polymérisation d'actine filamenteuse nécessaire à l'ingestion de particules et à la projection de pseudopodes est abolie par la présence des drogues latrunculin et cytochalasin qui interfèrent avec la formation d'actine filamenteuse (Hacker *et al*, 1997; Maniak *et al*, 1995). À partir des données obtenues chez les modèles vertébrés, on retrouve aussi au sein du génome de *Dictyostelium* une plénitude de protéines impliquées dans le processus dynamique du réseau d'actine telles que : le complexe Arp2/3 et Formin impliquées dans la nucléation de l'actine, les régulateurs de polymérisation Scar/Wave, WASp et ENA-VASP, les

ancres membranaires Talin, Comitin, Ponticulin et Hisactophilin, les stabilisateurs Fimbrin, ABP-120, α -Actinin, les moteurs moléculaires Myosin I et VII, les chaperonnes des sous-unités d'actine Cofilin, Profilin et CAP, ainsi que les fragmenteurs et capsuleurs Severin et DAip1. Ces protéines homologues ont d'ailleurs fait l'objet de plusieurs études, afin de démontrer leur nécessité dans le processus d'internalisation chez *Dictyostelium*.

4.3 La maturation du phagosome chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*

Le processus de maturation du phagosome à travers la voie endo-lysosomale, largement caractérisée chez les vertébrés, fut aussi défini chez l'amibe par des expériences de « pulse – chase » à l'aide de bactéries et de billes de latex, permettant ainsi d'isoler des phagosomes de *Dictyostelium* à différents temps de maturation et de les caractériser par protéomique (Bogdanovic *et al*, 2002; Gotthardt *et al*, 2002; Rezabek *et al*, 1997). Ces études ont confirmé le recrutement précoce de V-ATPase H^+ au phagosome suite à la dépolymérisation du réseau d'actine et de l'acquisition des régulateurs de fusion vésiculaire tels que Rab7, les SNAREs Vti1, Syntaxin 7, ainsi que Syntaxin 8 et le marqueur lysosomal LmpB. Entre 3 à 15 minutes post-internalisation, survient une seconde étape de maturation du phagosome qui se caractérise par le recrutement d'enzymes lysosomales telles que la Cathepsin D et la protéinase à cystéines CP-p34, des marqueurs membranaires lysosomaux CD36, LmpA et LmpC (membres de la famille LIMP) et de la SNARE Vamp7. L'acquisition des glycosidases lysosomales α -mannosidase et β -glucosidase est légèrement retardée, tandis que le marqueur tardif post-lysosomal Vacuolin B est acquis entre 60 à 90 minutes post-internalisation (Rauchenberger *et al*, 1997).

Bien qu'il existe une homologie réelle au niveau mécanistique de la phagocytose entre l'amibe et les vertébrés, certaines différences ont toutefois été décelées chez *Dictyostelium*. À l'inverse des phagocytes professionnels des vertébrés, l'acidification du phagosome des amibes est transitoire. Une à deux

minutes après la dépolymérisation du réseau d'actine, il est déjà possible d'observer des événements de fusion entre le néo-phagosome et des vésicules acides. Par conséquent, l'acidité du phagosome atteint un pH de 5.0 après 5 minutes d'internalisation. Toutefois, entre 10 et 60 minutes post-internalisation, le pH augmente à 6.0 et s'alcalinise davantage après 1 heure de maturation. Cette neutralisation du pH s'expliquerait par le retrait des complexes de V-ATPase vacuolaires, principaux responsables de l'acidification et de l'effet neutralisant engendré par la dégradation des particules internalisées (Aubry *et al*, 1993; Clarke *et al*, 2002). C'est le cas aussi du « burst » oxydatif engendré par le complexe transmembranaire NADPH oxydase au niveau des phagosomes des mammifères, mais qui est absent chez *Dictyostelium*. Remarquablement, trois isoformes noxA, noxB et noxC de la grosse sous-unité du complexe NADPH oxydase, ainsi que l'isoforme p22^{phox} de la petite sous-unité sont encodés chez *Dictyostelium*, mais absents des phagosomes. Le double knockout noxA⁻/noxB⁻ n'affecte pas la phagocytose ni la macropinocytose, d'autant plus qu'aucune évidence n'a démontré la production de radicaux superoxydés chez *Dictyostelium in vivo* et *in vitro* (Lardy *et al*, 2005).

5. La multicellularité et l'immunité innée

L'évolution de la multicellularité fut sans contredit une des plus profondes transitions développementales de l'histoire de la vie sur terre. Selon leur environnement immédiat, les unicellulaires font preuve d'une certaine capacité de différenciation. L'adaptation environnementale des unicellulaires se fait successivement, une étape à la fois, et par conséquent, nécessite beaucoup plus de temps. À l'opposé, les organismes multicellulaires s'adaptent aux variations environnementales en répartissant simultanément certaines tâches entre différentes cellules spécialisées et de ce fait, diminuent le temps d'adaptation. Puisque ces cellules spécialisées effectuent un nombre limité de tâches, il est possible d'observer une optimisation de nombreux processus cellulaires et surpassent les unicellulaires pour la même tâche (Michod, 2007; Rokas, 2008). Cette division du travail est notamment remarquée lors de l'infection chez les organismes pluricellulaires par la mobilisation d'hémocytes libres spécialisés dans l'élimination, par phagocytose, de pathogènes envahissants (Hartenstein, 2006). De ce fait, la transition fonctionnelle de la phagocytose, allant d'un rôle nutritif chez les unicellulaires à un rôle défensif chez les multicellulaires, proviendrait d'une telle spécialisation cellulaire.

Il semblerait que la transition fonctionnelle d'un rôle nutritif à un rôle défensif de la phagocytose ait grandement contribué à l'émergence du système immunitaire inné, puisque la phagocytose s'avère une réaction défensive de premier plan lors de la réponse immunitaire innée. La présence de macrophages au niveau des fluides des animaux multicellulaires les plus basaux tels que les éponges (métazoaires) nous indique que l'ancêtre des phagocytes serait originaire de l'ère pré-cambrienne (il y a plus de 540 à 500 millions d'années). De ce fait, le macrophage s'avère le type cellulaire le plus ancien et le plus universel du système immunitaire (Ohno, 1996). Plusieurs études phylogénétiques ont démontré chez les vertébrés et les métazoaires la forte conservation de nombreuses molécules effectrices inhérentes à l'immunité innée de type humoral telles que le lysozyme, les peptides antimicrobiens et le complément C3. Ces indications témoignent de l'ancestralité et de la dimension

universelle de l'immunité innée chez les animaux multicellulaires (Al-Sharif *et al*, 1998; Hughes, 1998; Thomma *et al*, 2002).

6. La phagocytose chez la drosophile

À travers les années de recherches scientifiques, la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* s'est avérée un excellent modèle dans l'étude de l'immunité, puisqu'elle possède un système immunitaire simple et des voies de signalisation conservées (Evans *et al*, 2003). Dépourvue d'immunité acquise, le système immunitaire inné de la drosophile peut ériger une réponse généralisée, rapide et suffisante envers un vaste éventail de pathogènes. Cette réponse combine l'utilisation de barrières physiques et de réactions immunitaires locales ou systémique également retrouvées chez les vertébrés, tout en impliquant des composants humoraux et cellulaires. Trois niveaux de défense majeurs ont été rapportés chez la drosophile jusqu'à ce jour. 1) les épithéliums du tractus alimentaire, de la trachée et sous-cuticulaire, servent à la fois de barrières physiques et de défense locale, en sécrétant un mélange de molécules microbicides, de peptides antimicrobiens et de réactifs oxygénés (ROS). 2) le corps gras (« fat body » un organe analogue au foie) génère une réponse humorale systémique en sécrétant des peptides antimicrobiens (Lemaitre & Hoffmann, 2007). 3) Finalement, la réponse cellulaire engendre le recrutement d'hémocytes qui phagocytent et encapsulent les intrus rencontrés au niveau de l'hémolymphe. À elles seules, les larves de la mouche à fruit contiennent plusieurs milliers d'hémocytes pouvant être divisés selon leurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles en trois types cellulaires : les plasmatoctes, les cellules cristallines et les lamellocytes. Les lamellocytes sont des cellules relativement larges, plates et adhérentes qui participent à l'encapsulation et la neutralisation des objets trop larges pour être phagocytés. Non-phagocytaires, les cellules cristallines constituent 5% des hémocytes de larves et participent au processus de mélanisation. Les plasmatoctes quant à elles représentent 90 à 95% de tous les hémocytes des larves matures et éliminent par phagocytose les cellules apoptotiques ainsi que les pathogènes invasifs. Voraces, ces cellules peuvent internaliser en quelques minutes une large variété de particules telles que des bactéries, levures, billes de latex, ARN double brin ou particules d'encre. Cette variété de particules internalisées par les plasmatoctes s'explique par l'expression, à la membrane plasmique, d'une large diversité de

récepteurs phagocytaires transmembranaires capables de reconnaître une panoplie de molécules. Ces récepteurs incluent des membres de la famille des récepteurs « scavenger » (éboueurs), le récepteur Eater à domaines répétés EGF, les lectines et le récepteur DSCAM.

6.1 Les récepteurs phagocytaires : comparaison drosophile - mammifères

Divers types de récepteurs PRRs sont impliqués dans la reconnaissance de corps étrangers, tant chez les vertébrés que les invertébrés. Chez la drosophile, l'utilisation du criblage à haut débit par ARN interférent (ARNi) fut fort utile dans l'identification des récepteurs impliqués dans le déclenchement de la phagocytose (Ramet *et al*, 2002; Stuart *et al*, 2007; Stuart *et al*, 2005). Étonnamment, de nombreux récepteurs phagocytaires identifiés chez la drosophile présentent une orthologie directe avec les mammifères, en plus de démontrer une conservation fonctionnelle, tandis que d'autres semblent uniques aux insectes (**voir table I**) (Stuart & Ezekowitz, 2008).

Tableau I | Orthologues des récepteurs de surface de la drosophile chez les mammifères

Récepteurs drosophiliens	Ligands	Orthologue(s) mammalien(s)
TEPVI(MCR)	<i>Candida albicans</i>	Composés du complément
TEPIII	<i>S. aureus</i>	
TEPII	<i>E. coli</i>	
Croquemort	Cellules apoptotiques et <i>S. aureus</i>	CD36
Peste	<i>S. aureus</i> et <i>L. monocytogenes</i>	SR-BI
SR-CI	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> et ARNdb	N.D.
Eater	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> et ARNdb	MEGF10;
Draper	Cellules apoptotiques, émondage d'axones et axones rompus	MEGF11; CD91 (LRP); SREC; Stabilin 1 et 2
Nimrod C1	<i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	
PGRP-LC	<i>E. coli</i>	
PGRP-SA (soluble)	<i>S. aureus</i>	PGRPs mammaliens [Ⓜ]

[Ⓜ] Molécules solubles sans rôle dans la phagocytose. MCR, macroglobulin-complement related protein; LRP, lipoprotein receptor-related protein; MEGF, multiple epidermal growth factor (EGF)-like domain; ND, non-déterminé; PGRP, peptidoglycan-recognition protein; SR, scavenger receptor; TEP, thioester-containing protein; SREC, scavenger receptor expressed by endothelial cells. *Tableau adapté de* (Stuart & Ezekowitz, 2008).

6.1.1 Les récepteurs DSCAM

Les nombreuses comparaisons effectuées entre l'immunité des vertébrés et des invertébrés ont depuis longtemps imputé un caractère inférieur au système immunitaire des invertébrés. Cette assumption repose sur l'absence d'une immunité acquise et par conséquent, d'un pouvoir restreint dans la reconnaissance spécifique de pathogènes. En plus de l'immense répertoire des anticorps, l'immunité des vertébrés comprend approximativement 20 récepteurs PRRs, dont les TLRs, alors que chez les invertébrés, ce nombre semble amoindri. Étonnamment, il fut récemment découvert que certains récepteurs membranaires de la superfamille des immunoglobulines présentent une diversification extensive (Li & Guan, 2004). DSCAM, une de ces immunoglobulines qui est retrouvée chez la mouche à fruit, fut d'abord décrite pour son rôle dans le développement neuronal de la drosophile en guidant

l'embranchement neuronal. Pour effectuer ce processus avec spécificité, DSCAM aurait le potentiel de générer plus de 38 000 épissages alternatifs par la combinaison de régions constantes et variables (Wojtowicz *et al*, 2004). Exprimée chez les hémocytes du corps gras et par surcroît sécrétée dans l'hémolymphe de la mouche, DSCAM semblerait parallèlement impliquée dans la reconnaissance d'une forte variété de pathogènes, en générant plus de 18 000 variations de récepteurs au niveau de son domaine extracellulaire (voir **Figure 6a**) (Watson *et al*, 2005). Certaines isoformes reconnaissent avec spécificité la bactérie *E. coli* et induisent son internalisation par phagocytose (Watson *et al*, 2005). Ces évidences font état d'une certaine analogie envers les immunoglobulines des mammifères, puisque différentes isoformes de DSCAM agiraient potentiellement en tant que pseudo-opsonine et/ou comme récepteurs phagocytaires spécifiques (voir **Figure 6b**). Cette suggestion est d'ailleurs supportée par l'identification de nombreuses isoformes de cette immunoglobuline au niveau du protéome du phagosome de la drosophile (Stuart *et al*, 2007). Néanmoins, aucune évidence n'a démontré jusqu'à aujourd'hui l'expansion clonale d'hémocytes distincts suite à la pénétration de pathogènes chez la drosophile.

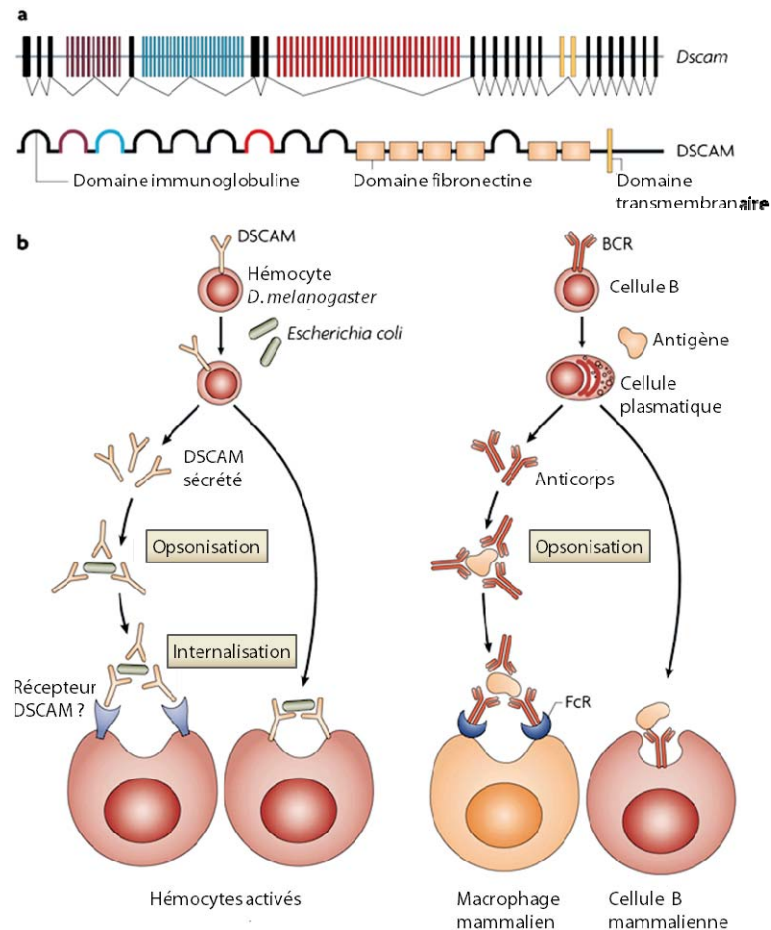


Figure 5. Les immunoglobulines DSCAM des insectes et des mammifères démontrent des caractéristiques fonctionnelles communes.

a) Structures du gène et de la protéine DSCAM de la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* pouvant générer plus de 38 000 épissages alternatifs et approximativement 18 000 variations pourraient être exprimées par les cellules hémocytaires et du corps gras. La variation est observée au niveau du 2^e, 3^e et 7^e domaine d'immunoglobuline. Une forme plus petite de 170 kDa de DSCAM a été identifiée et représenterait la forme sécrétée de la protéine. **b)** L'immunoglobuline DSCAM de la drosophile et les récepteurs des lymphocytes B (BCRs) des mammifères reconnaissent les antigènes du non-soi et transmettent les signaux aux cellules immunitaires provoquant l'activation ou la survie cellulaire. Ces signaux stimulent aussi la production de la forme sécrétée de DSCAM à partir des hémocytes ou cellules du corps gras de la drosophile et la production d'immunoglobulines par les cellules plasmatiques des mammifères. Ces molécules agissent en retour comme des opsonines, facilitant l'internalisation à l'aide de récepteurs sur les phagocytes. Chez les mammifères, les anticorps sont reconnus par les récepteurs Fc, mais chez les hémocytes de la drosophile, la reconnaissance de la forme sécrétée de DSCAM n'a pas été élucidée. De plus, les BCR et DSCAM peuvent agir directement comme récepteurs endocytaires ou phagocytaires, afin d'internaliser les antigènes ou pathogènes liés. Image adaptée de (Stuart & Ezekowitz, 2008).

6.1.2 Les récepteurs « scavenger » (éboueurs)

Découverts originalement pour leur aptitude à lier et internaliser les lipoprotéines acétylées à faible densité (LDL), les récepteurs éboueurs ou « scavenger » (SR) sont particulièrement reconnus pour leur capacité à reconnaître et induire la phagocytose de pathogènes non-opsonisés chez les phagocytes professionnels. Principalement exprimés chez les macrophages et les cellules dendritiques, les récepteurs SR regroupent une diversité de glycoprotéines transmembranaires de surface qui se divisent en 8 classes (A à H) (Murphy *et al*, 2005). Le vaste éventail de ligands reconnus par ces récepteurs éboueurs (polyribonucléotides, l'ADN bactérien méthylé (CpG), le zymosan/ β -glucan de levure, le LPS et le LTA bactérien) témoigne de leur essentialité dans la défense de l'hôte contre les pathogènes (Areschoug & Gordon, 2008; Mukhopadhyay & Gordon, 2004). De ce fait, il est possible d'observer une expansion des membres de la famille des récepteurs SR chez les espèces dépourvues d'un système immunitaire acquis, notamment les invertébrés. Il n'existe en effet que trois récepteurs SR CD36-like chez l'humain, contre dix chez la drosophile. Cette expansion aurait notamment permis de renforcer les capacités de l'immunité innée des invertébrés (Stuart & Ezekowitz, 2008).

6.1.3 Les récepteurs à domaines répétés EGF-like

Reconnaissant divers ligands, les récepteurs à domaines répétés EGF-like font partie d'une nouvelle famille de PRR identifiée chez de nombreuses espèces (Kocks *et al*, 2005). Les membres de cette famille sont particulièrement bien définis chez la drosophile, mais aussi retrouvés chez le ver *C. elegans*, ainsi que chez les mammifères, pour lesquels des fonctions similaires seraient conservées (Kocks *et al*, 2005; Kurucz *et al*, 2007). Le récepteur Eater, le membre le plus caractérisé de cette nouvelle famille émergente, agit à titre de PRR majeur en liant un vaste éventail de surfaces microbiennes à l'aide de ses quatre domaines EGF-like. De plus, Eater

s'avère la cible de Serpent, un facteur de transcription essentiel à la phagocytose bactérienne (Kocks *et al*, 2005; Ramet *et al*, 2002). Similaire à Eater, Nimrod C1 semble agir autant comme récepteur phagocytaire que molécule d'adhésion (Ju *et al*, 2006). Le récepteur Draper quant à lui, semble nécessaire à l'élimination des cellules apoptotiques du système nerveux central, des macrophages embryonnaires et des cellules S2 (Freeman *et al*, 2003; Manaka *et al*, 2004).

6.1.4 Les lectines

Les lectines exprimées en surface des phagocytes sont spécialisées dans la détection des sucres du soi et du non-soi, afin de reconnaître de nombreux agents pathogènes. Les récepteurs CR-3, mannose et Dectin-1 semblent impliqués dans la phagocytose des levures et du zymosan (Brown & Gordon, 2001; Ezekowitz *et al*, 1990; Ross *et al*, 1985). Les lectines de type C et les galectines qui reconnaissent des structures plus complexes, sont retrouvées autant chez les vertébrés que les invertébrés. Chez la drosophile, un groupe de gènes de lectines de type C exprimé à la surface des hémocytes permettent d'opsoniser et d'agglutiner les corps étrangers, ce qui mène à la phagocytose ou l'encapsulation des pathogènes microbiens et des parasites (Tanji *et al*, 2006; Tauber & Chernyak, 1989).

6.1.5 Les récepteurs du complément

Originant des invertébrés, le système du complément est un composant majeur de l'immunité innée. Cependant, ce système participe également à la mise de la réponse immunitaire acquise puisqu'il permet le recrutement des lymphocytes B et T ainsi que des macrophages chez les vertébrés. L'activation protéolytique est engendrée selon 3 voies différentes (classique, alternative et par lectines) et génère deux produits : un petit fragment anaphylactique (C3a, C4a et C5a) et un fragment plus large qui opsonise, par lien covalent, la surface des pathogènes (Carroll, 2004).

Possédant de fortes propriétés signalétiques, les anaphylatoxines se répandent et recrutent par chimiotactisme des macrophages au site d'infection. Les fragments plus larges liés en surface des pathogènes induisent la phagocytose ou la destruction lytique des pathogènes par le complexe d'attaque membranaire (Carroll, 2004). Les neutrophiles et macrophages des vertébrés présentent en surface plusieurs récepteurs du complément, notamment les récepteurs transmembranaires CR1, CR3 et CR4, tous impliqués dans la phagocytose de particules opsonisées par le complément (Underhill & Ozinsky, 2002). D'un point de vue évolutif, la cascade protéolytique des facteurs du complément serait apparue tôt dans l'évolution des animaux à travers la famille des TEP, un système du complément simplifié. Chez les invertébrés comme la drosophile, l'opsonisation de pathogènes microbiens par les TEPs rehausserait leur internalisation par phagocytose (Stroschein-Stevenson *et al*, 2006). Toutefois, l'équivalent des récepteurs du complément chez la drosophile demeure inconnu.

7. Les récepteurs Fc γ et TLR de l'immunité innée

7.1 Les récepteurs Fc γ

Totalement absent chez la drosophile et les autres invertébrés, les récepteurs Fc ont grandement fait progresser les études portant sur la caractérisation des différentes voies de signalisation impliquées lors de la phagocytose (Unkeless *et al*, 1995). Exprimés à la surface des phagocytes professionnels des vertébrés, les récepteurs Fc γ permettent d'éliminer, par phagocytose, les particules opsonisées par les immunoglobulines de type G (IgG), en reconnaissant la portion Fc des IgG complexées. Les récepteurs Fc γ impliqués dans la phagocytose de particules opsonisées incluent les récepteurs Fc γ RI, Fc γ RIIa et Fc γ RIII. À travers cette diversité, il est possible de retrouver deux classes de récepteurs Fc γ : ceux qui possèdent des motifs ITAM activent certaines fonctions effectrices et les autres dotés de motifs ITIM inhibent ces mêmes fonctions effectrices. La présence de motifs ITAM sur les domaines intracellulaires des récepteurs Fc γ induit le recrutement de kinases et l'initiation subséquente de cascades de phosphorylation. À l'opposé, les motifs ITIM activent le recrutement de phosphatases qui inhibent les cascades de signalisation intracellulaire (Ravetch & Bolland, 2001).

7.2 Les récepteurs TLR

Les « Toll-like receptors » (TLRs) représentent le plus important groupe des récepteurs de l'immunité innée. Ces récepteurs font partie d'un ancien système de reconnaissance et de signalisation originellement connu pour son rôle dans le développement embryonnaire de la Drosophile. Il fut subséquentement démontré que les TLRs (connus sous le nom de Tolls chez la Drosophile) participent chez l'insecte adulte à la défense immunitaire contre les infections bactériennes et fongiques, de même que chez les plantes et les vertébrés (Murphy *et al*, 2008). Jusqu'à présent, au moins 12 récepteurs TLR ont été découverts chez la souris et l'humain et chacun de

ces 12 TLRs sont dévoués à reconnaître un ensemble bien distinct de patrons moléculaires (PAMPs), tels que l'ARN simple et double brin, l'ADN méthylé, le LPS, la flagelline des flagelles bactériens et les lipopeptides diacylés et triacylés, tous retrouvés chez la majorité des pathogènes (voir **Figure 5**). Exprimés à la surface cellulaire ou au niveau de la membrane des endosomes, les TLRs peuvent détecter la présence de composés provenant de pathogènes internalisés par phagocytose ou endocytose (voir **Figure 5**). Bien qu'ils semblent induire une activation cellulaire et la production de cytokines en réponse aux microbes identifiés, les TLRs ne jouent cependant aucun rôle dans l'adhésion ou la phagocytose de micro-organismes (Trinchieri & Sher, 2007). Toutefois, l'initiation de la réponse immunitaire innée par l'entremise des TLRs rehausse le caractère antimicrobien des macrophages, en plus de favoriser la présentation antigénique, afin d'accélérer la réponse immunitaire acquise (Trinchieri & Sher, 2007). En retour, les cytokines sécrétées par les lymphocytes activés effectuent un feed-back sur les macrophages et augmentent leurs habiletés à stimuler les cellules T, en plus de favoriser l'élimination des pathogènes phagocytés (Mosser, 2003). La reconnaissance de pathogènes par l'entremise des récepteurs TLRs, ainsi que la réponse immunitaire subséquente à cette reconnaissance gravitent autour de la maturation du phagosome.

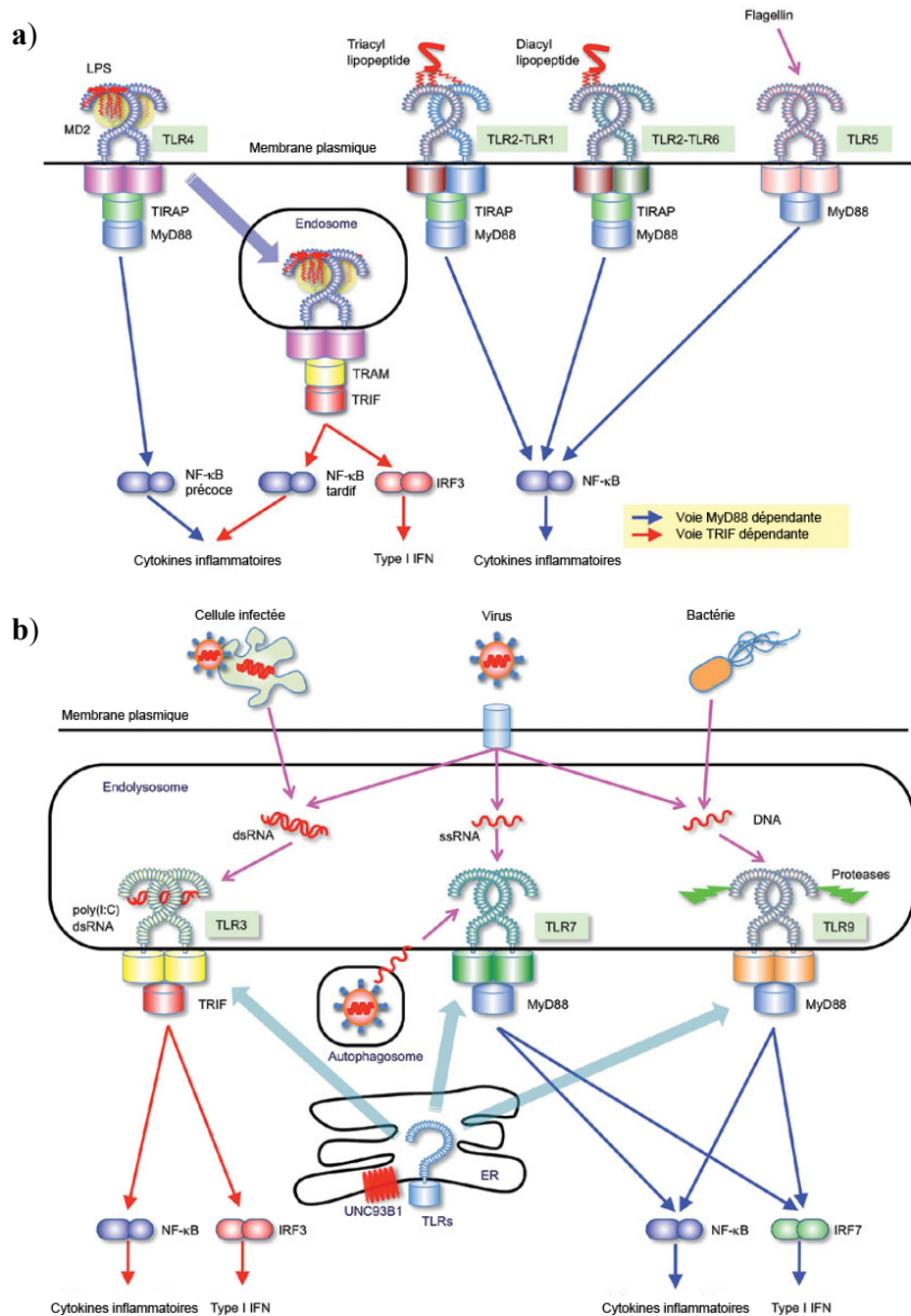


Figure 6. Reconnaissance de PAMP par les récepteurs TLRs.

a) Reconnaissance à la surface cellulaire de PAMP par les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6. TLR4 en complexe avec MD2 reconnaît le LPS. La formation d'un récepteur multimérique composé de deux copies du complexe TLR4-MD2-LPS transmet initialement les signaux pour la phase précoce d'activation de NF- κ B en recrutant l'adaptateur TIRAP (Mal) et MyD88. Autant la phase précoce et tardive de l'activation de NF- κ B est nécessaire pour l'induction de cytokines inflammatoires. Les hétérodimères TLR2-TLR1 et TLR2-TLR6 reconnaissent les lipopeptides triacylés et diacylés respectivement. TLR5 reconnaît les (*suite à la page suivante*)

flagellin et active NF- κ B par MyD88. **b)** Reconnaissance intracellulaire de PAMP par les TLR3, TLR7, TLR9. TLR3 reconnaît l'ARN double brin provenant de virus ou de cellules infectées par des virus. TLR3 active la voie TRIF dépendante pour induire la synthèse d'Interféron de type I et de cytokines inflammatoires. Chez les cellules dendritiques plasmatoïdes, TLR7 reconnaît l'ARN simple brin provenant de virus contenus dans les endolysosomes et active NF- κ B et IRF7 via MyD88 pour induire la production de cytokines inflammatoires et d'Interféron de type I. De plus, l'autophagie est impliquée dans la livraison d'ARN simple brin aux vésicules contenant TLR7. TLR9 reconnaît l'ADN provenant de virus ou de bactéries. Le clivage protéolytique de TLR9 par des protéases cellulaires est nécessaire pour la transduction du signal. TLR9 recrute MyD88 et active NF- κ B et IRF7 dans les cellules dendritiques plasmatoïdes. TLR3, TLR7 et TLR9 sont principalement localisés dans le réticulum endoplasmique sous forme non-liée et sont transportés vers les endolysosomes lorsqu'ils sont engagés avec leurs ligands. UNC93B1 interagit avec ces TLRs dans le réticulum endoplasmique et est essentiel à leur transport lorsqu'ils sont liés à leurs ligands. Image adaptée de (Kawai & Akira, 2010).

8. L'immunité acquise et la phagocytose chez les vertébrés à mâchoire

De tous les organismes, les vertébrés possèdent sans contredit le système immunitaire le plus polyvalent et le plus complexe. L'immunité acquise des vertébrés « s'acquiert » au cours de la vie de l'organisme en développant, suite à la reconnaissance d'antigènes provenant d'agents infectieux, une mémoire immunologique. À la fois active et acquise, l'immunité acquise potentialise l'organisme à répondre plus rapidement lors de la réexposition de l'hôte au même agent infectieux. De ce fait, l'immunité acquise permet d'éliciter une réponse immunitaire hautement spécifique et des plus efficaces envers une grande diversité de pathogènes environnants.

Environ 90 % des espèces animales sont dépourvues de toute forme d'immunité acquise. Malgré cette absence, ces espèces ont prospéré depuis des décennies, dans un monde dominé par les microbes. Vraisemblablement, la réponse acquise procure un avantage compétitif aux animaux qui la possèdent. Contrairement à l'immunité innée, le développement de la réponse immunitaire acquise n'est pas instantanée, puisqu'elle découle de la reconnaissance d'antigènes par les lymphocytes B ou T dotés de récepteurs spécialisés, nommés BCR et TCR. L'interaction entre le récepteur lymphocytaire et son antigène entraîne la prolifération des cellules B et T en lymphocytes effecteurs et mémoires. Des différences sont toutefois observées au niveau du mécanisme de reconnaissance de l'antigène entre les lymphocytes T et B. Le lymphocyte B reconnaît directement l'antigène au niveau de ses récepteurs BCR et induit la synthèse d'anticorps spécifiques envers l'antigène reconnu. À l'opposé, le lymphocyte T $CD4^+$ ne reconnaît pas directement l'antigène, ce dernier doit être préalablement apprêté par les cellules présentatrice d'antigènes (CPA) du système immunitaire inné, tels que les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules phagocytent, appréhendent et présentent à leur surface l'antigène sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. De ce fait, la reconnaissance antigénique des lymphocytes T $CD4^+$ s'avère tributaire de la phagocytose. La phagocytose joue

donc un rôle déterminant au cœur du système immunitaire des vertébrés, puisqu'elle relie, par la présentation antigénique, les branches innée et acquise du système immunitaire des vertébrés (Hoebe *et al*, 2004; Vivier & Malissen, 2005).

Malgré la transformation fonctionnelle du phagosome chez les vertébrés à mâchoire, il faut toutefois retenir que l'élimination de pathogènes par phagocytose n'est en fait qu'un simple mécanisme de défense de l'immunité innée qui provient de la transformation de la fonction originelle du phagosome, soit celle de dégrader des molécules complexes à des fins nutritives. À travers l'évolution, les propriétés dégradatives du phagosome ont été exploitées afin d'améliorer l'habileté des organismes multicellulaires à surveiller leur environnement, ainsi qu'à développer des mécanismes de défense plus efficaces. Le phagosome des vertébrés à mâchoire s'avère donc un compartiment ayant intégré les fonctions cellulaires nécessaires à l'initiation de l'immunité acquise.

8.1 L'origine de l'immunité acquise

Les agnathes (vertébrés sans mâchoire) occupent une position fascinante dans l'échelle évolutive de l'immunité (Pancer & Cooper, 2006). Au cours des 50 millions d'années qui ont séparé les agnathes de l'émergence des chondrichthyens (vertébrés à mâchoire) quelque chose de mystérieux, voire même de miraculeux, se serait produit : le système immunitaire acquis aurait soudainement évolué. Tous les vertébrés à mâchoire, incluant tous les représentants phylogénétiques les plus primitifs, tels que les requins, sont équipés d'un système immunitaire acquis. À l'opposé, toute tentative d'identification des composants clés de l'immunité acquise chez les agnathes et les organismes plus primitifs se sont avérées infructueuses (**voir figure 7**). Il semble donc exister une délimitation évolutive franche au niveau de l'apparition du système immunitaire acquis entre les vertébrés à mâchoire (les requins et les raies) et les vertébrés sans mâchoire (la lamproie et la myxine) (Kasahara *et al*, 2004; Klein & Sato, 1998). Par ces faits, il fut proposé que l'émergence abrupte du

Le système immunitaire acquis serait le fruit d'un « big bang » immunologique qui aurait eu lieu chez l'ancêtre commun des vertébrés à mâchoire (Hughes, 1999).

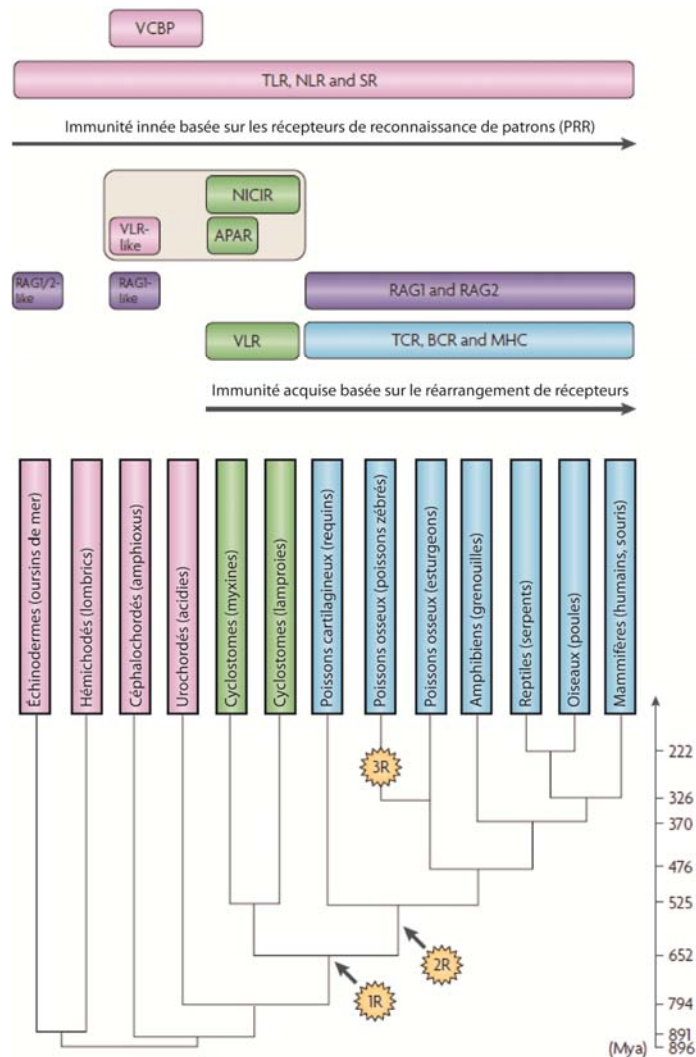


Figure 7. Stades évolutifs du système immunitaire des deuterostomes.

Les molécules uniques aux vertébrés avec et sans mâchoire sont identifiées en bleu et vert respectivement, tandis que les molécules qui ont émergé chez les invertébrés sont roses. Les gènes RAG-like (Recombination-activating gene) en mauve sont d'origine virale ou bactérienne et sont aussi présents dans les génomes des oursins de mer et d'amphioxus. Les récepteurs APAR (Agnathan Paired receptors resembling Antigen Receptors) et NICIR (Novel Immunoreceptor tyrosine-based activation motif-Containing Immunoglobulin superfamily Receptor) aussi connus sous le nom de TCR-like de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) des agnathes seraient les précurseurs des TCR et BCR. 1R et 2R indiquent les deux rondes de duplication complète de génome. L'ancêtre de la majorité des poissons à nageoires rayonnées aurait subi une duplication additionnelle de son génome (3R) il y a environ 320 millions d'années (Vandepoele *et al.*, 2004). MHC, complexe majeur d'histocompatibilité; NLR, Nod-like receptor; SR, scavenger receptor; TLR, Toll-like receptor; VCBP, V-region containing chitin-binding protein; VLR, variable lymphocyte receptor; Mya, million(s) d'années. *Image adaptée de* (Flajnik & Kasahara, 2010).

8.1.1 L'hypothèse de la mâchoire

Suite à la découverte d'une délimitation franche concernant les mécanismes de défense immunitaire entre les vertébrés à mâchoire et les vertébrés sans mâchoire, il fut logiquement postulé que l'évolution de la mâchoire chez l'ancêtre des poissons (placodermes) aurait été l'élément déclencheur de l'émergence du système immunitaire acquis. L'émergence de la maxillaire fut un des événements les plus importants dans l'évolution des vertébrés (Andersson & Matsunaga, 1996). Son avantage est notoire : elle permet de mordre et d'avalier des proies plus larges, plus actives et inaccessibles aux vertébrés sans mâchoire. Ce nouveau style de vie de prédation aurait toutefois comporté certains désavantages. L'ingestion de proies composées de pièces contondantes, telles que les os pointus et les écailles, aurait drastiquement augmenté les blessures de la paroi du tractus digestif et de ce fait, aurait considérablement rehaussé le risque infectieux. Bien que l'immunité innée aurait limité cet accroissement d'infections du tractus gastro-intestinal, il n'en demeure pas moins que l'innovation d'un système clonal à récepteurs multiples aurait grandement contribué à gérer une gamme d'infections beaucoup plus vaste que l'immunité innée à elle seule n'aurait pu prendre en charge (Andersson & Matsunaga, 1996).

Les tissus lymphoïdes associés au tractus intestinal (GALT) des vertébrés assurent la défense de la muqueuse gastro-intestinale contre les agents pathogènes. L'épithélium intestinal, composé de microvillosités et de cryptes, s'étend sur une aire de surface (environ 400 m²) plus grande que celle de la peau d'un humain adulte. Cette vaste région muqueuse constamment exposée à une large diversité de microbes pathogéniques et commensaux nécessite une défense soutenue de la part des GALT et de l'immunité innée localisée. L'hypothèse d'une relation directe entre l'apparition de la mâchoire et l'émergence de l'immunité acquise présume que les GALT auraient été le lieu de naissance de la forme ancestrale de l'immunité acquise. Les GALT sont universellement présents chez tous les vertébrés à mâchoire et s'avèrent des sites immuns primaires pour certaines cellules T intraépithéliales (IEL) indépendantes du thymus (Rocha, 2007; Rocha *et al*, 1994). La relation qui existerait entre la présence

de GALT et un style de vie de prédation est spécialement confirmée chez l'hippocampe, un poisson à mâchoire non-primitif mais particulier, puisqu'il s'alimente de proies non-contondantes, en aspirant des crustacés planctoniques et des petites larves de poissons à partir d'un bec suceur. L'anatomie abdominale de l'hippocampe révèle un intestin simple et relativement petit (comparé en proportion aux autres vertébrés à mâchoire), malgré la présence potentielle d'un système immunitaire acquis (le gène RAG1 fut identifié dans le génome de l'hippocampe). Par ailleurs, l'absence de lymphocytes et de leucocytes au niveau de l'épithélium intestinal et de la lamina propria de l'hippocampe contraste fortement avec les autres poissons à mâchoire, puisque ces poissons possèdent une abondance de ces cellules mononuclées au niveau intestinal (Matsunaga & Rahman, 1998). Il semblerait donc qu'il existe une relation directe entre un mode de vie de prédation, par l'utilisation d'une mâchoire, et la présence de GALT. N'utilisant pas sa mâchoire pour capturer de grosses proies, l'hippocampe réduit ainsi son risque d'infections intestinales et de ce fait, aurait perdu ou réduit considérablement ses GALT à un niveau résiduel.

8.1.2 Les gènes RAG

Malgré l'absence de détails précis, il semblerait que deux événements ont procuré l'innovation et le matériel brut nécessaire à l'éclosion du système immunitaire acquis : l'invasion des transposons RAG1/RAG2 et deux rondes de duplication entière du génome des ancêtres des vertébrés (Hughes, 1999; Kasahara *et al.*, 2004). Les lymphocytes exhibent une large variété de récepteurs de surface pouvant reconnaître et répondre envers un nombre illimité de pathogènes. Cette diversité est engendrée par une variété de mécanismes génétiques et de sélection cellulaire qui maximisent le répertoire de ces récepteurs, tout en minimisant l'autoréactivité envers les antigènes du soi. Ces récepteurs lymphocytaires sont si variés et nombreux que s'ils provenaient chacun de gènes individuels, le génome entier de l'humain serait entièrement dévoué à ces récepteurs (Market & Papavasiliou, 2003). Une diversité substantielle des récepteurs BCR et TCR est d'abord générée par les recombinaisons RAG1/RAG2 (Recombination-Activating Genes) qui catalysent le réarrangement V(D)J aléatoire de segments de gènes lors du développement précoce des lymphocytes, créant un répertoire primaire. Suivant la reconnaissance d'un antigène, la déaminase AID (activation-induced deaminase) induit des hypermutations somatiques et génère un second répertoire de récepteurs plus diversifié. Ainsi, ces processus permettent de générer une diversité de récepteurs pouvant reconnaître un nombre illimité de pathogènes.

Les gènes RAG partagent des similarités mécanistiques avec les procédés d'excision et d'intégration d'éléments transposables des procaryotes (Fugmann *et al.*, 2000). Étonnamment, les gènes RAG1 et RAG2 ont été retrouvés dans le génome de l'oursin de mer (échinoderme) (**voir figure 7**) ce qui laisse sous-entendre qu'un transposon aurait envahi sous forme latente le génome de l'ancêtre des échinodermes 100 millions d'années avant l'émergence de l'immunité acquise (Fugmann *et al.*, 2006). L'acquisition par transfert horizontal des gènes RAG, ainsi que leur absence chez les agnathes expliquent en quoi le système immunitaire acquis, caractérisé par ses récepteurs d'antigènes recombinés BCR et TCR, s'avère restreint aux vertébrés à mâchoire.

8.2 La duplication génomique

La duplication de gènes (paralogie) est un processus évolutif majeur pour l'innovation de nouvelles fonctions cellulaires. Lors de ce processus, une copie du gène dupliqué accumule des mutations favorables au développement de nouvelles fonctions pendant que la seconde assure la fonction d'origine et maintient l'homéostasie cellulaire. Ces duplications peuvent notamment impliquer des gènes individuels, des segments génomiques ou des génomes entiers. Il y a plus de 40 ans, Susumu Ohno proposait l'hypothèse controversée que le génome de l'ancêtre des vertébrés aurait subi une ou deux rondes de duplication génomique au stade des poissons ou des amphibiens par tétraploïdisation (Ohno *et al*, 1968). Malgré le fait que cette proposition fut hautement débattue, il est désormais largement accepté que le génome des ancêtres des vertébrés aurait bel et bien éprouvé deux rondes de duplication génomique : la première suivant l'émergence des urochordés et la deuxième avant l'apparition des vertébrés à mâchoire (**voir figure 7**) (Dehal & Boore, 2005; Kasahara, 2007; Nakatani *et al*, 2007; Panopoulou & Poustka, 2005). Ces duplications génomiques entières semblent avoir joué un rôle crucial dans l'émergence de l'immunité acquise des vertébrés à mâchoire, puisque plusieurs paralogues résultant de ces duplications génomiques sont essentiels au système immunitaire acquis des vertébrés à mâchoire (Kasahara, 1998; Okada & Asai, 2008). Un exemple notoire de ces duplications de gènes du système immunitaire acquis est celui du groupe des paralogues des CMH parmi lequel se retrouvent plus de 100 familles de gènes distribuées en quatre ensembles de paralogons (segments chromosomiques de paralogues étroitement liés). Comme cela fut anticipé par la théorie de duplication génomique entière d'Ohno, les génomes des invertébrés amphioxii et *Ciona intestinalis* qui ont émergé avant les duplications génomiques entières ne possèdent qu'une seule région « proto-CMH » dépourvue des gènes de CMH de classe I et II (Abi-Rached *et al*, 2002; Vienne *et al*, 2003). Nettement enrichi chez les vertébrés, cette région renferme de nombreux paralogues essentiels au processus de la présentation antigénique des CMH de classe I et II. En plus de tapasin, il est possible d'y retrouver les transporteurs de peptides antigéniques du

réticulum endoplasmique TAP1 et TAP2. Par ailleurs, les paralogues du CMH renferment 10 des 11 cathepsins, incluant les cathepsins D, S et L, dont plusieurs semblent avoir été co-optées à différentes reprises au cours de l'évolution pour la présentation de peptides sur les molécules de CMH de classe II et dans la sélection thymique (Uinuk-Ool *et al*, 2003). D'autres exemples des paralogues du CMH incluent : l'alpha-2-macroglobulin (A2M), les composés du complément C3, C4A, C4B et C5, le récepteur RXRB et la protéine RFX5 qui régulent l'expression des CMH de classe I et II respectivement, NOTCH1 qui est impliqué dans la différenciation lymphocytaire et VAV1 qui est nécessaire au développement et à l'activation des lymphocytes B et T (Flajnik & Kasahara, 2010).

C'est notamment le cas du protéasome, un complexe catalytique à sous-unités multiples qui découpe les antigènes endogènes en peptides immunologiques de longueur appropriée pour leur chargement sur les molécules de CMH de classe I. Les sous-unités du protéasome sont phylogénétiquement anciennes, puisqu'elles sont universellement retrouvées autant chez les bactéries que les eucaryotes. Malgré l'absence d'une immunité acquise chez la drosophile et la levure, les peptides générés par le protéasome de ces espèces possèdent une taille et une composition en acides aminés appropriées à leur chargement sur des CMH de classe I (Niedermann *et al*, 1997). Par conséquent, il est fortement probable que le protéasome, par sa capacité fonctionnelle d'origine, fut co-opté chez les vertébrés pour le développement d'une nouvelle fonction lors de l'établissement de l'immunité acquise. Suivant la stimulation par interféron- γ *in vitro* chez les vertébrés, les sous-unités PSMB5, PSMB6 et PSMB7 du protéasome sont remplacées respectivement par leurs paralogues de l'immunoprotéasome PSMB8, PSMB9 et PSMB10. Suite à leur duplication, les gènes PSMB5, PSMB6 et PSMB7 sembleraient avoir conservé leur fonction ancestrale, tandis que les sous-unités PSMB8, PSMB9 et PSMB10 auraient évolué vers une optimisation de la production de peptides spécifiques à la présentation antigénique sur les CMH de classe I (Danchin *et al*, 2003). Étonnamment, des études ont démontrés qu'une évolution divergente des gènes PSMB et TAP semble se poursuivre selon la pression sélective des différentes espèces des vertébrés (Nonaka *et al*, 2000; Powis *et al*, 1992a; Powis *et al*, 1992b).

8.3 La phagocytose et la présentation antigénique

Bien que les branches innée et acquise de l'immunité des vertébrés accomplissent un rôle immunitaire bien distinct, il n'en demeure pas moins que ces deux sous-systèmes immunitaires sont en fait complémentaires et interdépendants. La mise en place de la réponse acquise est initiée par l'immunité innée, via la phagocytose, où la dégradation de pathogènes au sein de l'environnement hautement dégradatif du phagolysosome s'avère idéale pour l'apprêtement et la présentation antigénique (**voir Figure 8**). Chez les vertébrés à mâchoire, les phagocytes professionnels tels que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages représentent les cellules présentatrices d'antigènes par excellence. Elles phagocytent et digèrent les protéines provenant des pathogènes internalisés. Les peptides antigéniques ainsi générés dans la lumière du phagosome sont chargés dans la fente peptidique des molécules de CMH et présentés à la surface cellulaire, afin d'initier le système immunitaire acquis. Cette stimulation de l'immunité acquise implique plus précisément la reconnaissance spécifique du complexe CMH II-peptide par les récepteurs TCR des cellules T CD4⁺ qui ont co-évolué avec les CMH (Du Pasquier, 2004).

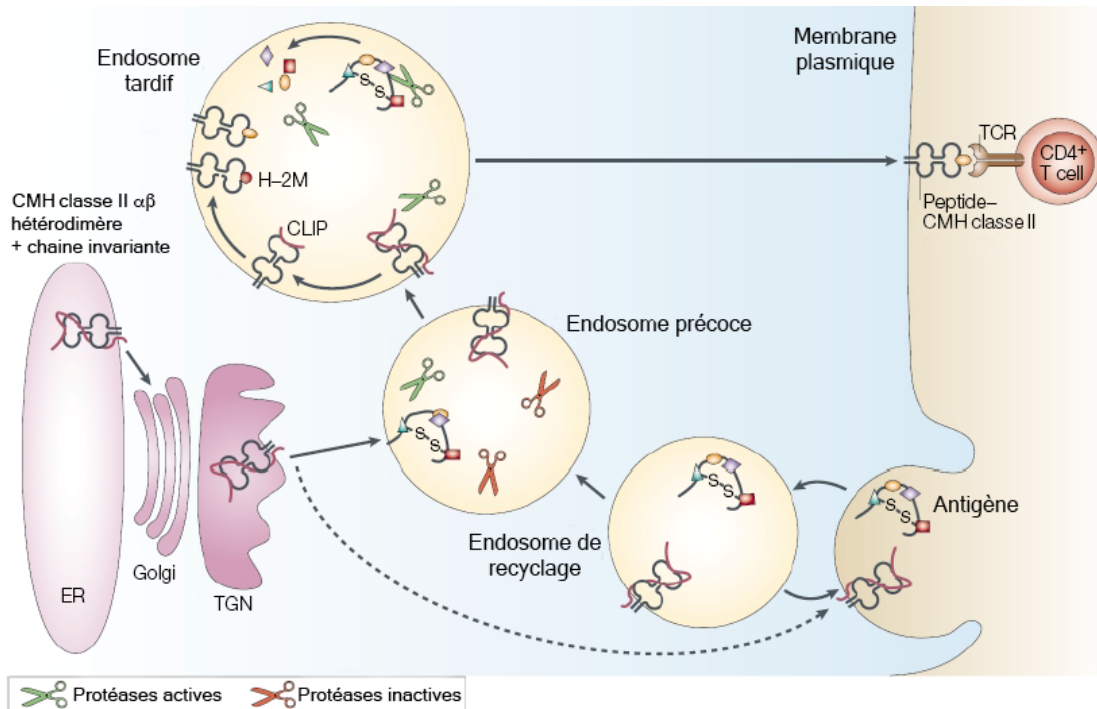


Figure 8. Voie de la présentation antigénique des CMH de classe II.

Suivant l'internalisation de l'antigène, ce dernier est dégradé progressivement par les protéases actives des endosomes précoces et tardifs. C'est la maturation par l'acidification du phagosome/endosome qui active les hydrolases qui, une fois activées, dégradent les protéines internalisées ainsi que la chaîne invariante (Li) couplée au CMH de classe II. Suite au clivage de Li, la fente peptidique du CMH de classe II demeure occupée par CLIP (« Class-II associated invariant chain peptide ») qui prévient le chargement de peptides précoces. Le chargement peptidique est effectué par une molécule non-conventionnelle du CMH de classe II et le complexe CMH classe II/peptide est transporté à la membrane plasmique pour présenter et activer les lymphocytes T CD4⁺. ER, réticulum endoplasmique; TCR, récepteur des lymphocytes T; TGN, réseau golgien transitoire. Image adaptée de (Honey & Rudensky, 2003).

8.3.1 La présentation antigénique sur CMH de classe II

La présentation antigénique d'antigènes exogènes via les CMH de classe II stimule la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et la sécrétion de différentes cytokines qui promeuvent ou inhibent le développement d'un autre ensemble de cellules immunitaires. Bien qu'efficace, le phagosome des phagocytes professionnels se doit toutefois de réguler avec précision le niveau dégradatif de son environnement.

À partir de divers mécanismes, il peut épargner les protéines internalisées d'une dégradation protéolytique complète, tout en préservant l'immunogénicité des peptides antigéniques. Un de ces mécanismes consiste à acquérir différents types d'hydrolases selon l'état de maturation du phagosome (Garin *et al*, 2001; Lennon-Dumenil *et al*, 2002). En règle générale, l'activation des macrophages induit une surexpression de protéases lysosomales. Toutefois, l'activation par l'interféron gamma (IFN- γ) et/ou le LPS mène à une réduction de l'activité protéolytique et, de ce fait, amplifie la capacité et la qualité de la présentation antigénique (Jutras *et al*, 2008; Trost *et al*, 2009).

La régulation du taux de dégradation protéique est finement contrôlée au niveau de l'activité protéolytique des différentes protéases, où la réduction du taux de dégradation favorise la production de peptides antigéniques propices à leur chargement dans la fente peptidique des CMH de classe II. Deux facteurs critiques régulent l'activité des protéases : les concentrations des réactants et le pH luminal. Un milieu acide dénature les protéines des particules étrangères et ouvre l'accès aux diverses enzymes protéolytiques (Savina & Amigorena, 2007). Résistantes à l'acidité, chaque hydrolase acquise au cours du processus de maturation du phagosome possède une gamme de pH d'activité optimale (Barrett & Kirschke, 1981; Claus *et al*, 1998; Manoury *et al*, 1998). En régulant le pH luminal du phagosome, le phagocyte contrôle directement l'efficacité et la spécificité de la protéolyse des pathogènes internalisés.

Le pH luminal du phagosome des neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques est régulé plus précisément par le recrutement de deux complexes à sous-unités multiples : la NADPH oxydase (Gp91/NOX2) qui alcalinise le pH phagosomal et la pompe à proton vacuolaire V-ATPase qui l'acidifie. Bien équilibrés, ces deux systèmes se neutralisent par la réaction entre les réactifs oxygénés produits par la NADPH oxydase NOX2 et les protons importés par la pompe V-ATPase. La flambée oxydative engendrée par la NADPH oxydase NOX2 est caractérisée par une élévation précoce suivie d'une chute drastique du pH phagosomal chez les neutrophiles, mais beaucoup plus prolongée dans le cas des

cellules dendritiques. C'est d'ailleurs pour cette raison que les cellules dendritiques s'avèrent les meilleures cellules présentatrices d'antigènes, puisqu'en limitant la dégradation protéolytique, elles génèrent davantage de peptides immunogènes (Savina & Amigorena, 2007). Le scénario est toutefois différent chez les macrophages. L'activité de NOX2 y est réduite et s'effectue principalement à la membrane plasmique où les réactifs oxygénés sont sécrétés au niveau extracellulaire (Berton *et al*, 1982). Ces variations expliquent donc les différentes capacités dégradatives entre les phagocytes professionnels, d'autant plus que l'enrichissement en protéases s'effectue plus rapidement chez les macrophages que les cellules dendritiques (Lennon-Dumenil *et al*, 2002). Bien que la drosophile génère à l'aide de l'oxydase dDuox une flambée oxydative au niveau de son intestin pour contrer les infections microbiennes (Mehta *et al*, 2005), elle ne possède toutefois pas de NADPH oxydase NOX2, ni aucune des sous-unités p47, p22, p40 ou p67^{phox} nécessaires à l'activation et à la régulation de NOX2 à la membrane du phagosome (Sumimoto, 2008).

8.3.2 La présentation antigénique sur CMH de classe I

À l'opposé des CMH de classe II, la présentation antigénique sur les CMH de classe I s'effectue à partir d'antigènes endogènes, tels que les virus, et stimule les lymphocytes T CD8⁺ (Braciale *et al*, 1987). Les antigènes retrouvés au niveau du cytoplasme sont pris en charge par le protéasome, puis dégradés en oligopeptides. Ces peptides sont subséquemment transportés vers la lumière du réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP pour être chargés sur les CMH de classe I résidents avant d'être transportés et présentés à la surface cellulaire pour la stimulation des lymphocytes T CD8⁺. Bien que ce modèle représente la voie classique de la présentation antigénique sur les CMH de classe I, d'autres voies alternatives semblent exister (English *et al*, 2009; Kovacovics-Bankowski & Rock, 1995). C'est le cas notamment de la présentation croisée, où des antigènes de source exogène présentés sur des molécules CMH de classe I activent des lymphocytes T

CD8⁺ (Ackerman *et al*, 2003). Cette double capacité de présentation antigénique proviendrait de la participation du réticulum endoplasmique lors de la phagocytose (**voir section 9.1**) (Gagnon *et al*, 2002). La présence du réticulum endoplasmique procure au phagosome les éléments clés nécessaires à l'apprêtement et à la présentation croisée des peptides exogènes sur des molécules de CMH de classe I (Ackerman *et al*, 2003; Grotzke *et al*, 2009; Guermonprez *et al*, 2003; Houde *et al*, 2003). Suite à la dégradation d'antigènes exogènes dans sa lumière, le phagosome pourrait exporter, par rétrotranslocation via le translocon Sec61, des peptides vers le cytoplasme (Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1995). De façon similaire au modèle classique, ces peptides sont pris en charge par le protéasome pour leur apprêtement final et transportés vers la lumière du phagosome via TAP1 et TAP2, acquis du réticulum endoplasmique, pour leur chargement sur les molécules de CMH de classe I (**voir figure 9**).

D'un point de vue évolutif, l'implication du phagosome dans la présentation croisée est le résultat de l'intégration d'une large gamme de composés multimoléculaires à travers l'évolution. La digestion d'antigènes exogènes en peptides antigéniques propices à leur présentation sur les molécules de CMH de classe I provient des propriétés phagotrophiques des organismes unicellulaires, où les bactéries internalisées sont dégradées en composants élémentaires qui sont utilisés comme source de nutriments. Chez les vertébrés toutefois, la forte capacité protéolytique du phagosome s'avère réservée à la production de peptides antigéniques, particulièrement sous l'effet de l'IFN- γ induisant l'acidification et l'activité protéolytique du phagosome (Jutras *et al*, 2008; Trost *et al*, 2009; Yates *et al*, 2007). La présence du réticulum endoplasmique au niveau des phagosomes (**voir section 9.1**) aurait permis le développement d'une nouvelle fonction chez les vertébrés à mâchoire avec l'avènement du locus du CMH, où de nombreuses protéines impliquées dans la présentation antigénique y sont encodées. D'anciens processus cellulaires ont ainsi été co-optés par le phagosome des vertébrés, lui procurant de nouvelles fonctionnalités qui ont maximisé ses habiletés à présenter des peptides exogènes et stimuler les lymphocytes T CD8⁺ (**voir section 8.2**) (Bertholet *et al*, 2006).

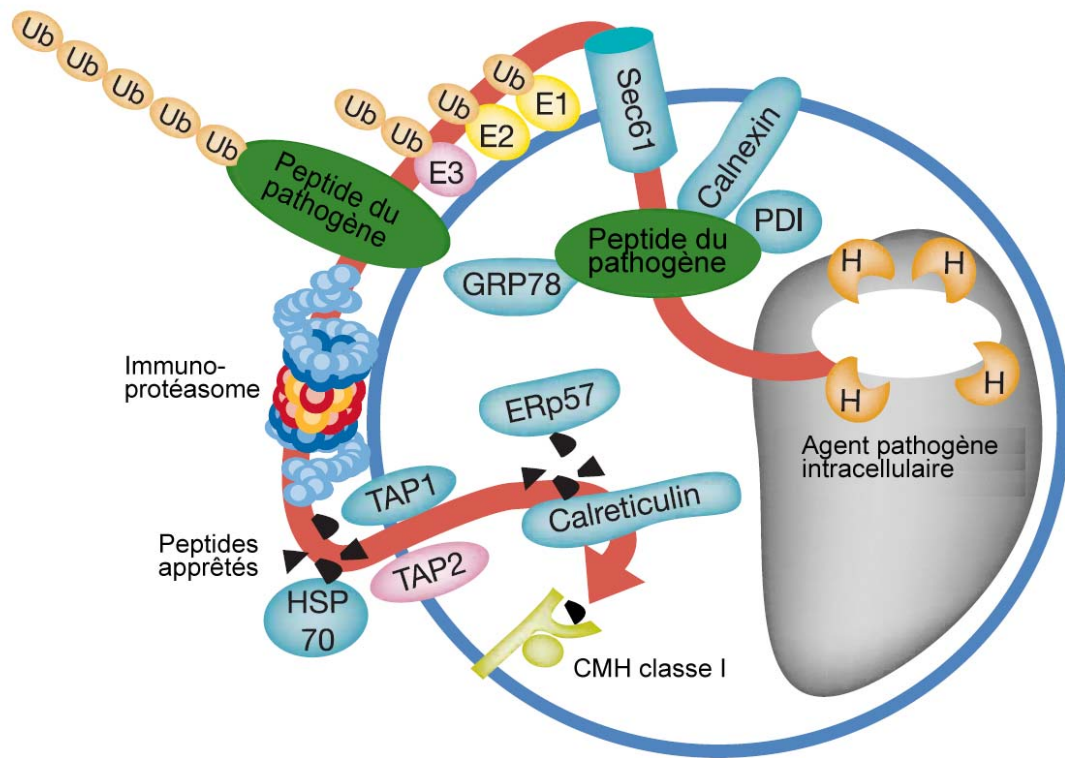


Figure 9. Modèle de la présentation croisée d'antigènes exogènes effectuée dans le phagosome des vertébrés.

La présence de composés du réticulum endoplasmique au niveau du phagosome lui procure les éléments nécessaires à l'apprêtement et la présentation croisée de peptides antigéniques exogènes sur des molécules du CMH de classe I. Suite à la dégradation d'un pathogène dans sa lumière, le phagosome pourrait exporter, par exemple par rétrotranslocation via le translocon Sec61, des peptides vers le cytoplasme (Kovacsovics-Bankowski & Rock, 1995), et ainsi leur permettre d'accéder au protéasome pour leur apprêtement final. Ces peptides seraient alors transportés vers la lumière du phagosome via TAP1 et TAP2 où ils seraient chargés sur des molécules de CMH de classe I. H, hydrolases. Image adaptée de (Houde *et al*, 2003).

9. Le protéome du phagosome

La biogénèse des phagolysosomes est sans contredit un processus complexe. Elle implique une variation dynamique de la composition protéique du phagosome menant à sa maturation graduelle. Caractériser et suivre la variété des mécanismes moléculaires impliqués lors de la phagocytose peut sembler une tâche ardue et exigeante, mais toutefois possible depuis l'émergence du profilage protéomique à haut débit. L'utilisation de cette approche exige toutefois une organelle d'un niveau de pureté qui surpasse généralement les capacités d'isolation des protocoles de la biologie cellulaire. Néanmoins, la purification de phagosomes formés à partir de microbilles de polystyrène s'est avérée très efficace et cruciale dans le profilage protéomique des phagosomes. Etant donné la très faible densité des billes de polystyrène comparativement aux différents compartiments intracellulaires, l'internalisation de microbilles de polystyrène par des macrophages permet d'isoler, par une simple centrifugation isopycnique sur gradient de sucrose, des phagosomes de microbilles de polystyrène homogènes d'un niveau de pureté surpassant toute préparation d'organelles isolées (Ulsamer *et al*, 1971). En variant les temps d'internalisation et de maturation des billes internalisées, il devient possible d'obtenir différents aperçus de l'état de maturation du phagosome dans le temps et ainsi suivre la dynamique des processus cellulaires impliqués lors de la biogénèse des phagolysosomes.

Bien qu'elle possède une résolution limitée, l'application de l'électrophorèse 2D à haute résolution s'est avérée un excellent point de départ dans la caractérisation protéomique de phagosomes de microbilles de polystyrène (Burkhardt *et al*, 1995; Desjardins *et al*, 1994a; Desjardins *et al*, 1994b; Garin *et al*, 2001). En identifiant quelques centaines de protéines, ces études ont divulgué la forte complexité des différents processus cellulaires impliqués lors de la phagocytose. Plus précisément, le profilage protéomique de ces études a révélé la présence de petites GTPases impliquées dans la régulation des fusions membranaires, de protéines de surface cellulaire, de sous-unités de la V-ATPase, de machineries de fusions et de fissions

vésiculaires, d'hydrolases, de marqueurs lysosomaux, de marqueurs d'endosomes et d'exosomes, de nombreuses protéines du cytosquelette, de protéines du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (**voir Figure 10**). Inspirés par ces publications, plusieurs groupes ont aussi entrepris la caractérisation de la phagocytose chez diverses espèces telles que les amibes *Dictyostelium discoideum* et *Entamoeba histolytica*, en plus de l'insecte *Drosophila melanogaster* (Gotthardt *et al*, 2006; Gotthardt *et al*, 2002; Okada *et al*, 2005; Okada *et al*, 2006; Ramet *et al*, 2002). En criblant par ARN interférent une lignée de phagocytes (S2) provenant de la drosophile, le groupe d'Alan Ezekowitz a pu identifier 34 gènes impliqués dans le processus d'internalisation de la phagocytose (Ramet *et al*, 2002). Bien que certaines de ces protéines identifiées fussent préalablement connues pour leur rôle dans la phagocytose, cette étude a particulièrement permis la découverte d'un nouveau récepteur, PGRP-LC, impliqué dans l'internalisation spécifique de bactéries Gram négatif. Innovatrice, cette étude a démontré la puissance de l'application de l'ARN interférent à haut débit dans l'étude systémique des processus moléculaires impliqués lors de la phagocytose.

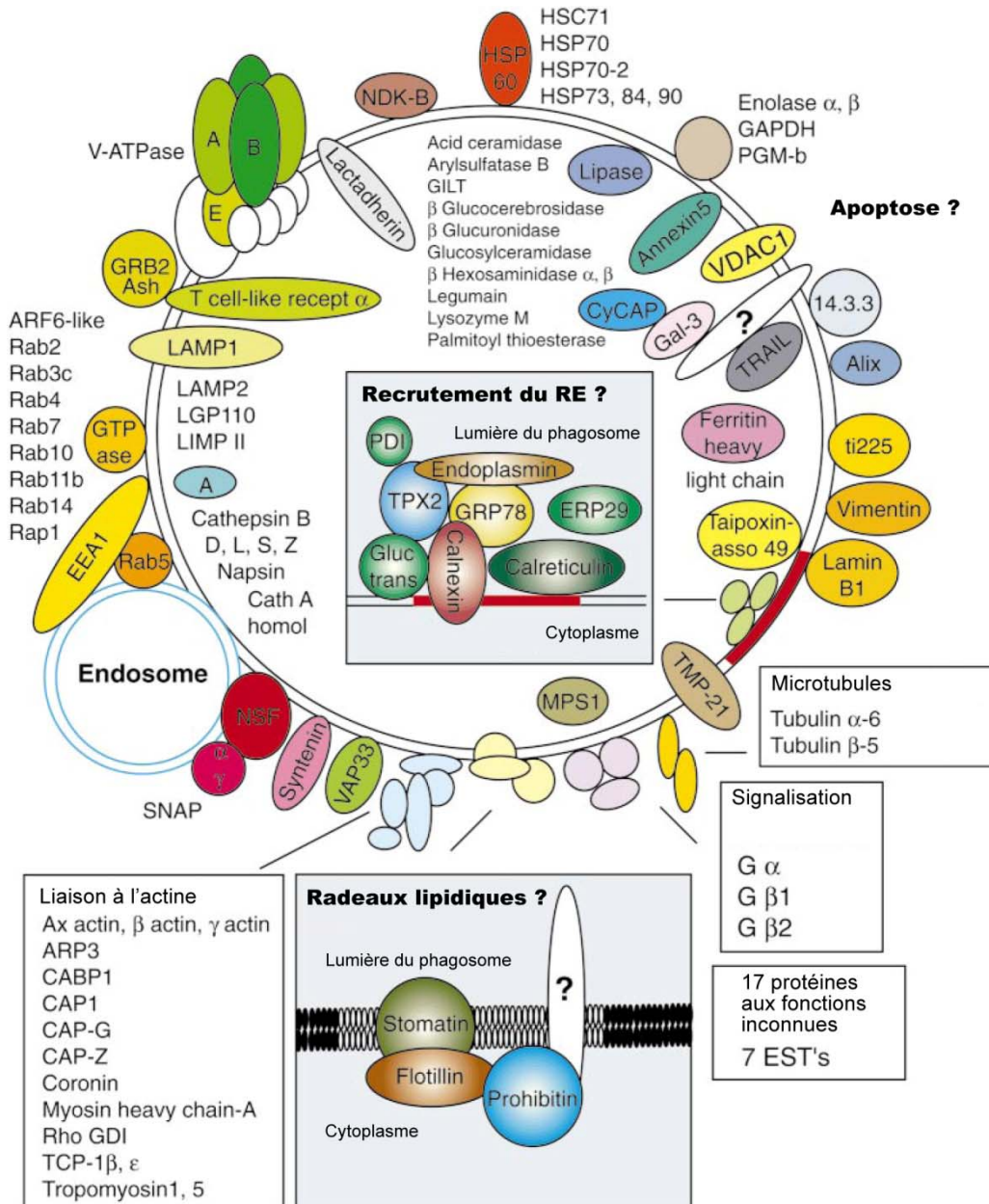


Figure 10. Le premier phagosome virtuel publié en 2001.

Les protéines identifiées au cours de cette étude sont présentées selon leur potentiel fonctionnel et interactif au sein du phagosome. Image adaptée de (Garin *et al*, 2001).

L'arrivée de nouveaux spectromètres de masse beaucoup plus sensibles ont permis d'approfondir en détail le profil moléculaire du phagosome en identifiant de nombreuses protéines phagosomales supplémentaires (Boulaïs *et al*, 2010; Brunet *et al*, 2003; Jutras *et al*, 2008; Stuart *et al*, 2007; Trost *et al*, 2009). En se basant sur une

approche protéomique, le groupe de Descoteaux a pu investiguer le rôle de la protéine kinase $C\alpha$ (PKC α) dans la régulation de la biogénèse des phagolysosomes (Ng Yan Hing *et al*, 2004). Lors de cette étude, des phagosomes isolés de macrophages surexprimant un dominant-négatif d'un mutant PKC α déficient ont démontré une inhibition du recrutement des marqueurs tardifs Rab7, cathepsine D et cathepsine S, comparativement aux phagosomes isolés de macrophages contrôles. Ces données qui indiquent que la PKC α joue un rôle dans la biogénèse des phagolysosomes illustrent bien que l'élaboration de modèles biologiques, à partir de données protéomiques, peut s'avérer efficace dans l'étude des mécanismes moléculaires impliquées lors de la phagocytose.

9.1 Le réticulum endoplasmique et la phagocytose

Bien que scientifiquement contradictoire, l'application du profilage protéomique à haut débit pour la caractérisation moléculaire du phagosome repose sur une approche dépourvue d'hypothèses de départ et nécessite l'élaboration de modèles biologiques hypothétiques qui sont subséquemment validés par diverses techniques de la biologie cellulaire. Innovatrice, cette approche protéomique s'est révélée être un des rares et grands succès du domaine de la protéomique (Huber *et al*, 2003). D'abord perçus en tant que contaminants, l'identification par protéomique de protéines associées au réticulum endoplasmique, à partir de phagosomes purifiés, a mené à la découverte surprenante du phénomène participatif du réticulum endoplasmique à la phagocytose. En utilisant diverses techniques de biologie cellulaire, il fut démontré que le réticulum endoplasmique fusionne avec la membrane plasmique sous la coupe phagocytaire, afin de fournir la membrane nécessaire à la formation de phagosomes naissants et/ou d'induire une élévation subite de Ca^{2+} localisée essentielle à la phagocytose (Cuttell *et al*, 2008; Gagnon *et al*, 2002). Il fut par la suite démontré que le recrutement du réticulum endoplasmique serait potentiellement régulé par la SNARE Sec22b, qui est impliquée lors de certains événements de fusion entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique, et des SNAREs cibles

SSO1/Sec9c (McNew *et al*, 2000). Observé chez diverses espèces telles que l'amibe *Dictyostelium*, la drosophile, la souris et l'humain (Burlak *et al*, 2006; Dieckmann *et al*, 2008; Gagnon *et al*, 2002; Garin *et al*, 2001; Gotthardt *et al*, 2006; Gueirard *et al*, 2008; Stuart *et al*, 2007; Trost *et al*, 2009), ce mécanisme conservé aurait permis au phagosome d'acquies une fonction supplémentaire chez les vertébrés à mâchoire dans la présentation croisée d'antigènes exogènes sur des molécules de CMH de classe I (Guernonprez *et al*, 2003; Houde *et al*, 2003).

10. Objectifs et méthodologie des travaux

Le but des deux projets présentés dans cette thèse consistait à développer des méthodes d'analyses à haut débit pour identifier les protéines ou « joueurs » constitutifs du phagosome et ainsi approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les diverses fonctions de cette organelle. Identifier et définir la grande diversité des protéines constitutives d'une organelle par des méthodes classiques de biologie cellulaire s'avère un travail ardu et de longue durée. Toutefois, depuis l'arrivée de la protéomique, il est désormais possible de caractériser très rapidement les protéines d'un échantillon complexe (Brunet *et al*, 2003; Garin *et al*, 2001). Lorsqu'identifiée, ces protéines sont analysées dans le but de développer de nouveaux modèles conceptuels qui sont vérifiés à l'aide de diverses techniques de biologie cellulaire. Innovatrice, cette méthode fut notamment appliquée lors de la découverte de la participation du réticulum endoplasmique au processus de la phagocytose et par la suite de l'implication du phagosome au niveau de la présentation croisée (Gagnon *et al*, 2002; Houde *et al*, 2003).

La biologie systémique est une approche interdisciplinaire de la biologie qui élargit le champ de la biologie moléculaire pour étudier des ensembles d'éléments en interaction les uns avec les autres, c'est-à-dire des systèmes de molécules (ADN, protéines, complexes moléculaires, etc.). Pour observer simultanément tous ces systèmes d'éléments, la biologie systémique a recours aux différents domaines de la biologie à haut débit (génomique, transcriptomique, protéomique, etc.). Face à ce déluge d'information, sa première vocation est de réaliser l'intégration des données dans des modèles conceptuels. L'objet de tels modèles est d'expliquer les mécanismes de fonctionnement des systèmes étudiés et de prédire leur comportement ainsi que leur évolution. L'élaboration de modèles conceptuels, à partir de données protéomiques, s'est avérée une stratégie fort efficace dans la caractérisation fonctionnelle de la phagocytose. Elle requiert cependant une annotation rigoureuse des protéines identifiées par protéomique, en plus de connaître de manière exhaustive ces protéines pour le développement de modèles conceptuels. Avec l'arrivée des

nouveaux spectromètres de masse qui sont encore plus sensibles et efficaces, il est désormais possible d'identifier environ 2000 protéines au niveau du phagosome de la souris. Conceptualiser 2000 protéines s'avère une tâche colossale qui dépasse nettement les capacités intellectuelles de tout chercheur. Pour pallier à cette situation, nous avons développé une base de données informatique (MySQL) contenant l'ensemble des données protéomique générées par les usagés de notre laboratoire. Plus précisément, cette base de données est un système destiné à organiser, stocker et récupérer de grandes quantités de données en effectuant des inférences (requêtes) sur celle-ci. De plus, il est possible d'y ajouter d'autres données pertinentes à l'annotation protéique (ex. : Gene Ontology, Uniprot, Ensembl!, PFAM, etc.) qui seront inférées en relation aux données protéomique. De cette façon, le chercheur peut rapidement filtrer et regrouper l'ensemble des données protéomique du laboratoire et ce, partout à travers le monde, en plus de les annoter avec efficacité. Cette technologie fut notamment utilisée et mise à contribution au cours des articles III, V et VI mis en annexe de cette thèse.

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS

11. Article I

A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome

L. M. Stuart^{1,2,*}, J. Boulais^{3,*}, 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^{1,6}

Nature 445, 95-101 (4 January 2007).

N.B. *Veillez noter qu'en raison de leur taille trop volumineuse que les tables de données supplémentaires **ST1**, **ST6**, **ST7** et **ST8** ne sont pas incuses dans cet ouvrage. Toutefois, ces données peuvent être téléchargées en ligne à cette adresse : (www.nature.com/nature/journal/v445/n7123/supinfo/nature05380.html).*

11.1 Résumé

Les phagocytes jouent un rôle critique dans le remodelage tissulaire lors de l'embryogenèse en plus d'être des effecteurs clés de la défense immunitaire^{1,2}. Lors de la phagocytose, les particules sont internalisées dans des phagosomes, une organelle à partir de laquelle divers processus immunitaires, tels que la destruction microbienne et la présentation antigénique, sont initiés³. Certains pathogènes ont développé des mécanismes pour esquiver le système immunitaire et persistent sans être détectés à l'intérieur des phagocytes. Il devient par conséquent essentiel de connaître en détail ce processus, afin de comprendre les divers aspects de l'immunité innée et acquise. Malgré le rôle crucial effectué par les phagosomes dans l'immunité, peu de détails sont connus à propos de leurs composants et de leurs organisations. Lors de ce papier, nous présentons une analyse protéomique à partir de phagosomes isolés de cellules dérivées de la mouche à fruit *Drosophila melanogaster*, en plus d'adresser la dynamique des interactions complexes entre les protéines inhérentes à cette organelle et leur implication dans l'internalisation de particules. L'analyse protéomique a identifié 617 protéines potentiellement associées aux phagosomes de la drosophile. Ces protéines ont été organisées selon leurs interactions protéine-protéine dans le but de générer l'interactome du phagosome, un réseau détaillé des interactions protéine-protéine de ce compartiment sous-cellulaire. Ces réseaux ont permis de prédire la composition, ainsi que les ensembles de protéines en coopération pour une fonction définie du phagosome. La contribution de chaque protéine et complexe impliqués lors de l'internalisation de bactéries fut testée par ARN interférence, permettant d'identifier des composants préalablement connus de la machinerie phagocytaire. De plus, la prédiction et la validation des régulateurs de la phagocytose, tel que l'« exocyst »⁴, un complexe macromoléculaire nécessaire pour l'exocytose méconnu pour son implication dans la phagocytose, nous a permis de valider cette stratégie. En générant ce modèle, nous démontrons la puissance de cette application dans l'étude des organelles et des processus cellulaires complexes. De plus, nous espérons que ce modèle détaillé du phagosome procurera un nouveau cadre dans l'étude des interactions hôte-pathogène et de l'immunité innée.

A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome

L. M. Stuart^{1,2,*}, J. Boulais^{3,*}, 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^{1,6}

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

* **These authors contributed equally.**

Correspondence to: L. M. Stuart^{1,2}

Received 13 July 2006; Accepted 24 October 2006; Published online 6 December 2006.

Nature 445, 95-101 (4 January 2007)

11.2 Abstract

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 system 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.

11.3 Results and discussion

Proteomic analysis of the mammalian phagosome has highlighted the complexity of this subcellular organelle^{5,6,7}. 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 gel electrophoresis 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^{5,6,7}, 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 (unidentified proteins) 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, 12, 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 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, 18, 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 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 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.

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, 25, 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.

11.4 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).

11.4.1 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 $(n_f/n)/(N_f/N)$, where n_f is phagosome proteins in a specific category, n is the total number of phagosome proteins, N_f 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>).

11.5 References

1. Greenberg, S. & Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 136-45 (2002).
2. Aderem, A. & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623 (1999).
3. Stuart, L. M. & Ezekowitz, R. A. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22, 539-50 (2005).
4. TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D. & Novick, P. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15, 6483-94 (1996).
5. Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3, 280-91 (2003).
6. Desjardins, M. & Griffiths, G. Phagocytosis: latex leads the way. *Curr Opin Cell Biol* 15, 498-503 (2003).
7. Garin, J. et al. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152, 165-80 (2001).
8. Pearson, A. M. et al. Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect* 5, 815-24 (2003).
9. Ramet, M. et al. *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* 15, 1027-38 (2001).
10. Ge, H., Walhout, A. J. & Vidal, M. Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet* 19, 551-60 (2003).
11. Vidal, M. Interactome modeling. *FEBS Lett* 579, 1834-8 (2005).
12. Bader, J. S. Greedily building protein networks with confidence. *Bioinformatics* 19, 1869-74 (2003).
13. Bader, J. S., Chaudhuri, A., Rothberg, J. M. & Chant, J. Gaining confidence in high-throughput protein interaction networks. *Nat Biotechnol* 22, 78-85 (2004).
14. Uetz, P. & Finley, R. L., Jr. From protein networks to biological systems. *FEBS Lett* 579, 1821-7 (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, 2120-6 (2001).
16. Asthana, S., King, O. D., Gibbons, F. D. & Roth, F. P. Predicting protein complex membership using probabilistic network reliability. *Genome Res* 14, 1170-5 (2004).
 17. Cox, D. et al. Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol* 4, 469-77 (2002).
 18. Gold, E. S. et al. Amphiphysin II α , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* 12, 285-92 (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, 2007-12 (2005).
 20. Ramet, M., Manfrulli, 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, 644-8 (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. Bajno, L. et al. Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* 149, 697-706 (2000).
 23. 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, 1143-50 (2003).
 24. 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 U S A* 97, 680-5 (2000).
 25. Zhang, X. M., Ellis, S., Sriratana, A., Mitchell, C. A. & Rowe, T. Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 43027-34 (2004).
 26. Clandinin, T. R. Surprising twists to exocyst function. *Neuron* 46, 164-6 (2005).
 27. Mehta, S. Q. et al. Mutations in *Drosophila* sec15 reveal a function in neuronal

- targeting for a subset of exocyst components. *Neuron* 46, 219-32 (2005).
28. Prigent, M. et al. ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J Cell Biol* 163, 1111-21 (2003).
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, 677-88 (1994).

11.6 Figure legends

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 hybrigenics 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.

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.

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 \pm 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.

Supplementary Figure SF1. Schema of systems biology strategy used to analyse the *Drosophila* phagosome. The schema of the systems biology strategies used to define a model of phagocytosis. The proteomic list was used to generate protein-protein interactions maps, predicting the higher order organisation of the phagosome and identifying clusters of proteins representing functional biomodules or protein complexes. Additionally, combining manual annotation data with the Gene Ontology (GO) classification identified biomodules. RNAi was used to silence the components defined from the proteomic list and phagocytosis assays performed to identify those proteins and complexes involved specifically in engulfment.

Supplementary Figure SF2. Assessment of *Drosophila* S2 phagosome purity. a - c, 2 Transmission EM of phagosome purification. Phagosomes were isolated from *Drosophila* S2 cells that had been allowed to internalise latex beads (arrows) (**a**) and purified from the 4 post-nuclear supernatant (**b**) using a differential sucrose gradient to yield highly enriched phagosome preparations (**c**). **d**, Western blots of purified phagosomes were probed for the 6 phagosome/endosome marker *Drosophila* Rab5 and nuclear membrane marker Lamin Dm. (Total cell lysate were run for control.)

Supplementary Figure SF3. 2-dimensional gel electrophoresis assessment of

phagosome purity in *Drosophila* S2 cells. Total cell lysates (TCL) generated from [35S]-methionine labelled S2 cells were run on 2-dimensional gel electrophoresis and stained by silver stain (**a**) or subjected to autoradiography (**b**) demonstrating efficient methionine incorporation. (**c**) Phagosomes were isolated from unlabelled *Drosophila* S2 cells by allowing cells to first bind latex beads for 30 minutes, washed and phagocytosis allowed to continue for a further 1 hour chase. The protein complement of isolated phagosomes was defined on using 2-d gel electrophoresis and silver stain and demonstrate a marked difference in protein distribution and abundance than seen in TCL. To identify possible contaminants phagosomes two methods were used. **d**, Phagosomes were isolated from unlabelled S2 cells and then mixed with total cell lysate (TCL) from methionine-[35S] labelled cells that had not seen latex beads. Phagosomes were reisolated on a sucrose gradient and contaminating proteins (as identified as radiolabelled proteins in these mixing experiments) were detected by 2-d gel electrophoresis and autoradiography. When the 2-d gel pattern from TCL (**a and b**) was compared to the proteins that bound non-specifically to isolated phagosomes < 30 proteins could be identified as potential contaminants using this method. **e**, Phagosomes were generated in unlabelled S2 cells and mixed with methionine-[35S] labelled cells S2 cells that had not seen latex beads. Phagosomes were isolated from the blend of cells and contaminating proteins (as identified as radiolabelled proteins in these mixing experiments) were detected by 2-d gel electrophoresis and autoradiography. Importantly, the 2-d patterns in **d**) and **e**) did not have the same distribution as the high abundance proteins in TCL or phagosomes militating against the detected contamination being simply the most abundant proteins in the preparations.

Supplementary Figure SF4. Assessment of organelle contamination using J774.

The methodology was first validated using mammalian J774 macrophages and Western blotting. In this system the presence of contaminating organelles could be detected using antibodies that were not available in the *Drosophila* system. The following antibodies were used: Histone H3 (nucleus), Hsp90 (cytoplasmic/nucleus), Hsp60 (mitochondria), Tim23 (mitochondria), MG160 (Golgi), TGN38 (Golgi), β -actin (cytoskeletal), GAPDH (cytoplasm), Transferrin receptor (TfR) (plasma membrane/recycling endosomes), calnexin (ER), Lamp1 (lysosome) and flotillin 1 (late endosome/lysosome). Total cell lysates and phagosomes were run for comparison.

Supplementary Figure SF5. Bioinformatic identification of functional biomodules using gene ontology classifications GoMiner.

a, GO classifications was used to identify functional groups enriched within the phagosome. A screen shot of the Directed Acyclic Graph generated by GoMiner of cell component enrichment is shown as an example. Categories enriched more than 1.5-fold with flagged genes are colour-coded red; those depleted more than 1.5-fold are blue. The rest of the categories are gray. These data were used to generate *Supplementary Table ST2-4* and the interactive DAG files available at <http://bostonconnexion.free.fr/phagosome/>.
b, The interaction maps were redefined by GO to define functional biomodules and demonstrate clustering of genes in the interactome by GO using cell component, biological process and molecular function. Each vertex colour represents a different GO classification. Higher resolution maps with gene names are available at <http://bostonconnexion.free.fr/phagosome/>.

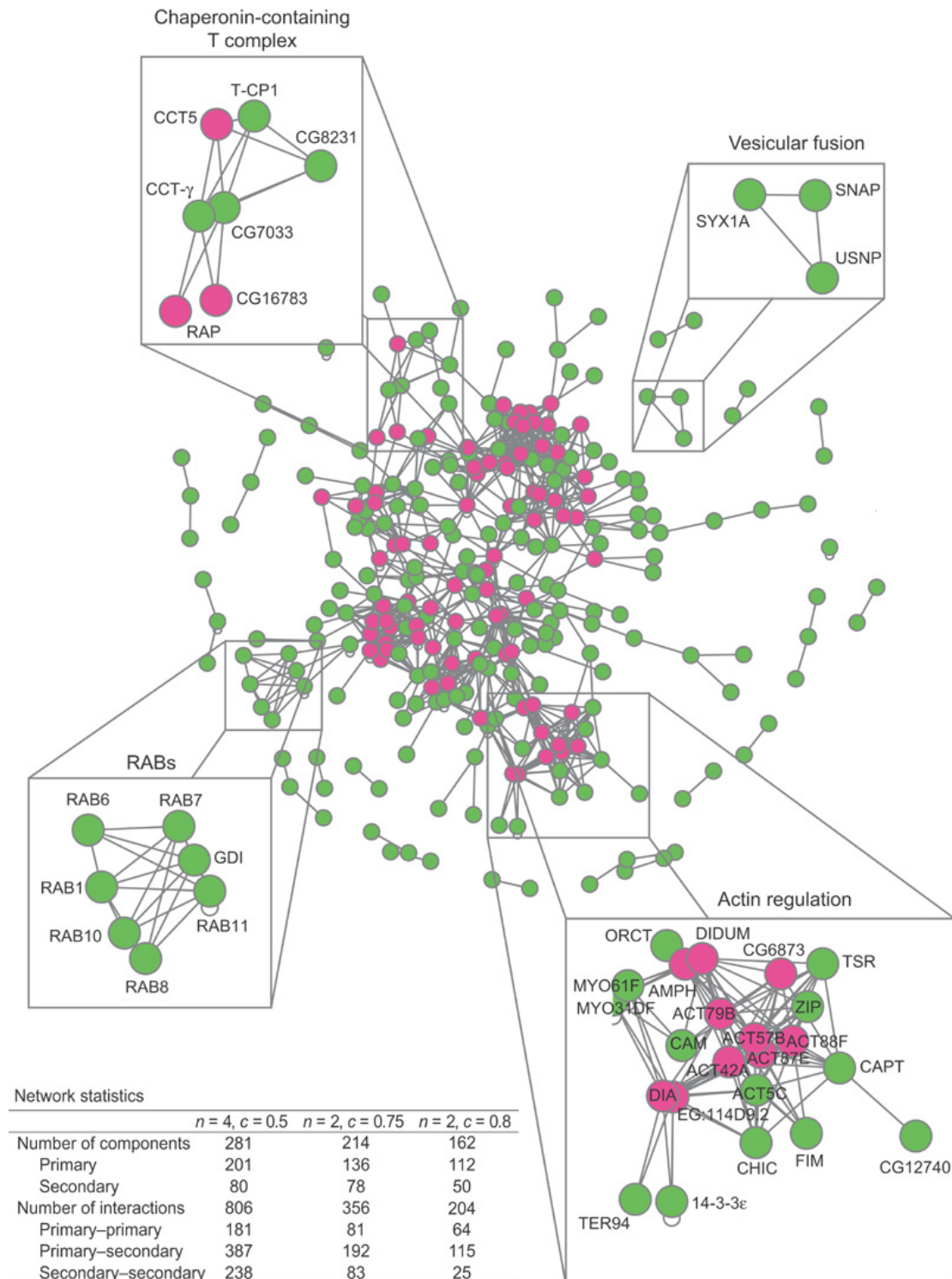


Figure 1: Generation of the ‘phagosome interactome’.

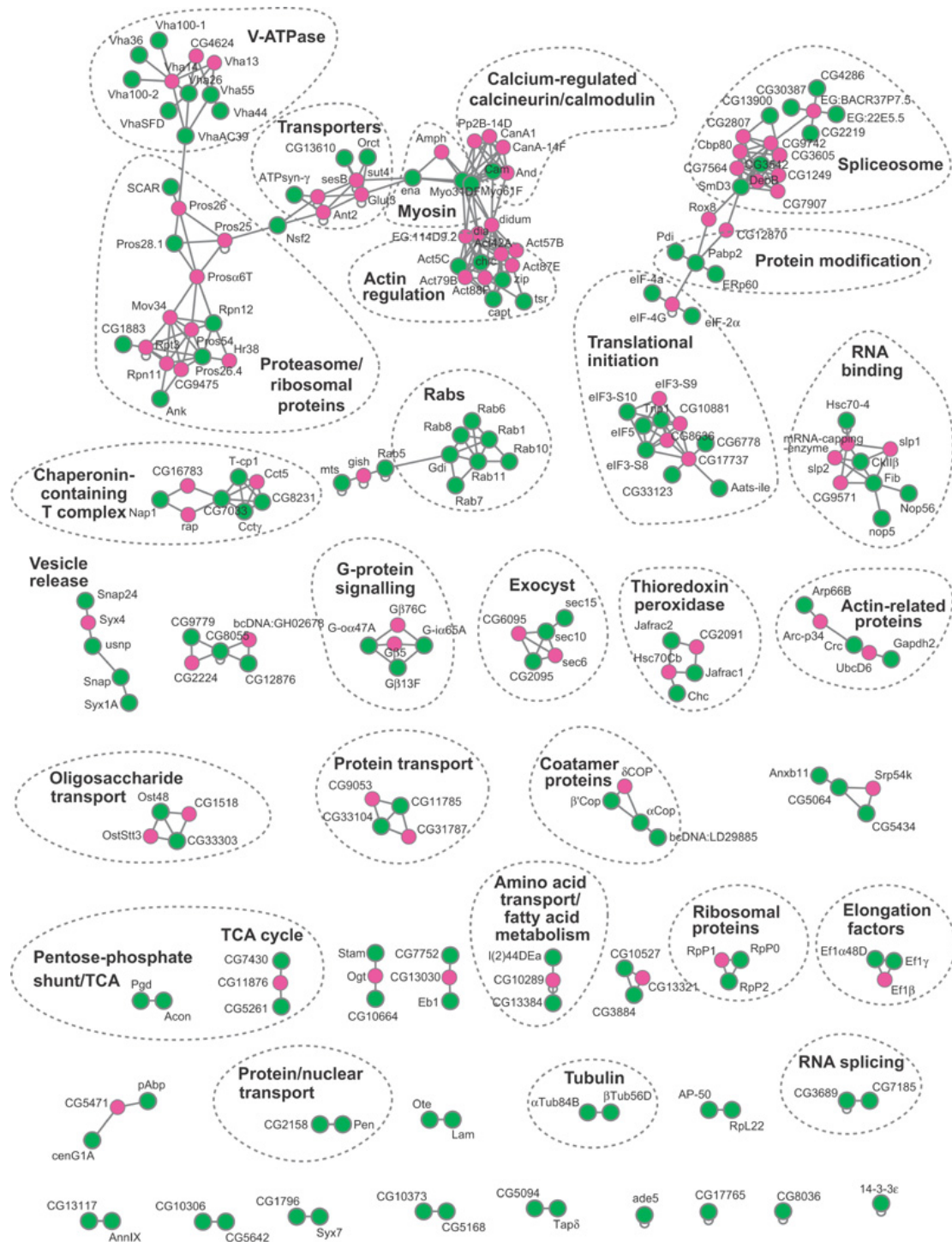


Figure 2: Optimized phagosome networks.

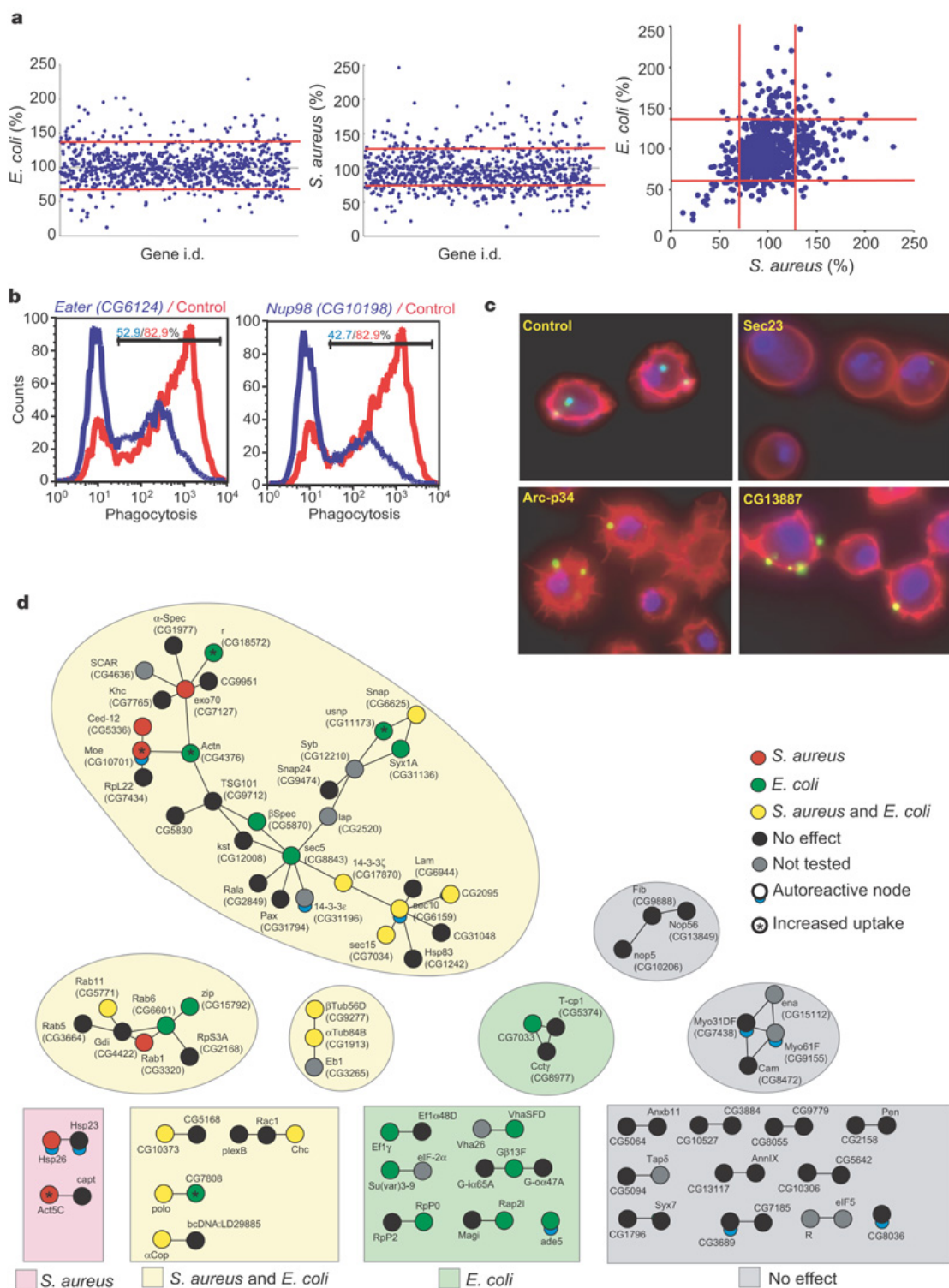


Figure 3: Functional genomics to identify protein complexes and components involved in engulfment.

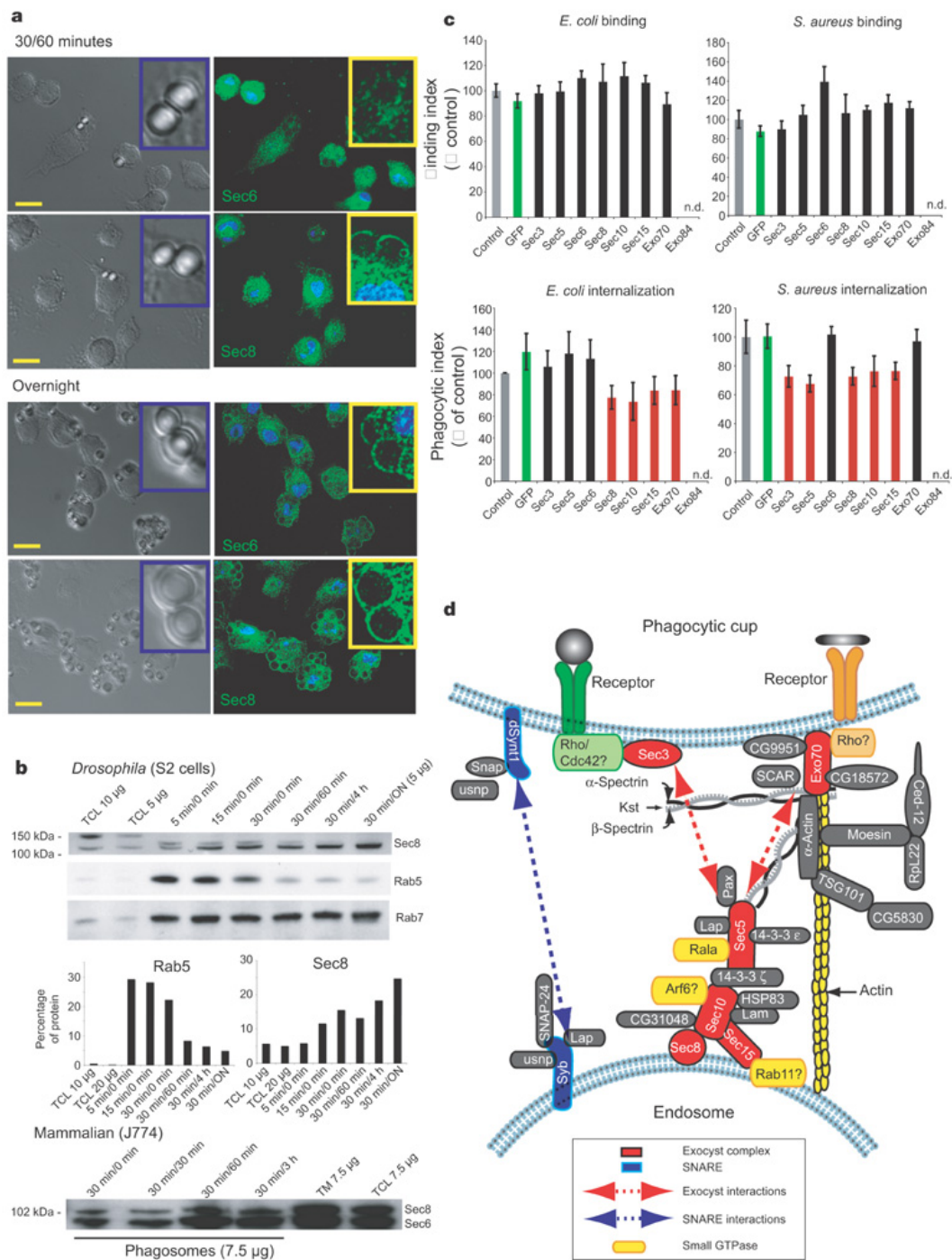
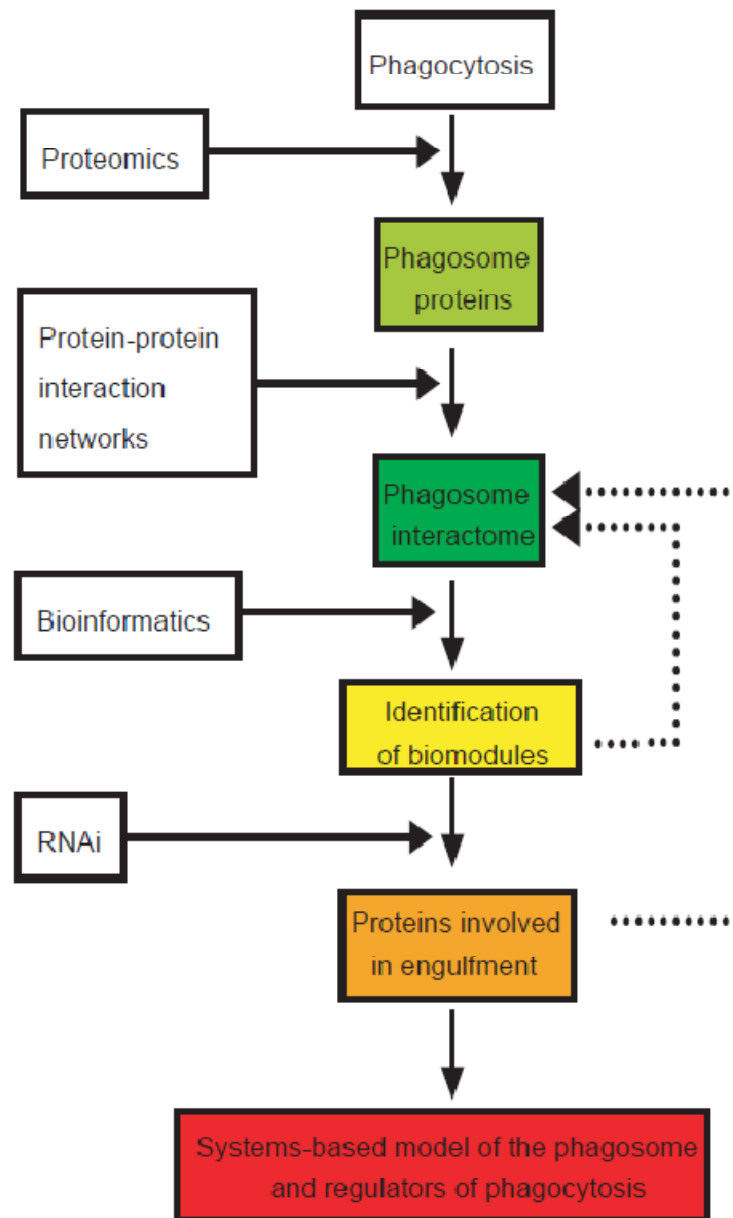
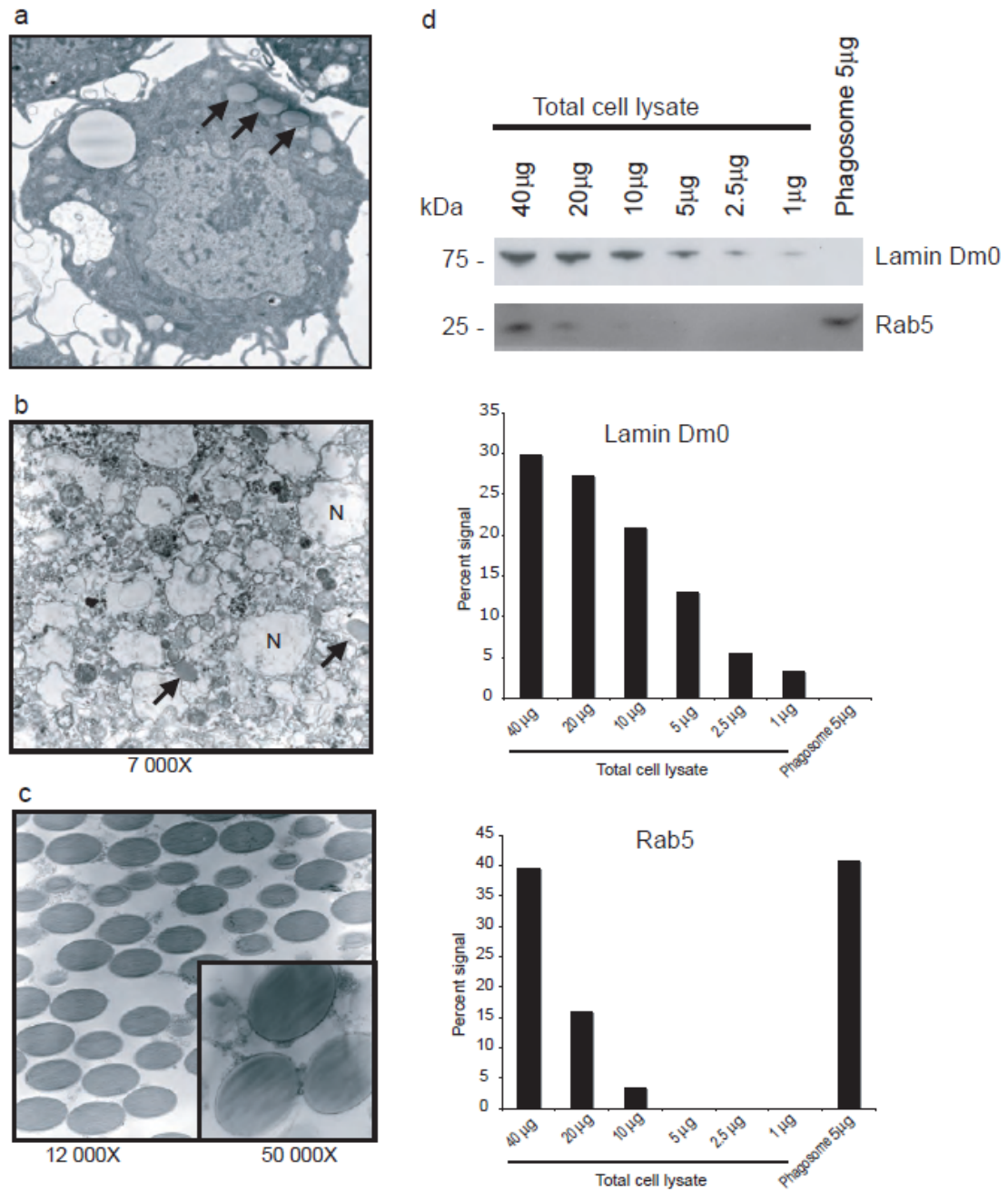


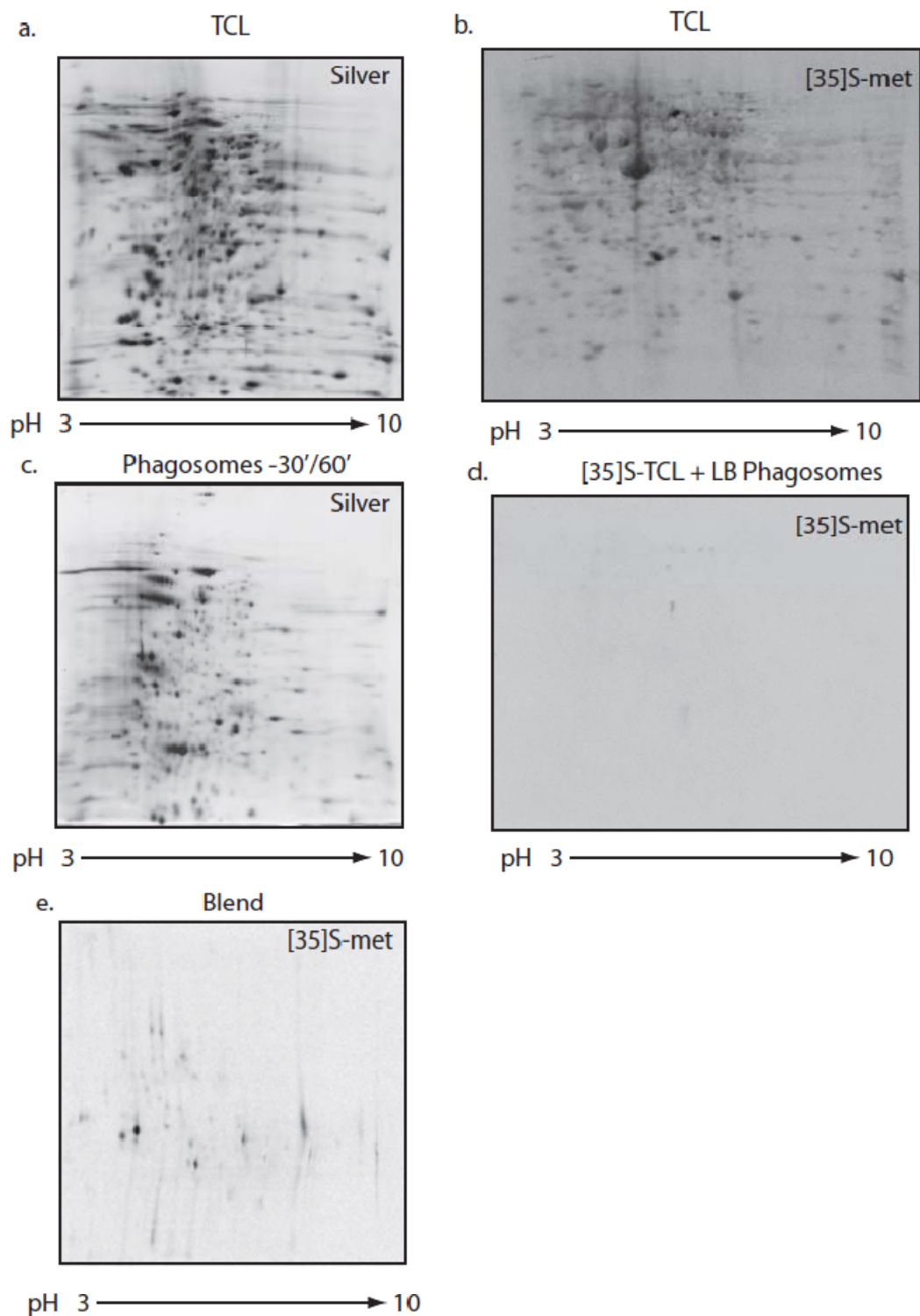
Figure 4: Identification of the exocyst as a functional component of the phagosome.



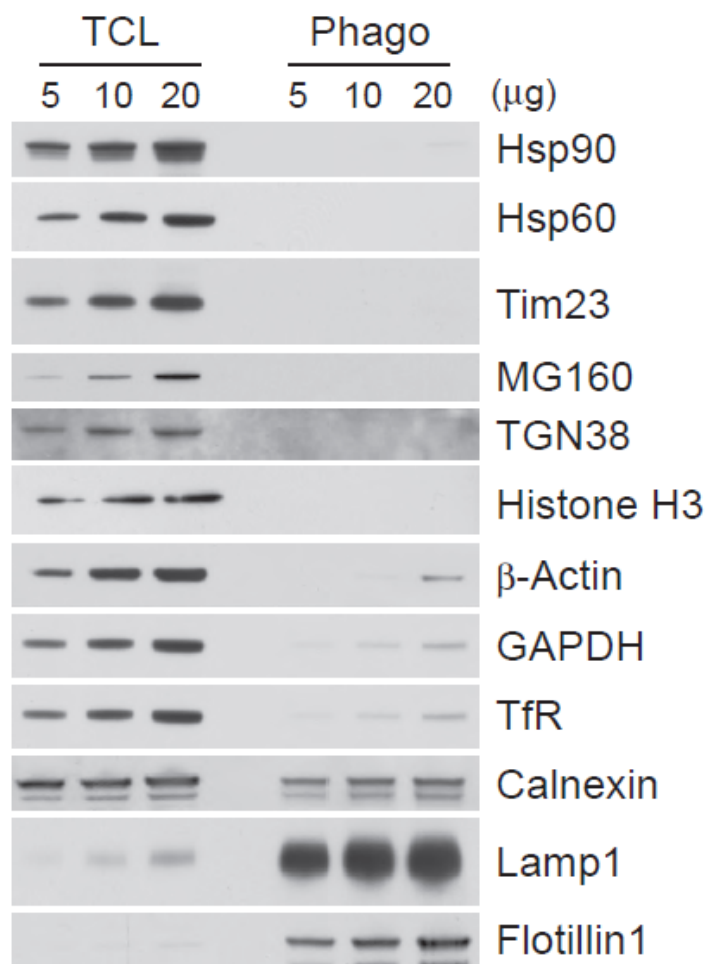
Supplementary Figure SF1. Schema of systems biology strategy used to analyse the *Drosophila* phagosome.



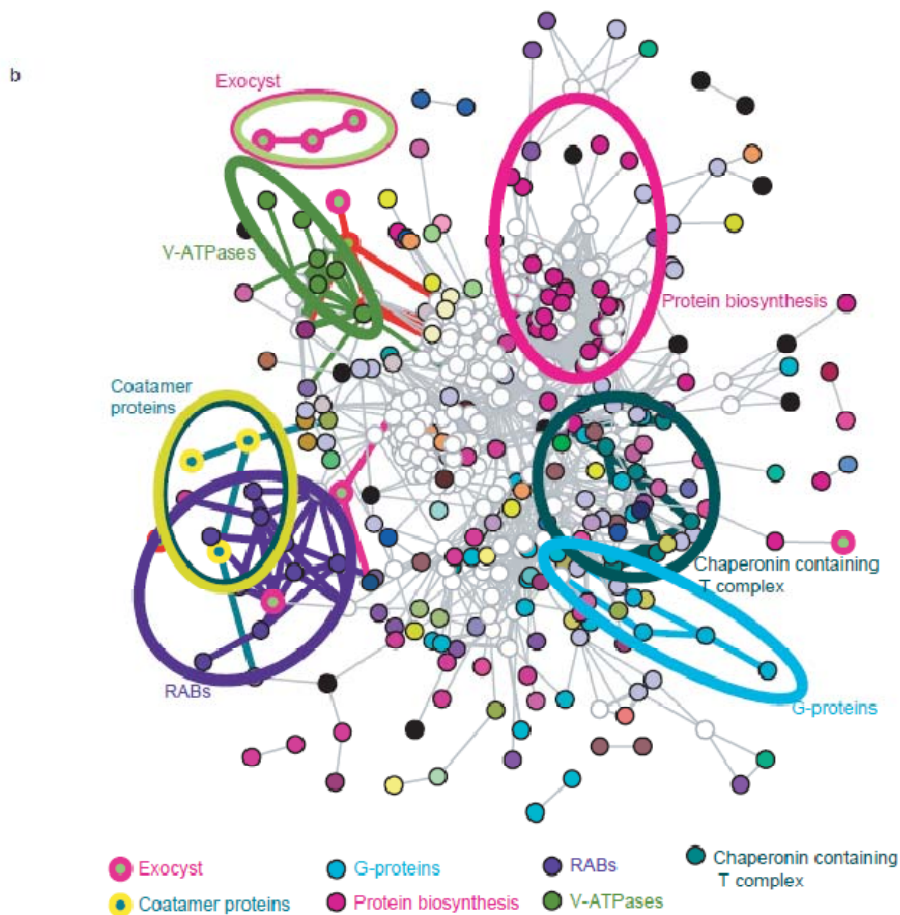
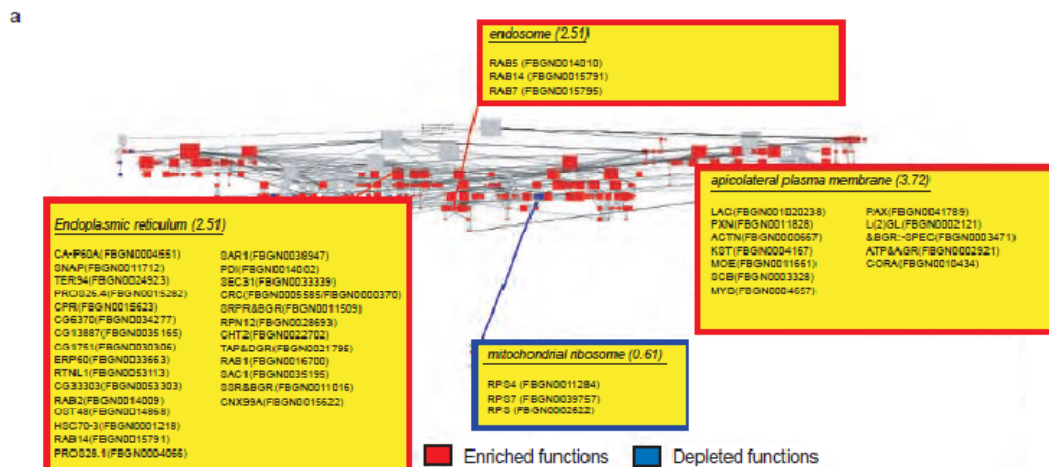
Supplementary Figure SF2. Assessment of *Drosophila* S2 phagosome purity.



Supplementary Figure SF3. 2-dimensional gel electrophoresis assessment of phagosome purity in *Drosophila* S2 cells.



Supplementary Figure SF4. Assessment of organelle contamination using J774.



Supplementary Figure SF5. Bioinformatic identification of functional biomodules using gene ontology classifications GoMiner.

11.7 Supplementary Information

11.7.1 Supplementary discussion

11.7.1.1 Validation of phagosome purity

Numerous approaches were used to validate the purity of phagosomes prepared by the sucrose gradient method. First we isolated phagosomes from *Drosophila* S2 cells and used transmission EM to examine these preparations. These data confirmed that we had greatly enriched for phagosomes when compared to the mix of organelles in prepurification supernatants (*Supplementary Figure 1a-c*). We next determined the amount of contamination by other organelles. For this purpose preparations were analysed by Western blotting and the presence of selected organelle markers in the cell lysate and the isolated phagosomes were compared using antibodies specific to the *Drosophila* proteins. These data demonstrated enrichment of the phagosome/endosome marker Rab5 and depletion of the nuclear marker Lamin-Dm0 (*Supplementary Figure 1d*) indicating that broken nuclei were unlikely to contaminate our phagosome preparations. Since very few antibodies that recognize *Drosophila* proteins are available, we also extended this type of analysis with J774 cells, a murine macrophage cell line from which we isolated phagosomes using an identical approach. Phagosomes prepared from J774 cells did not contain contamination from the nucleus, Golgi and mitochondria as determined by the absence of histone H3, MG160/TGN38 and Hsp60/Tim23, markers for these respective compartments (*Supplementary Figure SF4*). The presence of the transferrin receptor, calnexin, LAMP1 and flotillin were consistent with the known contribution of the plasma membrane/endosomes, ER and late endosome/lysosomes to the de novo phagosome. Next, to identify if proteins or complexes non-specifically associated with phagosomes after cell lysis or co-purified with the phagosome fraction on the sucrose gradient we added radiolabelled total cell lysates from [³⁵S]-methionine metabolically labelled S2 cells to phagosomes prepared from unlabelled

cells. Phagosomes were repurified from this mixture and the amount of contamination determined by assessing [³⁵S]-methionine activity using 2-dimensional gel electrophoresis and autoradiography (*Supplementary Figure SF3d*). Using this approach we were able to identify less than 30 proteins that copurified with phagosomes or associate with them after lysis. Finally to determine if proteins might associate with phagosomes non-specifically during cell lysis we generated phagosomes in unlabelled S2 cells and mixed these cells with [³⁵S]-methionine S2 cells prior to lysis. Phagosomes were prepared from this blend and contaminants identified as [³⁵S]-methionine labelled proteins contaminating these preparations (*Supplementary Figure SF3e*). Taken together these data indicate that our method of purification highly enriched for phagosomes and that very few proteins present were contaminants (estimated contamination <5%). Importantly, potential contaminating proteins identified on the 2-d gels did not correspond to high abundance proteins found in the TCL, militating against these being identified simply because of their abundance.

11.7.1.2 Interactome analysis

Numerous potential complexes or functional biomodules were identified within the interactome. As examples the interactome clustered proteins into modules that included Rab-Gdi interactions, an ENA/VASP-myosin-calmodulin interaction complex and a tubulin complex. The networks also predicted interactions between components of the chaperonin containing T-complex¹, a cytosolic chaperone known to assist the folding of actin and tubulin that had not previously been known to play a role in phagocytosis. Within a large complex containing 31 proteins (*Figure 3d*) (including α -actinin, actin binding proteins, vesicular docking proteins and SNAREs) the interactome predicted associations between these phagosome components and the spectrosome/fusome^{2, 3}, a cytoplasmic organelle classically associated with germ-cells in *Drosophila* and assembled from cytoskeletal components and membrane

vesicles. This structure is believed to be a modification of smooth endoplasmic reticulum (ER) and is thought to act as a link from the ER that fosters intercellular communication during germline cyst formation. In the context of phagocytosis, one intriguing possibility is that a ‘modified fusome’ provides the structural basis for any communication between the ER and the phagosome^{4,5}.

An additional advantage of these protein-protein interaction networks was to facilitate classification of unknown genes by association with genes of known function. Based on topological interconnectivity with the major phagosome clusters involved in engulfment, we identified five unknown proteins present in our proteomics data set that we predicted to have a role in phagocytosis. Silencing three of these five genes (*CG2095*, electronically annotated as a component of the exocyst complex that was predicted to interact with Sec10, *CG31048*, a putative small GTPase with regulatory/interacting protein activity and *CG7033*, a putative component of the chaperonin containing Tcomplex) reduced phagocytosis of *E.coli* by >25%, confirming our hypothesis and demonstrating the predictive power of the protein-protein interaction networks (*Figure 3d*). An additional prediction that might be made from these networks is that this largest cluster might contain key hub proteins, essential for phagocytosis. In support of this one of the most potent effect seen in our RNAi screen occurred with silencing of Snap (*CG6625*), a protein present in this complex. These data demonstrate the power of combining the interactome with functional genomics to identify the essential components of this complex system.

11.7.1.3 Gene Ontology classification of phagosome proteins

In addition to the protein-protein networks we used bioinformatics as an independent method to classify the functional biomodules within the phagosome. For this purpose proteins were assigned by gene ontology (GO) annotation into cellular component, involvement in specific biological processes and molecular function⁶. Proteins of similar function are believed to be more likely to cluster in protein-protein

networks, providing supportive information of the reliability of a predicted interaction⁷. In concordance with this hypothesis, the phagosome proteins clustered by GO annotation, validating our protein-protein network (*Supplementary Figure SF5*).

We next used bioinformatics to define other potential biomodules associated with the phagosome that might not have been identified by topological criteria and protein clustering in the protein-protein network. The data base mining tool 'GoMiner'⁸, identified a number of functional groups and sub-cellular components present within the phagosome. As an example, the screen shot of the Directed Acyclic Graph (DAG) file for cell component is shown in *Supplementary Figure SF5* and demonstrates that proteins derived from ER, endosome and plasma membrane are all enriched in the phagosome proteome (2.51, 2.51 and 3.72 fold enriched respectively). (The full enrichment datasets are available in the interactive DAG files for molecular function, biological process and cell component at <http://www.massgeneral.org/devimmunol/phagosome/>). To determine if biomodules were truly enriched we used GoMiner to identify groups of proteins that were represented within the phagosome at levels that would not be expected with random sampling of ~6,500 proteins. Groups whose component were enriched, and therefore found at greater frequency than would occur by chance, or depleted if found at lower frequency, can be found in *Supplementary Tables ST2, 3 and 4*. Proteins known to be involved in endocytosis, exocytosis, and organisation of the actin-cytoskeleton were highly enriched ($p < 0.0001$). We considered enriched groups identified by GoMiner that could be validated in our manual annotation or that clustered in the protein networks (Figure 2) as likely to represent true functional biomodules within the phagosome. Consistent with the phagosome interactome, components of the chaperonin containing T complex 1 and the spectroosome/fusome 2 were significantly enriched ($p < 0.0001$) and GoMiner also confirmed the possibility that the phagosome contained components of the protein-translation machinery ($p < 0.0001$). Intriguingly, GoMiner also identified components involved in RNA binding ($p < 0.0001$) and the RNAi silencing complex 9 ($p = 0.0031$). In addition, a number of phagosome

components were assigned to Biocarta signalling pathways, potentially linking it to a variety of signalling cascades (Supplementary Table ST5). These included apoptosis regulation, integrin signalling, the JNK and MAP kinase pathways, and thus support a role for these pathways in host defence.

11.7.1.4 Conclusions and perspectives on phagocytosis

Our systems biology strategy has identified novel roles for many proteins in phagocytosis by their presence in the phagosome. The evidence is particularly compelling for those 28% of proteins identified as playing a functional role in internalisation and those within the phagosome interactome that are predicted to be highly interconnected to these hits in our RNAi screen. However, for those proteins that neither had an effect in our functional screen nor had predicted protein-protein interactions in the phagosome, our data provide no evidence to validate their localisation within the phagosome. It remains a possibility that some of the proteins and biomodules, such as those involved in protein biosynthesis, RNA transport (RNA granules) and the RNA silencing complex, may simply be identified as a consequence of systematic contamination with other subcellular components that might intimately associate with, or co-purify with, phagosomes. Further work is needed to directly localise these proteins to the phagosome¹⁰ and to validate these potentially novel functions of this organelle.

Our functional screen has focused on identifying those proteins involved in the early processes of engulfment. Our data suggest that there are at least two distinct, organism-specific, pathways of uptake. We would suggest that some of this specificity originates as a consequence of ligation of the cell surface receptors such as *Croquemort* and *PGRP-LC* that differentially recognise *S.aureus* and *E.coli* prior to internalisation^{11, 12}. A recent genome wide screen in *Drosophila* identified a SRB1 family member, *Pes*, as a cell surface receptor for mycobacteria¹³ and we have

recently identified another important cell surface receptor for bacteria, *Eater*¹⁴. Interestingly, all of these receptors are absent from our proteomic list and it is likely that many surface receptors only transiently associate with the phagosome or are recruited only with specific cargo.

While there is significant overlap between our findings and those from genomewide screens^{13, 15-17}, our approach has significant advantages. Our original proteomics screen greatly enriched our candidates, increasing the hit rate of our secondary RNAi screen. Furthermore, when combined with the phagosome interactome our approach has allowed us to identify protein complexes that might act as novel regulators of phagocytosis and provided new insights into how the molecules within the phagosome are organised and cooperate to mediate the complex process of pathogen internalisation. In support of our approach, recent work studying uptake of *C.albicans*¹⁷ identified some of the complexes identified within our interactome. Furthermore, 22.8% of the positive hits in that screen were also identified in the phagosome proteome. Together these data indicate the value of our approach and suggest further important insights into the regulation of phagocytosis will be obtained by integrating these data with that obtained from other complementary screens and approaches.

11.7.1.5 Supplementary Discussion References

1. Llorca, O. et al. Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits. *Nature* 402, 693-6 (1999).
2. Lin, H., Yue, L. & Spradling, A. C. The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* 120, 947-56 (1994).
3. Dubielecka, P. M., Stebelska, K., Jazwiec, B. & Sikorski, A. F. Cystocyte and lymphocyte derived fusomes/spectrosomes: analogies and differences: a minireview. *Cell Mol Biol Lett* 8, 221-9 (2003).
4. Gagnon, E. et al. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-31 (2002).
5. Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3, 280-91 (2003).
6. Ashburner, M. & Lewis, S. On ontologies for biologists: the Gene Ontology--untangling the web. *Novartis Found Symp* 247, 66-80; discussion 80-3, 84-90, 244-52 (2002).
7. Giot, L. et al. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727-36 (2003).
8. Zeeberg, B. R. et al. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 4, R28 (2003).
9. Sontheimer, E. J. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 127-38 (2005).
10. Touret, N. et al. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157-70 (2005).
11. Stuart, L. M. et al. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 170, 477-85 (2005).
12. 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, 644-8 (2002).
13. Philips, J. A., Rubin, E. J. & Perrimon, N. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science* 309, 1251-3 (2005).
14. Kocks, C. et al. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123, 335-46 (2005).
15. Agaisse, H. et al. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science* 309, 1248-51 (2005).
16. Cheng, L. W. et al. Use of RNA interference in *Drosophila* S2 cells to identify host pathways controlling compartmentalization of an intracellular pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13646-51 (2005).
17. Stroschein-Stevenson, S. L., Foley, E., O'Farrell P, H. & Johnson, A. D. Identification of *Drosophila* Gene Products Required for Phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol* 4, e4 (2005).

11.7.2 Supplementary Methods M1

11.7.2.1 Phagosome isolation

Confluent S2 cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes and the pellet resuspended in fresh Schneider's medium. Latex bead (0.8 μm – Estapor microsphere) were added (1:100) and incubated at 25°C with gentle agitation for 30 minutes. The cells were then washed 3 times with 1X for *Drosophila* PBS (NaCl 52 mM, KCl 40 mM, D-glucose 10 mM, sucrose 100 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, Na_2HPO_4 2 mM and KH_2PO_4 0.37 mM, pH 6,7) at 4°C. The cells were then exposed to a hypotonic lysis buffer (10mM Hepes pH 7.0, 2 mM MgCl_2 , 6 mM β -mercaptoethanol and protease inhibitor) for 2 minutes, and then disrupted with 22 G 1/2 needle while checking with a toluidine blue and optic microscopy to establish that the cell nuclei remained intact. The homogenate was then centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes at 4°C to obtain “Post-nuclear supernatant”. This supernatant was then mixed with a 62% sucrose solution to obtain a final concentration of 40 % sucrose. This post-nuclear supernatant in 40% sucrose was then is overlaid onto a layer of 62% sucrose in a polypropylene ultra-centrifugation tube. 35%, 25% and 10% sucrose solutions were then overlaid onto the tubes and equilibrated with the 10% sucrose solution. This differential sucrose gradient was then centrifuged at 24000 rpm at 4°C for one hour. Phagosomes were harvested from the upper (10 and 25%) interface prior to washing once with *Drosophila* PBS by centrifuging at 15 000 rpm at 4°C for 15 minutes. The phagosome pellet was then dissolved in Laemmli 1X buffer. Protein was quantified the EZQ™ Protein Quantification Kit (Invitrogen) before proteomic analysis.

11.7.2.2 Assessment of contamination by 2-dimensional gel electrophoresis

S2 cells were serum starved in methionine deplete serum free media for 30 min with agitation at 28C. Cells were centrifuge at 1500 rpm for 5 min and the pellet was resuspended in methionine deplete serum free media to which [35S]-methionine was added. The cells were incubated at 28C over night with agitation. For mixing experiments, confluent S2 cells (without [35S]-methionine) were used to generate phagosomes by incubating latex beads (0.8 μm) for a pulse and chase of 30'/60'. Total cell lysates from [35S]-methionine labeled cells that had not interacted with latex beads were mixed with isolated unlabelled phagosomes. Phagosomes were then re-isolated on the differential sucrose gradient as described previously and contaminating proteins identified as follows. After the phagosome isolation, latex bead phagosomes were resuspended with IPG buffer and used to rehydrate IPG strips (pH 3 – 10) (Amersham). 2-d gel electrophoresis was run as follows. First the rehydrated IPG strips were incubated overnight at room temp with mineral oil and IEF then performed at 300V for 15 min, 1000V for 10 min, 2000V for 10 min and then 3500V for 2h30'. To perform the second dimension, IPG strips were loaded on 12% pre-cast SDS gel (Biorad) and 200V was applied for 35-45 min. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane with 100V for 1 hour and the membranes dried. The membranes were then exposed to a 35S film grade (kodak) at -80C for 5 days. Total cell lysates from [35S]-methionine labelled cells were run for comparison.

11.7.2.3 Trypsin digestion and peptide extraction

The unstained gel slices contained into a 96 wells were treated for 30 min with 10 mM dithiothreitol to reduce cystinyl residues and for 20 min with 55 mM iodoacetamide to effect alkylation. After an additional round of $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ and acetonitrile washes, the slices were extracted and dried with acetonitrile at 37°C.

They were then incubated with trypsin (6 ng/ μ l in 50 mM $[\text{NH}_4]_2\text{CO}_3$) for 5h at 37°C and the peptides were first extracted in 1% formic acid/2% acetonitrile followed by two further extractions with additions of acetonitrile. All treatments were performed robotically using a MassPrep Workstation (MicroMass).

11.7.2.4 Mass spectrometry analysis

The 96 wells sample tray was kept in a Micro Well-plate Sampler (Agilent 1100 Series). Prior to injection, the pre-column (Zorbax 300SB-C18, 5 mm X 0.3, 5 μ m) installed on the 6 port Rheodyne valve of the Column Compartment Module, was conditioned with water containing acetonitrile (5%) and formic acid (0.1%) supplied by a Isocratic pump (Agilent 1100 series) set at a flow rate of 15 μ L/min. A volume of 20 μ L of the tryptic digest solution was injected on the pre-column at 15 μ L/min and the sample was washed for 5 min while the eluent was evacuated to waste.

Then the valve was actuated and the pre-column was back-flushed to the 75 mm i.d PicoFrit column (New Objective, Woburn, MA) (filled with 10 cm of BioBasic C18 packing, 5 mm, 300 Å) by the acetonitrile gradient supplied by the Agilent series 1100 Nanopump at 200 nL/min. Solvent A was water (formic acid 0.1%) and solvent B was acetonitrile: water (95:5) (formic acid 0.1%). The linear gradient was started after the washing step. At time 0 min, B was already at 10.5%. It was set to reach 42% B at 45 min, 73.5% B at 53 min and 100% B at 58 min. B was then kept at 100% for 2 min and brought back to 10.5% from 60 min to 72 min.

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. The capillary voltage was adjusted to get the best spraying plume at 35% B. MS survey scan was set to 1 s (0.1 s interscan) and recorded from 350 to 1600 m/z. In a given MS Survey scan, all doubly and triply charged ions with intensity higher than 25 counts were considered

candidates to undergo MSMS fragmentation. From these, the strongest one was selected. MSMS acquisition would stop as soon as the total ion current would reach 2800 counts/second or after a maximum time of 4 s. MSMS scan was acquired from 50 to 1990 m/z, scan time was 1.35 s and interscan was 0.15 s. A second precursor ion would be selected from the following MS survey scan. The doubly and triply charged selected ions were fragmented with the following pre-programmed collision energies: (i) For doubly charged ions, the collision energies are 25 eV for the range 400 to 653 m/z, 26 eV for the range 653 to 740 m/z, 28 eV for the range 740 to 820 m/z, 32 eV for the range 820 to 1,200 m/z, and 55 eV for the range 1,200 to 1,600 m/z. (ii) For triply charged ions, the collision energies are 14 eV for the range 435 to 547 m/z, 19 eV for the range 547 to 605 m/z, 24 eV for the range 605 to 950 m/z, and 35 eV for m/z higher than 950 m/z.

11.7.2.5 Bioinformatics analysis and Protein identification

Raw mass spectra were passed through a bioinformatics pipeline¹ which implemented the following analysis procedures:

1. Raw data files were sent by TOMAS² to Distiller (Matrix Science) for peak detection and creation of the peak lists in the mgf format.
2. The raw spectra were first subjected to peak-detection using the Distiller product from Matrix Science (<http://www.matrixscience.com/distiller.html>). Distiller parameters were set for a signal to noise of 2 and a correlation coefficient of 0.7. The peak lists were then submitted to the Mascot cluster by TOMAS for database search against the uni_drosophila_melanogaster database that was issued on November 11th of 2004 from the Uniprot Swiss-Prot/TrEMBL database (<http://www.pir.uniprot.org/>). Fixed modifications was set for carbamidomethyl on cystein, variable modifications was set for oxidation of methionine, peptide mass and fragment tolerance both set at ± 0.5 Da. 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.

3. The resulting list of peptide identifications was then processed to eliminate those likely to have arisen by chance. Thus, only peptide identifications with a probability of occurring by chance of < 0.05 were retained (i.e. only those peptides for which the Mascot Peptide Score was $>$ the Id Score were retained). Validation studies in which spectra were searched against a random data base, showed that the Mascot at the 5% confidence level was quite conservative; the actual false positive rate was estimated to $\sim 1.5\%$ estimated by searching a randomized copy of the database³.

4. These peptide identifications were then linked to the proteins containing them 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 then processed by a grouping algorithm⁴ to generate a list of proteins defined by distinct sets of proteins. That is, the minimum number of protein sequences needed to explain the peptides observed.

11.7.2.6 Supplementary Methods M1 References

1. Kearney RE, Bencsath-Makkai Z, Granja C, Bell A, Boismenu D, Bergeron J (2003) Engineering a Proteomics PipeLine for the CellMap Project. *In: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Cancun, Mexico, 17-21 Sept, pp: 3715*
2. Morales, F.; Kearney, R.; Bencsath-Makkai, Z.; Bergeron, J. *Mol. & Cell. Prot.* 2003, 2, **9**, 832.
3. Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* **76**: 4193-4201
4. Kearney RE, Blondeau F, McPherson P, Bell A, Servant F, Drapeau M, Grandpre SD, Bergeron J (2005) Elimination of Redundant Protein Identifications in High Throughput Proteomics. *In: 27th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Shanghai, September 1-4*

11.7.3 Supplementary Methods M2

11.7.3.1 Building and optimisation of the phagosome interactome - Network inference and analysis

To place the phagosome-isolated proteins in biological context and suggest additional components, we embedded proteins from the primary screen in a network of protein-protein interactions observed in high-throughput experimental screens.

First a large base network was generated from confidence-rated protein-protein interactions were gathered from 5 large-scale experimental screens: (i) a two-hybrid map of 21,111 *Drosophila* interactions, with confidence scores in the range 0 to 1 taken as calculated by the study authors¹; a map of 4523 *C. elegans* two-hybrid and literature-derived interactions, with nominal confidence scores assigned as Core1 = 0.95, Scaffold = 0.8, Literature = 0.8, Core2 = 0.65, NonCore = 0.4, obtained by removing cross-species inferred interactions from Worm Interactome 5 (WI5)²; and a map of 47,783 two-hybrid interactions and co-complex associations obtained by merging data from two-hybrid screens^{3, 4} and protein complex characterizations^{5, 6}, with confidence scores taken from subsequent analysis of the aggregated data⁷. In each data set, the confidence score reflects the probability that an observed interaction is biologically relevant, and 1 minus the confidence score reflects the false-positive probability.

Mapping interactions cross-species is an effective method for predicting ‘interologs’, or protein interactions between orthologous proteins in different species, and aligning protein interaction networks^{4,8,9}. Putative orthologs inferred by the InParanoid algorithm¹⁰ served as the basis for mapping the worm and yeast protein interaction data sets to fly, yielding 53,775 observed and inferred protein-protein interactions and co-complex associations in *Drosophila*. Confidence in an interaction

increased through observation of orthologous interactions in multiple data sets according to the formula (1) :

$$c = 1 - \prod_{i=y,w,f} (1 - c_i)$$

This formula assumes that $1-c_i$ is the probability of a false-positive observation in species $i = \text{yeast } (y)$, worm (w), and fly (f). More complicated formulas that account for the degree of sequence conservation¹⁰ or use Bayesian modeling¹¹ are also possible. We retained 12,251 high confidence interactions (confidence ≥ 0.5).

The >600 proteins identified in the phagosome proteomics screen were used to anchor a network of protein-protein interactions. 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, 13}. We adopted a modified approach based on the expectation that the primary components identified by experimental proteomics should remain central to the network.

We examined a family of algorithms that extend the primary components through two steps: (1) retain only those interactions with confidence $\geq c$ for a pre-specified threshold c ; (2) introduce secondary components that interact with at least n primary components. This family of algorithms is specified by the two parameters (n, c) . We characterized the performance for each (n, c) value through the following cross-validation scheme. Each of the 617 primary components was deleted in turn, and we calculated a true-positive count as the number of primary components recovered by the algorithm. As there is no definitive data set of false-positives, we used as a proxy the total number of secondary components recovered by the algorithm. Secondary components were retained irrespective of whether they were or weren't expressed in S2 cells. The true-positive and false-positive counts are commonly visualized through a receiver operating characteristic (ROC) curve, in which superior performance is identified with higher-lying curves. In this way we characterized algorithm

performance in the space $n \geq 1$, $c \geq 0.5$ using a discretization of 0.05 for c (Fig. J1). Three parameter sets were selected for further investigation, $(n, c) = (4, 0.5)$, $(2, 0.8)$, and $(2, 0.75)$. The number of primary components and secondary components in these networks are provided (Fig. J2). The software used to generate these interactions is available upon request. Networks were visualized with Cytoscape¹⁴.

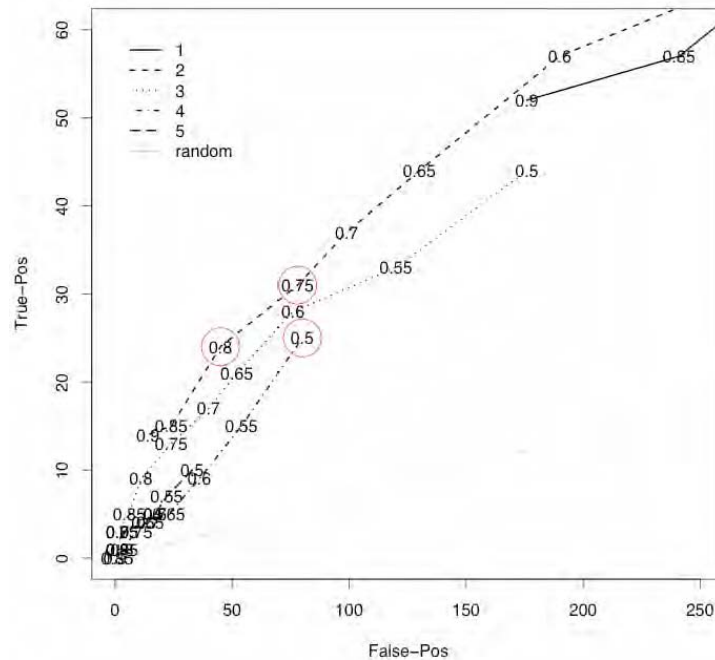


Fig. J1. Algorithm optimization.

A receiver-operating characteristic (ROC) curve assesses performance of algorithms parameterized by number of interactions, n , with confidence above a threshold, c , that must connect a putative secondary component to known primary components. Each line corresponds to a value of n from 1 through 5, and numeric values along each line indicate the threshold c with discretization 0.05. The grey line indicates the performance of random selection of secondary components. The point circled at $(n, c) = (4, 0.5)$ generates a densely connected network (TP = 25, FP = 80). The circled point at $(2, 0.8)$ represents a more specific alternative with roughly the same number of true positives and almost 2x fewer false positives (TP = 24, FP = 45). The circled

point at (2,0.75) represents a more sensitive alternative with roughly 25% more true positives (TP = 31, FP = 78).

	<i>n</i> = 4, <i>c</i> = 0.5	<i>n</i> = 2, <i>c</i> = 0.75	<i>n</i> = 2, <i>c</i> = 0.8
Number of components	281	214	162
Primary	201	136	112
Secondary	80	78	50
Number of interactions	806	356	204
Primary-Primary	181	81	64
Primary-Secondary	387	192	115
Secondary-Secondary	238	83	25

Fig. J2. Network statistics.

11.7.3.2 Supplementary Methods M2 References

1. Giot, L. et al. A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727-1736 (2003).
2. Li, S. et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303, 540-3 (2004).
3. Ito, T. et al. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4569-74 (2001).
4. Uetz, P. et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-7 (2000).
5. Gavin, A. C. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-7 (2002).
6. Ho, Y. et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-3 (2002).
7. Bader, J. S., Chaudhuri, A., Rothberg, J. M. & Chant, J. Gaining confidence in highthroughput protein interaction networks. *Nat Biotechnol* 22, 78-85 (2004).
8. Matthews, L. R. et al. Identification of potential interaction networks using sequencebased searches for conserved protein-protein interactions or "interologs". *Genome Res* 11, 2120-6 (2001).
9. Kelley, B. P. et al. PathBLAST: a tool for alignment of protein interaction networks. *Nucleic Acids Res* 32, W83-8 (2004).
10. Remm, M., Storm, C. E. & Sonnhammer, E. L. Automatic clustering of orthologs and inparalogs from pairwise species comparisons. *J Mol Biol* 314, 1041-52 (2001).
11. Jansen, R. et al. A Bayesian networks approach for predicting protein-protein interactions from genomic data. *Science* 302, 449-53 (2003).
12. 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).
13. Bader, J. S. Greedily building protein networks with confidence. *Bioinformatics* 19, 1869-74 (2003).
14. Shannon, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498-504 (2003).

11.7.4 Supplementary Methods M3

11.7.4.1 Generation of dsRNA and treatment of S2 cells

dsRNA was generated from a *Drosophila* RNAi library containing 13 000 genes (Geneservice, Cambridge, UK) as follows. (Information on gene specific primers used to generate the original PCR fragments in the library can be found on at http://www.geneservice.co.uk/products/tools/DrosRNAi_Finder.jsp using the well and plate i.d.s provided in *Supplementary Table ST8*.) 1:10 dilutions of gene specific PCR products containing a flanking T7 sequence were first amplified using universal T7 primers in a 96 well format. The PCR products were checked by running on a 1.2% agarose gel. 8µl of the PCR product was then used in a T7 in vitro transcription (Invitrogen) to generate ssRNA. The RNA was purified using Megaclear-96 (Invitrogen) according to manufacturers instructions. ssRNA was heated to 65°C for 30 minutes and cooled slowly to generate dsRNA. 2µl of dsRNA was added to each well of a 96 well plate. To each well was added 1×10^5 S2 cell in 50µl of serum-free *Drosophila* media (Gibco). Cells were incubated with dsRNA for 30 minutes and then 150µl of complete Schneider's media (Gibco) (supplemented with penicillin-streptomycin and 10% insect tested FBS) added. Cells were then incubated for 3 days prior to use. Certain genes effecting uptake of both *S.aureus* and *E.coli* were rescreened in assess RNA treatments with major effects on cell viability by quantifying cell number and DNA content using Hoechst dye and fluorescent microscopy. 6 genes in this group had some effect on cell viability, indicating that their effect on phagocytosis may be indirect. This included *CG11700*, which had previously been identified to effect viability in an independent RNAi screen, *CG10198* a nuclear pore component (Nup98), *beta-COP* and *Arf79F*. Full lists of RNAi treatments that effect cell viability are available in ¹ and at <http://flyrnai.org/viability/>.

11.7.4.2 RNAi screening to identify genes involved in phagocytosis

Candidate genes were selected to include the proteomics data set. In addition certain proteins, identified as components of the phagosome but that did not meet the final criteria to be included in the proteomics list, and certain proteins predicted to interact with phagosome components but not present in the proteomics were also screened. A total of 837 genes were screened. In an additional separate screen 70 secondary components were also tested. FACS based phagocytosis assays were performed as described in Ramet previously². Only live cells were analysed by gating on FSC vs. SSC. Fluorescent signal was quantified from internalised bacteria as fluorescence from bound, non-internalised bacteria was first quenched with trypan-blue solution. The phagocytic index is calculated as the mean fluorescence of the positive cells x the percentage of phagocytic cells as described previously. To determine bacterial binding for the RNAi treatments of the exocyst, phagocytosis was performed at 27C, a temperature permissive for both exocytosis and phagocytosis to proceed normally. The binding was quantified as follows: binding index = total cellular fluorescence (before quenching) - internalised fluorescence (after quenching). Each gene was screened a minimum of 6 times (a minimum of 3 for *S.aureus* and 3 for *E.coli*) and the mean effect for each gene used to determine positive hits. Effects were normalised to the mean of the control wells, which did not differ significantly for the mean of the irrelevant GFP RNAi. Each plate contained two positive controls (*CG6124* and *CG10198*) which were hit on >95% of occasions screened, 4 blank control wells and 4 irrelevant RNAi controls (GFP). For detailed analysis of the function of exocyst components fresh dsRNA was generated from new template DNA that had been amplified directly from S2 cDNA by PCR using genespecific primers. This dsRNA was then used to retest the exocyst components in the functional assays shown in figure 4.

Statistics three statistical parameters were used to define hits: 1) an arbitrary hit-limit of >30% reduction or >50% increase was used, as it was considered optimal to identify both biologically and statistically significant hits and; 2) proteins that had

a z score (a measure of the number of standard deviations from the mean of the controls) of <-1.5 or $> +2.0$) based on the percent inhibition the hit significance was also determined using a Student-t test, testing the hypothesis that RNAi treatments were significantly different from the blank control samples. For readers wishing to account for multiple hypothesis testing the false discovery rate (FDR) was estimated using a histogram distribution of p-values and assuming a β -uniform mixture distribution³. As estimated from the area under the curves the FDR was estimated as 16% and 24% for *E.coli* and 27% and 43% for *S.aureus* if p values of <0.01 or <0.05 were applied respectively.

11.7.4.3 Supplementary Methods M3 References

1. Boutros, M. et al. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* **303**, 832-5 (2004).
2. Ramet, M., Manfrulli, 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**, 644-8 (2002).
3. Pounds, S and Cheng, C. Improving false discovery rate estimation. *Bioinformatics* **20**, 1731-45 (2004).

12. Article II

Molecular characterization of the evolution of phagosomes

Jonathan Boulais^{1,9}, Matthias Trost^{2,3,9}, Christian R. Landry⁴, Régis Dieckmann⁵, Emmanuel D. Levy⁶, Thierry Soldati⁵, Stephen W. Michnick⁶, Pierre Thibault^{3,8,*} and Michel Desjardins^{1,7,*}

Molecular Systems Biology 6:243 (16 October 2010)

N.B. *Veillez noter qu'en raison de leur taille trop volumineuse, que les tables de données supplémentaires **Dataset 1 à 10** ainsi que les **fichers d'alignements de séquences** ne sont pas incuses dans cet ouvrage. Toutefois, ces données peuvent être téléchargées en ligne à cette adresse :(www.nature.com/msb/journal/v6/n1/supinfo/msb201080_S1.html).*

12.1 Résumé

Les amibes utilisent la phagocytose pour internaliser des bactéries en tant que source nutritive, tandis que les organismes multicellulaires utilisent ce processus en tant que mécanismes de défense pour éliminer les microbes et initier une réponse immunitaire soutenue chez les vertébrés. En utilisant une approche à haut-débit pour identifier et comparer le protéome et phosphoprotéome de phagosomes isolés à partir d'organismes distants et en appliquant une analyse comparative sur 39 taxons, nous avons identifié un bloc ancien de protéines phagosomales autour duquel les fonctions immunitaires de cette organelle se sont probablement organisées. Nos données indiquent qu'une large proportion du protéome du phagosome, en comparaison avec le protéome entier de la cellule, fut acquise par la duplication de gènes à une période qui coïncide avec l'émergence de l'immunité innée et acquise. Notre étude a aussi caractérisé en détail l'acquisition de nouvelles protéines et le remodelage significatif du phosphoprotéome du phagosome ayant contribué à la modification du bloc constituant de cette organelle à travers l'évolution. Notre travail procure la première analyse approfondie des changements ayant permis la transformation du phagosome allant d'un compartiment phagotrophique à une organelle entièrement compétente pour la présentation antigénique.

Molecular characterization of the evolution of phagosomes

Jonathan Boulais^{1,9}, Matthias Trost^{2,3,9}, Christian R. Landry⁴, Régis Dieckmann⁵, Emmanuel D. Levy⁶, Thierry Soldati⁵, Stephen W. Michnick⁶, Pierre Thibault^{3,8,*} and Michel Desjardins^{1,7,*}

1. Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
2. MRC Protein Phosphorylation Unit, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, Scotland.
3. Unité protéomique et spectrométrie de masse bioanalytique, Institut de Recherche en Immunologie et Cancérogénie (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
4. Département de Biologie, PROTEO and Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, Québec, Canada.
5. Department of Biochemistry, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
6. Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
7. Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
8. Département de Chimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
9. These authors contributed equally to this work.

* Corresponding authors :

P. Thibault, Institut de Recherche en Immunologie et Cancérogénie (IRIC), Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada. H3C 3J7. Tel.: +1 514 343 6910; Fax: +1 514 343 6843.

M. Desjardins, Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada. H3C 3J7. Tel.: +1 514 343 7250; Fax: +1 514 343 5755.

Molecular Systems Biology 6:423 (16 October 2010)

12.2 Abstract

Amoeba use phagocytosis to internalize bacteria as a source of nutrients, whereas multicellular organisms utilize this process as a defense mechanism to kill microbes and, in vertebrates, initiate a sustained immune response. By using a large-scale approach to identify and compare the proteome and phosphoproteome of phagosomes isolated from distant organisms, and by comparative analysis over 39 taxa, we identified an ‘ancient’ core of phagosomal proteins around which the immune functions of this organelle have likely organized. Our data indicated that a larger proportion of the phagosome proteome, compared with the whole cell proteome, has been acquired through gene duplication at a period coinciding with the emergence of innate and adaptive immunity. Our study also characterizes in detail the acquisition of novel proteins and the significant remodeling of the phagosome phosphoproteome that contributed to modify the core constituents of this organelle in evolution. Our work thus provides the first thorough analysis of the changes that enabled the transformation of the phagosome from a phagotrophic compartment into an organelle fully competent for antigen presentation.

12.3 Introduction

Phagocytosis is the process by which multiple cell types internalize large particulate material from the external milieu. In mammals, this receptor-mediated function plays key roles in embryogenesis and tissue remodeling (through the clearance of apoptotic cells), as well as in the elimination of a variety of microbial pathogens causing important diseases such as salmonellosis, chlamydia infection, and tuberculosis. The functional properties of phagosomes are acquired through a complex maturation process, referred to as phagolysosome biogenesis. This pathway involves a series of interactions with other intracellular organelles, enabling the delivery of hydrolytic enzymes and the generation of other molecules, such as nitric oxides and superoxides, involved in the killing and degradation of the phagosome content.

Phagocytosis has been maintained during evolution and was shown to play important functions in organisms such as amoeba and paramecium. For example, the degradative environment encountered in the phagosome lumen has enabled the use of phagocytosis as a predation mechanism for feeding (phagotrophy) in amoeba (Desjardins *et al*, 2005; Gotthardt *et al*, 2006; Jutras & Desjardins, 2005). The degradative properties of phagosomes were exploited for the control of pathogen invasion in multicellular organisms, through the introduction of molecules involved in the recognition of microbial determinants such as the Toll-like receptors (TLRs), with one representative in *Caenorhabditis elegans*, and nine and ten in *Drosophila melanogaster* and human respectively (Mushegian & Medzhitov, 2001). Killing of microorganisms in phagosomes is a key feature of innate immunity, the part of our immune system that defends the host from infection in a non-specific manner. The emergence of genes associated to the MHC locus in mammals that appeared originally in the genome of jawed fishes, contributed to the development of complex molecular mechanisms linking innate and adaptive immunity (the part of the immune system triggered specifically after antigen recognition) (Kasahara *et al*, 2004). Several of the genes of this locus encode proteins known to play key roles in antigen presentation, such as subunits of the immunoproteasome (*LMP2* and *LMP7*), MHC

class I and class II molecules, as well as tapasin and the transporter associated with antigen processing (*TAP1* and *TAP2*), involved in the transport and loading of peptides on MHC class I molecules. Remarkably, all of these proteins have been identified on phagosomes of different organisms by various biochemical and morphological approaches (Ackerman *et al*, 2003; Dermine *et al*, 2001; Grotzke *et al*, 2009; Guermonprez *et al*, 2003; Houde *et al*, 2003), suggesting that their advent during evolution might have contributed to the pivotal role played by phagosomes in linking innate and adaptive immunity. Nevertheless, the molecular mechanisms that enabled the emergence of novel phagosomal functions during evolution are poorly understood. Here, we present the first large-scale comparative proteomics/phosphoproteomics study characterizing some of the key steps that contributed to the remodeling of phagosomes that occurred during evolution.

12.4 Results

12.4.1 Proteomics analyses of phagosomes

To study how the phagosome has been remodeled during evolution, we isolated this organelle from three distant organisms that use phagocytosis for different purposes, and performed detailed proteomics and phosphoproteomics analyses. These original data were analyzed and compared to a wide variety of organisms using comparative genomics to characterize the nature of the modifications that enabled phagosomes to play a key role in innate and adaptive immunity during evolution. This approach proved to be efficient for the comparative study of complex cellular structures like synapses (Emes *et al*, 2008). Tandem mass spectrometry (MS/MS) analyses led to the identification of 818 Dictyostelium, 1132 Drosophila and 1391 mouse phagosome proteins (**Dataset 1-3**). Compared with previous studies (Garin *et al*, 2001; Gotthardt *et al*, 2006; Jutras *et al*, 2008; Rogers & Foster, 2007; Stuart *et al*, 2007), we obtained a 2 to 4-fold enhancement in the number of proteins identified, with unparallel protein coverage for this organelle. Based on the proteome of each organism, we identified orthologs present in the genome of the two other organisms using the established Ensembl (to compare mouse with Drosophila) and Inparanoid (to compare mouse and Drosophila with Dictyostelium) databases (**Dataset 4-6**), and mapped them accordingly to their BLAST E-value (**Figure 1a**). These analyses identified proteins unique to a given organism (point of origin in purple), proteins sharing orthologs with one of the two other organisms (data points on x and y axes in green or red), or proteins sharing orthologs with the two other organisms (data points out of the axes in blue). The proportion for each group of proteins is highlighted in the bar graph under each scatter plot with respective colors. As expected, the mouse and Drosophila phagosomes are more related to each other than to Dictyostelium phagosomes. Nevertheless, a large proportion of proteins are maintained in phagosomes from Dictyostelium to mouse, highlighting a subset of molecules likely to have been present in the phagosome core of their common ancestors.

Next, we annotated each of the mouse proteins (based on literature searches and the curated Uniprot database) to determine the distribution of orthologs among established phagosome structural and functional properties. Our data indicate that cytoskeletal elements, proteins associated with cellular trafficking, and small GTPases were highly maintained in the three organisms (**Figure 1b, Dataset 7**). The presence of these elements could be explained by their involvement in the advent of phagocytosis in pre-eukaryotic cells (Cavalier-Smith, 2009; Yutin *et al*, 2009). Conversely, functional groups such as membrane receptors, signaling, and immunity are predominantly represented in the mouse phagosomes, or in both the mouse and *Drosophila*, highlighting the emergence of novel phagosomal properties in multicellular organisms (**Figure 1b**).

So far, our data indicated that a large proportion of the mouse phagosomal proteins have orthologs in the *Drosophila* and/or *Dictyostelium* genome. Thus, a related question is whether these proteins are also present on the phagosome of these organisms, or expressed elsewhere in the cell. Comparison of the mouse phagosome proteome with the proteomics analyses of phagosomes isolated from *Drosophila* and *Dictyostelium* performed in this study, as well as compiled data published by our groups previously (Stuart *et al.*, 2006; (Gotthardt *et al*, 2006) indicate that 61.7% and 51.2% of the mouse orthologs were identified by MS/MS in *Drosophila* and *Dictyostelium* phagosomes respectively (41.7% of the mouse phagosome proteome is shared by the three species) (**Figure S1 a**). While a certain proportion of these differences might be due to the fact that some of the proteins present in *Drosophila* and *Dictyostelium* phagosomes were not sampled during the mass spectrometer analyses (sampling limitation), it is also arguable that a path to the complexification of the phagosome proteome arose, for example, from the possibility that proteins localized in the cytoplasm of basal organisms would be eventually recruited to phagosomes during evolution (co-option). We argue that a sampling limitation would potentially affect most of the proteins, irrespective of their functional properties. On the other hand, differences related to biological diversification during evolution is more likely to be related to changes for proteins of specific functional properties. Our data supports the proposal that proteins associated with specific functional properties

have accumulated on phagosomes during evolution. Indeed, significant differences were observed in the functional properties of the mouse orthologs that were effectively identified on *Drosophila* and *Dictyostelium* phagosomes. For example, we observed that predicted orthologs of proteins such as GTPases and cellular trafficking components were highly represented on the *Drosophila* and *Dictyostelium* phagosomes, compared with proteins such as transporters and membrane receptors (**Figure S1 b-c**). Further quantitative studies would be required to confirm that certain proteins present on the mouse phagosome are expressed in the other organisms (present in the cell) but not recruited to the phagosome.

12.4.2 Origin of the mouse phagosome proteome

We performed comparative analyses among 39 taxa to identify the origin of 1385 mouse phagosome proteins, by using gene phylogeny web databases (PhylomeDB (phylomeDB.org), and Treefam (treefam.org)) (**Figure 2a, Dataset 7**). Interestingly, 73.1% of this proteome consists of proteins already present in phagotrophic single-celled eukaryotes and in Amoebozoa and Fungi that had lost phagotrophy. Around 16.7% of the phagosome proteins appeared in organisms that use phagocytosis for innate immunity (Bilateria to Chordata), while 10.2% appeared in Euteleostomi or Tetrapoda where phagosomes play a key role in linking innate and adaptive immunity. The phagosome is an organelle formed following the internalization of large particles. Hence, it is made of molecules taken from a variety of sources within the cell, including the cytoplasm, the cytoskeleton and membrane organelles. Despite the evolution and diversification of these various cellular systems (Dacks *et al*, 2008; Erickson, 2007; Fritz-Laylin *et al*, 2010; Wickstead *et al*, 2010), the mammalian phagosome proteome is made preferentially of ancient proteins (**Figure 2b**). Functional annotation highlighted the emergence of specific phagosomal properties at various steps during evolution (**Figure 2c**). Some of these proteins and their point of origin during evolution are highlighted in **Figure 2d**. Strikingly, we identified in Tetrapods a set of 50 proteins that arose around 450

million years (Hedges, 2009) after the emergence of adaptive immunity, including IRG47/Irgm1 (a strong resistance factor induced by interferons), CD5 (a scavenger receptor that plays a key role in B and T cell selection as well as generation and maintenance of tolerance) (Raman, 2002), CD14 (a co-receptor along with TLR-4 and MD-2 for the detection of bacterial LPS) (Sepulcre *et al*, 2009), CD47 (a protein that interacts for “self” recognition) (Hatherley *et al*, 2009) and several proteins of unknown functions. Therefore, we used the term "late adaptive immunity" to highlight the fact that these 50 phagosome proteins emerged when adaptive immunity was already well established.

12.4.3 Refinement of the phagosome functions occurred during two major periods of gene duplication

Gene duplication and the expansion of gene families produced organelle complexity by functional gain during evolution (Cavalier-Smith, 2002; Dacks *et al*, 2008). To determine whether this process had a significant impact on phagosomal properties, we identified paralogs present in the mouse phagosome proteome and determined the origin of their duplication during evolution by using the Ensembl database. Our analyses indicate that 74.5% of the mouse phagosome proteins could be paired with one or more paralogs. Of these, 50.0% have been identified by MS/MS on the mouse phagosome, accounting for a total of 952 paralogs pairs. Comparative analyses reveal that the vast majority of these paralogs (79.1%) originated from proteins present in a phagotrophic ancestor (**Figure 3a**). The duplication of a large proportion of these proteins occurred in Bilateria (39.6%) and Euteleostomi (44.1%), coinciding with periods that saw the emergence of innate and adaptive immunity (**Figure 3b and Dataset 8**). This rate of duplication differs markedly from that observed for the whole mouse genome. Interestingly, much less difference was observed when we compared the rate of duplication of the proteins constituting the proteome of the smooth or rough endoplasmic reticulum (sER and rER) (Gilchrist *et al*, 2006) with that of the corresponding rat genome (**Figure S3 a**).

Duplication in the mouse phagosomal proteome has influenced proteins such as GTPases and SNAREs, regulating membrane fusion events, as well as hydrolases involved in the acquisition of phagosomal lytic properties (**Figure 3c**). Analysis of the *Drosophila* phagosome proteome indicated that gene duplication also contributed to the complexification of this organelle in Bilateria (**Figure S3 b**). Altogether, these results highlight the importance of gene duplication in the emergence of functional phagosome properties.

12.4.4 Evolution of the phagosome phosphoproteome

Phosphorylation has important roles in the regulation of phagosome functions (Trost *et al*, 2009). To determine the extent to which the phagosome phosphoproteome has been modified during evolution, we performed comparative analyses to determine the level of phosphosite conservation among a group of 10 organisms ranging from *Drosophila* to mouse. To do so, we used the mouse phagosome phosphoproteome data published recently, where 2949 phosphosites were precisely identified and mapped on 1166 proteins (Trost *et al*, 2009). The alignment of these proteins with their respective orthologs in the 10 chosen organisms allowed us to align 534 phosphosites from 238 phosphoproteins (**Figure 4a**). These alignments reveal that a small proportion of the phosphosites were conserved prior to the emergence of Tetrapods. This feature was especially observed for phosphosites present in disordered regions of proteins, as described previously (Dafforn & Smith, 2004; Landry *et al*, 2009). These results indicate that the phagosomal phosphoproteome has been extensively modified between coelomates and mammals. We showed recently that treatment of macrophages with interferon- γ (IFN- γ) induces significant changes in the level of expression of various proteins and the state of phosphorylation of several of their potential phosphosites (Jutras *et al*, 2008; Trost *et al*, 2009). This cytokine affects the relative abundance of at least 386 mouse phagosomal proteins. Our analyses reveal that 81.9 % (316) of these proteins originated before the emergence of IFN- γ in teleosts, indicating that the introduction

of this cytokine during evolution enabled the modulation of ancient phagosome proteins in ways not possible before its emergence (**Figure S4 b**). We observe a higher level of conservation of the IFN- γ -modulated phosphosites among all vertebrates, compared to tunicates and coelomates (*Drosophila*) (**Figure 4b**). Interestingly, this difference coincides with the emergence of IFN- γ at the vertebrates-tunicates split (Savan *et al*, 2009), suggesting that this cytokine might have introduced functional gains, creating selective pressure to stabilize of a part of the phagosomal phosphoproteome in vertebrates.

To evaluate more directly the extent of the reorganization of the phagosome phosphoproteome during evolution, we characterized the phosphoproteome of phagosomes isolated from *Drosophila* and *Dictyostelium*. Our analyses led to the identification of 968 phosphosites in 420 *Dictyostelium* phagosome phosphoproteins, and 2919 phosphosites in 910 *Drosophila* phagosome phosphoproteins, with a false-discovery rate below 1% (**Dataset 9 and 10**). Although the alignment of these phosphoproteins with the mouse orthologs predicted that a similar proportion (approximately 33%) of the murine phosphosites aligned with phosphorylatable residues in *Drosophila* or *Dictyostelium*, a relative small proportion of these sites was, in fact, effectively phosphorylated. Indeed, our phosphoproteomics data show that 12.8% (n = 88) and 5.0% (n = 20) of the mouse phosphosites are also phosphorylated in *Drosophila* and *Dictyostelium* phagosome proteins respectively. It should be emphasized that although these numbers appear to be low, they are, in fact, 8 and 12 fold higher than what would be expected if an equivalent ratio of phosphorylatable residues sampled randomly among S/T/Y of the same set of mouse phosphoproteins would align by chance with the phosphorylated residues of *Drosophila* and *Dictyostelium* (**Figure 4c, Figure S4 c**). Altogether, our results indicate that although the phagosome phosphoproteome has been extensively modified during evolution, some phosphosites have been maintained for more than 1.2 billion years (Bhattacharya, 2009), highlighting their particular significance in the regulation of key phagosomal functions.

12.4.5 Evolution of phagosomal protein networks

Thus far, our results indicate that the emergence of novel proteins, series of duplication events, and an extensive remodeling of the phosphoproteome are elements that contributed to the acquisition of new phagosome functions during evolution. How emerging proteins have been integrated into existing cellular pathways throughout evolution is poorly understood. It has been proposed that the integration of novel components into protein networks tends to occur through association with "hub", proteins that are already interacting with a high number of partners. This feature of complex networks is favored by gene duplication (Barabasi & Oltvai, 2004). Because duplication had a profound effect on the actual phagosome proteome, we studied how phagosome components of various evolutionary origins interact to assemble the molecular machines enabling the functional properties of this organelle in mammals. To circumvent the fact that a limited set of experimental interactions have been reported for mouse proteins, we used our mouse phagosome data to retrieve orthologous human protein-protein interaction data from the Intact (Kerrien *et al*, 2007) and UniProt databases (Consortium, 2009). This approach led to the characterization of 2637 interactions (edges) involving 1258 proteins (nodes) of the three main evolutionary groups (phagotrophy 864; innate immunity 243; and adaptive immunity 151 nodes). Although proteins of each groups have a similar average number of interactions (interactions/protein: phagotrophy, 2.8; innate immunity, 3.0; adaptive immunity, 2.8), proteins acquired later in evolution interact considerably more often with proteins of ancient origin (**Table 1**), consistent with the evolutive architecture of a scale-free network (Eisenberg & Levanon, 2003). From the total network we generated two sub-networks highlighting proteins involved in vesicle trafficking, and interaction with the cytoskeleton (**Figure 5a**) and immunity (**Figure 5b**).

Remarkably, most of the functional modules present on phagosomes are constituted of proteins that have appeared at various stages of evolution, often through a duplication process, indicating a high degree of integration and a diversification of pre-existing functional units (e.g. *Cdc42* and Rabs and their

effectors in **Figure 5a**). However, certain functional modules such as the Ena/Vasp complex, receptor signaling, the NADPH oxidase complex, as well as the antigen presentation machinery appeared later during evolution, promoting the direct emergence of novel functional properties. Particularly, a complex process like antigen processing and presentation requires the concerted action of a number of molecular machines. A model of the various steps performed in the phagosome to enable the processing of proteins into peptides, and their loading on MHC molecules is presented (**Figure 6**). This model highlights the fact that although this process is unique to evolutionarily recent phagosomes (starting in jawed fishes, about 450 million years ago) (Hedges, 2009), it uses and integrates molecular machines composed of proteins that emerged throughout evolution.

12.5 Discussion

Over more than a billion years, the phagosome has evolved from a digesting organelle, where bacteria are degraded as a source of nutrients, into a complex compartment involved in the killing of pathogens and the regulated processing of their proteins for antigen presentation. In the present study, we performed the first comparative analysis of an organelle isolated from distant organisms using a protocol allowing high levels of purification. Previous characterization of isolated latex bead-containing phagosomes demonstrated the low levels of contamination of these preparations due to the isolation procedure (Gotthardt *et al*, 2002; Stuart *et al*, 2007). The recent finding that phagosomes interact with autophagosomes (Sanjuan *et al*, 2007) would certainly provide a possible explanation for the presence of proteins in phagosomes that could be considered as contaminants. A good example of this is the identification of ribosomal proteins in our samples. Interestingly, phagosome-autophagosome interaction during mycobacterial infection has been shown to enable the delivery and degradation of ribosomal proteins in the lumen of these organelles, a process generating bactericidal molecules (Ponpuak *et al*, 2010). The three ribosomal subunits involved, L30, S19, and S30 have been identified in the mouse phagosome preparations. This led us to consider all the proteins identified in our preparations as "potential" phagosomal proteins; these being either structural proteins or proteins present in the phagosome lumen as cargo.

Our data indicate that a large proportion of the phagosome proteome is of ancient origin (73.1% of the proteome is conserved in the genome of most eukaryotic organisms). This number is somehow misleading since one has to consider that analyses of whole genomes will include large groups of proteins that are parts of well-conserved machineries involved in basic cellular functions. Nevertheless, this stresses the fact that phagocytosis is a very ancient process, as shown by its possible involvement in the emergence of eukaryotic cells (eukaryogenesis) (Cavalier-Smith, 2002). Of the 1391 proteins found on the mouse phagosome, 290 were effectively identified by MS/MS in phagosomes of the two other studied organisms, defining a protein core from which the immune functions of phagosomes likely evolved. A

clearer image of the ancient phagosome core and the early steps in the evolution of this organelle is likely to emerge once more free-living amoebozoan genomes will be sequenced.

Our study highlights the fact that the functional properties of phagosomes emerged by the remodeling of ancient molecules, the addition of novel components, and the duplication of existing proteins leading to the formation of molecular machines of mixed origin. Gene duplication is a process that contributed continuously to the complexification of the mouse proteome during evolution. In sharp contrast, the phagosome proteome was mainly reorganized through two periods of gene duplication, in Bilateria and Euteleostomi, coinciding with the emergence of adaptive immunity (in jawed fish), and what might have been the emergence of innate immunity. These results strongly suggest that selective constraints may have favored the maintenance of the phagosome paralogs to ensure the establishment of the novel functional gain associated with this organelle. For instance, the duplication of Toll-like receptors, hydrolases, and sets of novel SNARE and Rab proteins have contributed to the specialization of cell lineages and the establishment of innate immunity (Stuart & Ezekowitz, 2008).

The emergence of novel proteins is not the only way by which phagosomal functions have been modified during evolution. Several of the phagosome proteins shared among distant organisms have been modified by a significant remodeling of their phosphosites, indicating that phagosome proteins of ancient origin are far from being fixed entities. The reorganization of phosphosites, occurring at a much faster pace than the introduction of novel proteins, is likely to have endowed proteins with additional functional properties, and/or introduced finer ways to regulate their activity and/or the nature of their interacting partners. This is particularly the case in disordered regions of proteins, known to be fast evolving sequences that are often involved in protein interactions (Brown *et al*, 2002; Dafforn & Smith, 2004; Tompa, 2005). The impact of the phosphoproteome plasticity on phagosome functional properties is currently unknown. We have shown previously that IFN- γ alters the expression and the level of phosphorylation of a large number of proteins on

phagosomes of activated macrophages (Jutras *et al*, 2008; Trost *et al*, 2009). Remarkably, several of these proteins were present in the common eukaryotic ancestor, more than 1.2 billion years prior to the emergence of IFN- γ in teleosts (Bhattacharya, 2009; Savan *et al*, 2009). Thus, the emergence of a variety of cytokines appears to have been an important event that conferred novel functional properties to vertebrate phagosomes by fine-tuning the expression and/or phosphorylation of several proteins of this organelle, including proteins of ancient origin. Furthermore, our data indicate that despite its overall recent origin, the mouse phagosome phosphoproteome also contains ancestral phosphosites, maintained for more than a billion years, highlighting their potential importance in the functional properties of this organelle.

In addition to their ability to present peptides on MHC class II molecules, phagosomes of vertebrates have been shown to be competent for the presentation of exogenous peptides on MHC class I molecules, a process referred to as cross-presentation (Desjardins *et al*, 2005). From a functional point of view, the involvement of phagosomes in antigen cross-presentation is the outcome of the successful integration of a wide range of multi-molecular components that emerged throughout evolution. The digestion of exogenous proteins into small peptides that can be loaded onto MHC class I molecules is inherited from the phagotrophic properties of unicellular organisms, where internalized bacteria are degraded into basic molecules and used as a source of nutrients. Ancient processes have therefore been co-opted for new functionalities. The complete degradation of proteins in higher organisms is, however, restricted to favor the generation of antigenic peptides, notably through the action of IFN- γ on phagosome acidification and protease activity (Jutras *et al*, 2008; Trost *et al*, 2009; Yates *et al*, 2007). Cross-presentation in phagosomes is believed to be facilitated by the presence of molecular machines acquired through interactions with the endoplasmic reticulum (ER) (Ackerman *et al*, 2003; Grotzke *et al*, 2009; Guermonprez *et al*, 2003; Houde *et al*, 2003). Interestingly, the presence of ER components has been shown in proteomics and morphological analyses of phagosomes from distant organisms, including *Dictyostelium* (Dieckmann *et al*, 2008; Gotthardt *et al*, 2006), *Drosophila* (Stuart *et*

al., 2007), mouse (Garin *et al.*, 2001; Trost *et al.*, 2009), and human (Burlak *et al.*, 2006). These studies clearly indicated that ER components were present on phagosomes before the advent of innate and adaptive immunity. In basal organisms, the ER could serve as an alternative source of membrane providing part of the material needed for the formation of a large number of phagosomes, or trigger spikes of localized Ca^{2+} -concentration needed for phagocytosis (Cuttell *et al.*, 2008). This concept is supported by the finding that down-regulation of two ER proteins, calnexin and calreticulin, strongly inhibited phagocytosis in *Dictyostelium* (Muller-Taubenberger *et al.*, 2001). Arguably, the presence of ER on phagosomes found a novel usage in “jawed” vertebrates with the advent of the MHC locus, where several proteins involved in antigen presentation are encoded. Thus, peptides generated in the phagosome lumen potentially gained direct access to MHC class I molecules and the loading complex expressed in the ER, a process maximizing the ability to present exogenous peptides and stimulate CD8⁺ T cells (Bertholet *et al.*, 2006). This alternative usage of molecular machines is often observed during evolution (True & Carroll, 2002). Another example of co-option is the contribution of the proteasome in antigen cross-presentation in mammals (Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003). Indeed, this complex, which we identified on phagosomes of all three species, was proposed to play a role in the degradation of endogenous proteins for phagotrophy in the ancestral eukaryotes (Cavalier-Smith, 2009), and contributes to the recycling of self components from apoptotic cells internalized by phagocytosis in *Drosophila* (Silva *et al.*, 2007). Interestingly, remodeling of the phagosome proteome has continued to occur after the establishment of adaptive immunity in teleosts, with the integration of at least 50 proteins in tetrapods, including several transmembrane proteins of unknown function. Detailed analyses of these proteins should provide further understanding of the molecular mechanisms conferring specialized functions to mammalian phagosomes linking innate and adaptive immunity.

12.6 Methods

12.6.1 Phagosomes preparation

Phagosomes from J774 mouse macrophages, S2 *Drosophila* cells and Ax2 *Dictyostelium* cells were prepared according to previous methods (Desjardins *et al*, 1994a; Dieckmann *et al*, 2008; Stuart *et al*, 2007). In order to maximize the proteomic identification coverage, early and late phagosomes were isolated for each organism. For *Dictyostelium*, three different preparations (5'/0', 15'/0' and 15'/15') were mixed for early phagosomes, and late phagosomes (15'/45', 15'/105' and 15'/165'). For *Drosophila* and mouse, one early (30'/0') and one late phagosome (30'/120') preparation were analyzed. These samples were selected on the base that they were sufficient for the identification of proteins largely exceeding the number identified on these organelles in previous studies.

12.6.2 Phagosomal protein identification by SDS-PAGE and Mass Spectrometry

Sample of 20 µg of phagosomal proteins from *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster* and *Mus musculus* were reduced with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (Pierce), alkylated with iodoacetamide (Sigma-Aldrich) and separated on a 4-12% pre-cast NuPAGE gel (Invitrogen). The gel was stained by colloidal Coomassie and lanes were cut into 12 equal pieces using an in-house cutting device. The gel pieces were digested by trypsin (Promega, Madison, WI) and peptides extracted three times with 90% acetonitrile (ACN)/0.5 M urea. Combined extracts were dried and re-suspended in 5% ACN, 0.1% trifluoro acetic acid (TFA) prior to mass spectrometry analyses. Peptides were separated on a 150 µm ID, 10 cm reversed phase nano-LC column (Jupiter C18, 3 µm, 300 Å, Phenomex) with a loading buffer of 0.2% formic acid (FA). Peptide elution was achieved by a gradient of 5-40% ACN in 70 min on an Eksigent 2D-nanoLC (Dublin,

CA) operating at a flow-rate of 600 nL/min. The nano-LC was coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo-Electron, Bremen, Germany) and samples were injected in an interleaved manner. The mass spectrometer was operated in a data-dependent acquisition mode with a 1 sec survey scan at 60,000 resolutions, followed by three product ion scans (MS/MS) of the most abundant precursors above a threshold of 10,000 counts in the LTQ-part of the instrument.

12.6.3 Phosphopeptide enrichment and Mass Spectrometry

Phosphopeptides of 1.2 mg/replicate of early phagosomal proteins of *Drosophila* (4 replicates) and *Dictyostelium* (2 replicates) were reduced, cysteines blocked by carbamidomethylation and digested with trypsin. Subsequently, phosphopeptides were enriched on house-made TiO₂-microcolumns (GL Science, Japan) as published before (Thingholm *et al*, 2006; Trost *et al*, 2009) and eluted with 30 µl 1 % NH₄OH. Eluates were acidified by adding TFA to a final concentration of 3%, dried down, re-suspended in 5% ACN, 0.1% TFA and subjected to mass spectrometric analysis. Peptides were separated on a self-packed 45mm x 300 µm Polysulfoethyl column (Nest Group, Southborough, MA) and online eluted in 6 fractions with 0 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 500 mM and 2M Ammonium Formate, 2% ACN, 0.2% FA, pH 3.0 on a 150 µm ID, 10 cm reversed phase nano-LC column (Jupiter C18, 3 µm, 300 Å, Phenomex) coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer using the same settings as described above.

12.6.4 Peptide identification

Peak detection of raw MS² spectra was performed using Mascot Distiller v2.2.2 (Matrix Science, UK) using the default Orbitrap parameters. The centroided data was merged into single peak-list files and searched with the Mascot search engine v2.20 (Matrix Science, UK) against the combined forward and reversed mouse IPI protein database v3.37 (Kersey *et al*, 2004), the Uniprot Drosophila database v11.3 and the Dictybase database (Eichinger *et al*, 2005) v(22.12.2008) containing 52,326, 13,522 and respective 13,391 forward protein sequences. Search conditions included trypsin set as enzyme, 1 missed cleavage site, carbamidomethylation (C) as fixed modification and deamidation (N, Q), oxidation (M), phosphorylation (S, T, Y) as variable modifications. Precursor and fragment ion tolerances were set to 10 ppm and 0.5 Da respectively. For protein identification, all assigned peptides with a MOWSE score >15 were considered. Proteins identification required at least 2 different peptides with combined score for unique peptide identification exceeding the score of the first reversed-database hit reaching 1%. This resulted in a false-discovery rate (FDR) of < 1 % at the protein level. For the identification of phosphopeptides, all assigned peptides with a MOWSE score >17 were considered. This resulted in a FDR of <1% on the peptide level.

12.6.5 Bioinformatics

All proteomics data, bioinformatics analyses and cited databases of this paper were imported in a local MySQL database, and queried accordingly for specific requests. Custom Python scripts were written in order to parse and analyze the data and databases. To remove proteomics redundancy, identified proteins in early and late time points of each organism were merged together and clustered by gene names where the longest sequence of clustered proteins was kept as a cluster representative. Mouse proteins were annotated manually with a set of predefined 22 functions using Uniprot annotations and searching the literature. In order to perform proteomics

cross-species comparison, the predicted orthologs for Dictyostelium (versus Drosophila and mouse) were extracted from the InParanoid database version 6.0 (Berglund *et al*, 2008), while predicted orthologs for Drosophila (versus mouse) and mouse (versus Drosophila) were extracted from the Ensembl database version 52.0 (Hubbard *et al*, 2009). Proteomics cross-species comparison of mouse phagosome proteins was performed against Drosophila and Dictyostelium's phagosome proteins identified in this paper, but also against a second set of Drosophila and Dictyostelium phagosomes proteins already published (Gotthardt *et al*, 2006; Stuart *et al*, 2007). E-values of mouse orthologs (versus Drosophila and Dictyostelium) were determined by performing BLAST alignment (default parameters) using mouse sequences from the Uniprot mouse version 14.5. (Altschul *et al*, 1997) against the 2 other organisms sequences databases (Dictybase version 22.12.2008 and Flybase version 5.13) (Tweedie *et al*, 2009). Predicted mouse orthologs versus Drosophila and Dictyostelium (from InParanoid and Ensembl) were retrieved among the BLAST hits and the best relative E-value was retained. To plot E-values, we applied $-\text{Log}_{10}(\text{e-value})$ and assigned an e-value of 1 ($-\text{Log}_{10}(\text{e-value}) = 0$, point of origin) if proteins were devoid of any ortholog, and an e-value of 181 to the proteins that displayed a perfect alignment (the highest e-value).

To identify the origin of the mouse phagosome proteins, comparative analyses of 1324 phagosomal proteins were performed among 39 taxa (*Rattus norvegicus*, *Cryptococcus neoformans*, *Monodelphis domestica*, *Giberella zae*, *Neurospora crassa*, *Bos taurus*, *Arabidopsis thaliana*, *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Tetraodon nigroviridis*, *Xenopus tropicalis*, *Plasmodium yoelii*, *Caenorhabditis briggsae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ashbya gossypii*, *Dictyostelium discoideum*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Fugu rubripes*, *Caenorhabditis elegans*, *Paramecium tetraurelia*, *Pan troglodytes*, *Gallus gallus*, *Debaryomyces hansenii*, *Gillardia theta*, *Homo sapiens*, *Ciona intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Kluyveromyces lactis*, *Anopheles gambiae*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Macaca mulatta*, *Apis mellifera*), by using the human phylome of PhylomeDB (PhylomeDB.org), a

complete database of gene phylogenies (phylomes) (Huerta-Cepas *et al*, 2008; Huerta-Cepas *et al*, 2007). A set of 61 proteins from the mouse phagosome proteome that were not found in PhylomeDB were analyzed using Treefam, a second gene phylogeny database (Treefam.org) (Ruan *et al*, 2008). For each mouse proteins, orthologs were retrieved from their respective phylogenetic tree in order to identify the most basal species to assign a cladistic origin.

The extent of the effect of gene duplication in the remodeling of phagosomes during evolution was also addressed by identifying all the paralogs linked to the proteins constituting the mouse phagosome proteome, and their cladistic origin, using BioMart Ensembl version 56.0. Among all of these mouse paralogs, only the pairs for which both proteins were identified by MS/MS were retained in order to focus on the proteins that were effectively observed in our phagosome preparations. The same paralog analysis was performed from the *Drosophila* phagosome proteome and from rough and smooth reticulum endoplasmic proteomics data (Gilchrist *et al*, 2006).

12.6.6 Phosphorylation site localization

The nature of the MS/MS-experiments does not always allow the identification of the exact site of phosphorylation within a phosphopeptide. We used a probability based approach to identify the exact location using post-translational modification (PTM) scores by Mascot (Trost *et al*, 2009). In brief, the PTM score is $-10 \cdot \log_{10}(p)$, where p is the probability. The inverted probabilities of all possible phosphorylations are summed up and set equal to one. Then, a proportional probability is assigned to each site and all probabilities for each site are summed up. Probabilities of sites are separated into 3 classes with class 1 ($p > 0.75$) being high-confidence identifications, class 2 ($0.75 < p < 0.50$) medium confidence and class 3 ($p < 0.50$) low confidence site identifications. However, it should be noted that even if the confidence level for a specific site is low, the peptides presented in supplementary tables 7&8 are with a certainty of >99% phosphopeptides.

12.6.7 Conservation of phosphosites in *Dictyostelium*, *Drosophila* and mouse phagosomal phosphoproteins

Orthology relationships among these three organisms were settled by InParanoid v6.0 (Berglund *et al*, 2008) (for *Dictyostelium*) and Ensembl v52.0 (Hubbard *et al*, 2009) (for *Drosophila* and mouse) databases. Orthologous groups were aligned using MUSCLE with default settings (Edgar, 2004). In these comparisons, a conserved phosphosite corresponded to a phosphorylated site in Mm that has a phosphorylatable residue (S/T/Y) at the homologous alignment position in the Dm or Dd protein. These alignments are available in HTML format in the supplementary material. Finally, disordered regions of proteins were predicted using Disopred (Ward *et al*, 2004).

12.6.8 Conservation of phosphosites among chordates

In order to compare the evolution of phosphosites among chordates, we obtained orthologs of mouse phagosomal phosphoproteins from Rat (*Ratus norvegicus*), Human (*Homo sapiens*), Dog (*Canis familiaris*), Opposum (*Monodelphis domestica*), Chicken (*Gallus gallus*), Xenopus (*Xenopus tropicalis*), Zebrafish (*Danio rerio*), Sea squirt (*Ciona intestinalis*) and *Drosophila melanogaster* from Ensembl (ensembl.org). Mouse phosphoproteins that have an ortholog in each of these species were aligned (MUSCLE, as above), resulting in a total of 230 orthologous groups (620 phosphosites). Conservation of mouse phosphosites was then analyzed by examining the conservation of the phosphorylatable residues at the orthologous positions of the other species. Finally, we compared the extent of conservation of the phosphosites regulated by IFN- γ to that of non-IFN- γ -regulated phosphosites. We measured the extent of conservation of a phosphosite by the number of species sharing a serine or threonine at that position in the multiple alignments. We then calculated an average conservation for all IFN- γ

regulated sites, and compared it to that of a hundred samples of non- IFN- γ -regulated phosphosites. All statistical analyses were performed in R (r-project.org).

12.6.9 Network analyses

Proteins from this and former (Trost *et al*, 2009) experiments were mapped against the Uniprot v15.6 to obtain human orthologs. This was necessary as there are very few mouse protein-protein interactions in the Intact database (Kerrien *et al*, 2007). Experimental protein-protein interaction data were extracted from the Intact database v(31.07.2009). We then added manually and through automated parsing known interactions from the curated “subunit” comment-field of UniProt v15.6. The network was loaded into Cytoscape v.2.51 (cytoscape.org) for visualization. Subnetworks of proteins involved in immunity and the cytoskeleton were generated using a GO-term analysis described elsewhere (Trost *et al*, 2009) and manually arranged in Cytoscape.

12.7 Acknowledgements

The authors wish to thank Christiane Rondeau, Annie Laplante for technical assistance, and Sébastien Lemieux and Manuel Santos for insightful bioinformatic discussions. This work was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (J.B.), the Canadian Institute for Health Research (M.D.), and the Human Frontier Science Program (M.D.). C.L. is a CIHR New Investigator.

12.8 References

- Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P (2003) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12889–12894
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Barabasi AL, Oltvai ZN (2004) Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 5: 101–113
- Berglund AC, Sjolund E, Ostlund G, Sonnhammer EL (2008) InParanoid 6: eukaryotic ortholog clusters with inparalogs. *Nucleic Acids Res* 36: D263–D266
- Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, Houde M, Desjardins M, Sher A, Sacks D (2006) Leishmania antigens are presented to CD8⁺ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol* 177: 3525–3533
- Bhattacharya D, Yoon HS, Hedges SB, Hackett JD (2009) Eukaryotes (Eukaryota). In *The Timetree of Life*, Hedges SBaK, S (ed). Q8 pp 116–120. Oxford University Press
- Brown CJ, Takayama S, Campen AM, Vise P, Marshall TW, Oldfield CJ, Williams CJ, Dunker AK (2002) Evolutionary rate heterogeneity in proteins with long disordered regions. *J Mol Evol* 55: 104–110
- Burlak C, Whitney AR, Mead DJ, Hackstadt T, Deleo FR (2006) Maturation of human neutrophil phagosomes includes incorporation of molecular chaperones and endoplasmic reticulum quality control machinery. *Mol Cell Proteomics* 5: 620–634
- Cavalier-Smith T (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 297–354
- Cavalier-Smith T (2009) Predation and eukaryote cell origins: a coevolutionary perspective. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 307–322 Consortium TU (2009) The universal protein resource (UniProt) 2009. *Nucleic Acids Res* 37: D169–D174
- Cuttell L, Vaughan A, Silva E, Escaron CJ, Lavine M, Van Goethem E, Eid JP, Quirin M, Franc NC (2008) Undertaker, a Drosophila junctophilin, links Draper-mediated phagocytosis and calcium homeostasis. *Cell* 135: 524–534

Dacks JB, Poon PP, Field MC (2008) Phylogeny of endocytic components yields insight into the process of nonendosymbiotic organelle evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 588–593

Dafforn TR, Smith CJ (2004) Natively unfolded domains in endocytosis: hooks, lines and linkers. *EMBO Rep* 5: 1046–1052

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

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

Desjardins M, Houde M, Gagnon E (2005) Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev* 207: 158–165

Dieckmann R, Gopaldass N, Escalera C, Soldati T (2008) Monitoring time-dependent maturation changes in purified phagosomes from *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol* 445: 327–337

Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113

Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sucgang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P et al (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435: 43–57

Eisenberg E, Levanon EY (2003) Preferential attachment in the protein network evolution. *Phys Rev Lett* 91: 138701 Emes RD, Pocklington AJ, Anderson CN, Bayes A, Collins MO, Vickers CA, Croning MD, Malik BR, Choudhary JS, Armstrong JD, Grant SG (2008) Evolutionary expansion and anatomical specialization of synapse proteome complexity. *Nat Neurosci* 11: 799–806 Erickson HP (2007) Evolution of the cytoskeleton. *Bioessays* 29: 668–677

Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, Field MC, Kuo A, Paredez A, Chapman J, Pham J, Shu S, Neupane R, Cipriano M, Mancuso J, Tu H, Salamov A, Lindquist E, Shapiro H, Lucas S, Grigoriev IV et al (2010) The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* 140: 631–642

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

Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T, Bergeron JJ (2006) Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* 127: 1265–1281

Gotthardt D, Blancheteau V, Bosserhoff A, Ruppert T, Delorenzi M, Soldati T (2006) Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of α during uptake. *Mol Cell Proteomics* 5: 2228–2243

Gotthardt D, Warnatz HJ, Henschel O, Bruckert F, Schleicher M, Soldati T (2002) High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Mol Biol Cell* 13: 3508–3520

Grotzke JE, Harrieff MJ, Siler AC, Nolt D, Delepine J, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM (2009) The Mycobacterium tuberculosis phagosome is a HLA-I processing competent organelle. *PLoS Pathog* 5: e1000374

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

Hatherley D, Graham SC, Harlos K, Stuart DI, Barclay AN (2009) Structure of signal-regulatory protein α : a link to antigen receptor evolution. *J Biol Chem* 284: 26613–26619

Hedges SB (2009) Vertebrates (Vertebrata). In *The Timetree of Life*, Hedges SBaK, S (ed). pp 309–314. Oxford University Press, New York.

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

Hubbard TJ, Aken BL, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Clarke L, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Gordon L, Graf S, Haider S, Hammond M, Holland R, Howe K et al (2009) Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res* 37: D690–D697

Huerta-Cepas J, Bueno A, Dopazo J, Gabaldon T (2008) PhylomeDB: a database for genome-wide collections of gene phylogenies. *Nucleic Acids Res* 36: D491–D496

Huerta-Cepas J, Dopazo H, Dopazo J, Gabaldon T (2007) The human phylome. *Genome Biol* 8: R109

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

Jutras I, Houde M, Currier N, Boulais J, Duclos S, LaBoissiere S, Bonneil E, Kearney P, Thibault P, Paramithiotis E, Hugo P, Desjardins M (2008) Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics* 7: 697–715

Kasahara M, Suzuki T, Pasquier LD (2004) On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends Immunol* 25: 105–111

Kerrien S, Alam-Faruque Y, Aranda B, Bancarz I, Bridge A, Derow C, Dimmer E, Feuermann M, Friedrichsen A, Huntley R, Kohler C, Khadake J, Leroy C, Liban A, Lieftink C, Montecchi-Palazzi L, Orchard S, Risse J, Robbe K, Roehert B et al (2007) IntAct—open source resource for molecular interaction data. *Nucleic Acids Res* 35: D561–D565

Kersey PJ, Duarte J, Williams A, Karavidopoulou Y, Birney E, Apweiler R (2004) The International Protein Index: an integrated database for proteomics experiments. *Proteomics* 4: 1985–1988

Landry CR, Levy ED, Michnick SW (2009) Weak functional constraints on phosphoproteomes. *Trends Genet* 25: 193–197

Li J, Rechsteiner M (2001) Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators. *Biochimie* 83: 373–383

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

Mushegian A, Medzhitov R (2001) Evolutionary perspective on innate immune recognition. *J Cell Biol* 155: 705–710

Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, Virgin HW, Kyei GB, Johansen T, Vergne I, Deretic V (2010) Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity* 32: 329–341

Raman C (2002) CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance. *Immunol Res* 26: 255–263

Rechsteiner M, Hill CP (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 15: 27–33

Rogers LD, Foster LJ (2007) The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18520–18525

Ruan J, Li H, Chen Z, Coghlan A, Coin LJ, Guo Y, Heriche JK, Hu Y, Kristiansen K, Li R, Liu T, Moses A, Qin J, Vang S, Vilella AJ, Ureta-Vidal A, Bolund L, Wang J, Durbin R (2008) TreeFam: 2008 Update. *Nucleic Acids Res* 36: D735–D740

Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S, Green DR (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450: 1253–1257

Savan R, Ravichandran S, Collins JR, Sakai M, Young HA (2009) Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 115–124

Sepulcre MP, Alcaraz-Perez F, Lopez-Munoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML, Mulero V (2009) Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J Immunol* 182: 1836–1845

Silva E, Au-Yeung HW, Van Goethem E, Burden J, Franc NC (2007) Requirement for a *Drosophila* E3-ubiquitin ligase in phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 27: 585–596

Stuart LM, Boulais J, Charriere GM, Hennessy EJ, Brunet S, Jutras I, Goyette G, Rondeau C, Letarte S, Huang H, Ye P, Morales F, Kocks C, Bader JS, Desjardins M, Ezekowitz RA (2007) A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature* 445: 95–101

Stuart LM, Ezekowitz RA (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* 8: 131–141

Thingholm TE, Jorgensen TJ, Jensen ON, Larsen MR (2006) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat Protoc* 1: 1929–1935

Tompa P (2005) The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* 579: 3346–3354

Trost M, English L, Lemieux S, Courcelles M, Desjardins M, Thibault P (2009) The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* 30: 143–154

True JR, Carroll SB (2002) Gene co-option in physiological and morphological evolution. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 53–80

Tweedie S, Ashburner M, Falls K, Leyland P, McQuilton P, Marygold S, Millburn G, Osumi-Sutherland D, Schroeder A, Seal R, Zhang H (2009) FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res* 37: D555–D559

Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, Jones DT (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* 337: 635–645

Wickstead B, Gull K, Richards TA (2010) Patterns of kinesin evolution reveal a complex ancestral eukaryote with a multifunctional cytoskeleton. *BMC Evol Biol* 10: 110

Yates RM, Hermetter A, Taylor GA, Russell DG (2007) Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* 8: 241–250

Yutin N, Wolf MY, Wolf YI, Koonin EV (2009) The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct* 4: 9

12.9 Figure legends

Figure 1. Shared components define the ‘ancient’ phagosome. (A) Predicted orthologs of phagosome proteins of Dictyostelium, Drosophila, and mouse were analyzed by BLAST against the two other species and mapped according to $-\text{Log}_{10}(\text{e-value})$, where 0 indicates the absence of an ortholog and 181 a perfect alignment. Four distinct groups of proteins are highlighted for each organism: (1) a set of orthologs shared by the three organisms defining the ‘ancient’ phagosome (blue data points outside the x and y axes), (2 and 3) groups of conserved proteins shared only between the plotted organism and one of the two others found on the x or y axis (green or red data points), and (4) a set of proteins unique to the plotted organism (purple data points at the origin of the graph). As several data points may overlay in the scatter plot, a histogram below each plot reports the relative distribution of proteins among the four distinct groups of proteins. (B) Annotation of a function to each protein of the mouse proteome highlights the level of conservation of relevant phagosome functions among the three organisms. Although a large proportion of the proteins associated with functions such as ‘membrane trafficking,’ ‘small GTPases’ and ‘cytoskeleton’ are majorly shared by the three organisms, some like ‘membrane receptors’ and ‘immunity’ are more specific to mouse and Drosophila phagosomes. See also **Supplementary Figure S1** and **Datasets 4–6**.

Figure 2: Origin of the mouse phagosome proteome. Comparative analyses of the mouse phagosome proteome among 39 taxa identified the origin of each protein. **A**, Proportions (in %) of the evolutionary origin of the mouse phagosome proteome are reported through four major evolutionary groups of proteins: phagotrophy (Eukaryota, Amoebozoa and Fungi), innate immunity (Bilateria, Coelomata and Chordata), early (Euteleostomi) and late adaptive immunity (Tetrapoda and beyond). **B**, Comparison between the evolutionary origin of the mouse phagosome proteins and the entire mouse proteome (reported by their relative proteome proportion in %) through a cladistic distribution (X axis) reveals that phagosomes are of ancient origin. The inbound graph shows the same proteome proportion in % through a cladistic distribution under the four major evolutionary groups of proteins reported in **a** : phagotrophy (Ph.), innate immunity (In.), early adaptive (E.A.) and late adaptive immunity (L.A.). **C**, Comparative functional analysis of the mouse phagosome proteins reveals that specific phagosomal functions originated from different stages of evolution. The function «Others» contains the merging of remaining functions and numbers indicate the amount of proteins found in each function. **D**, Specific examples of proteins originating at the four major evolutionary groups are found in dash boxes. See also **Dataset 7**.

Figure 3: Novel components of the mouse phagosome emerged through two major periods of gene duplication. **A**, Of 952 pairs of duplicated genes encoding for mouse phagosomal proteins, the vast majority of these genes have their origin in the phagotrophy stage of evolution. **B**, Proportional representation of the origin of gene duplication events on the phagosome and the whole mouse genome shows that duplication of genes encoding mouse phagosomal proteins occurred mainly in Bilateria (emergence of innate immunity) and Euteleostomi (emergence of adaptive immunity), while gene duplication in the whole murine genome occurred more evenly throughout evolution. **C**, Functional analysis of phagosomal proteins duplicated originally in bilaterians and euteleosts reveals a preference for small GTPases, signaling, and proteins involved in cellular trafficking. The function «Others» contains the merging of remaining functions. See also **Figure S3** and **Dataset 8**.

Figure 4: Evolution of the phagosome phosphoproteome. **A**, Alignment of mouse phagosomal phosphoproteins revealed strong conservation of phosphosites within mammals, but fewer phosphosites are conserved across vertebrates, chordates and tetrapods. In proportion, a larger fraction of conserved phosphosites (in red) is observed in ordered regions compared to disordered regions. **B**, Phosphosites modulated by IFN- γ are on average as conserved as other phosphorylated residues in vertebrates but not in tunicates or *Drosophila*. **C**, Comparative alignment of conserved mouse, *Drosophila* and *Dictyostelium* phagosomal phosphoproteins identified by MS revealed that the majority (near 66% - doughnut plot) of phosphosites are not conserved (blue), indicating that the mouse phagosome phosphoproteome is globally recent in evolution. Still, around 33% of mouse phosphosites are phosphorylatable (red) in *Drosophila* or *Dictyostelium*. Of these, 12.8% and 5.0% phosphosites were observed to be phosphorylated (green) in *Drosophila* and *Dictyostelium* phagosomes respectively (Obs.). These phosphosites are 8 and 12-times more conserved compared to random S/T/Y (expected, Exp.) of the same phosphoproteins in *Drosophila* and *Dictyostelium* respectively. Bars indicate 95% confidence interval.

Figure 5: Evolution of the phagosome proteins network. Experimental data from the Intact database and curated entries of the UniProt database were used to generate a network from protein-protein interactions of identified mouse phagosomal proteins. From the total network, subnetworks of cytoskeleton and vesicle trafficking proteins **(A)** and immunity-related proteins **(B)** were extracted, showing the evolutionary mixed origin of most protein complexes and the addition of novel modules such as the MHC class I and II presentation machinery, the receptor signaling, the NADPH oxidase complex or the Ena/VASP complex to the phagosome in evolutionary steps of adaptive and innate immunity, respectively. Duplicated proteins of which both paralogs have been identified by MS/MS on mouse phagosomes are circled in blue. **(C)** Example how duplication might affect phagosome function: (immuno-) proteasome activator complex subunits PSME1 (PA28 α) and PSME2 (PA28 β) were duplicated with the appearance of jawed fishes, coinciding with the emergence of adaptive immunity. During this duplication event PSME1 gained a KEKE-motif that was not present in the common ancestor. KEKE-motifs have been described to interact with each other and are also present in several chaperones including Calnexin (Li & Rechsteiner, 2001; Rechsteiner & Hill, 2005). It is likely that introduction of the KEKE-motif in PSME1 might locate the immunoproteasome to Calnexin and the MHC class I presentation machinery, thereby enhancing antigen presentation efficiency.

Figure 6: Role of molecular machines of mixed origin in phagosome functions.

Many of the functional properties of mammalian phagosomes involve molecular machines made of proteins that emerged at different periods during evolution. For example, in the context of antigen cross-presentation, key steps such as phagosome/endosome fusion, the killing of microbes and their degradation into peptides, as well as their loading on MHC class I molecules are made possible by proteins that appeared in organisms where the phagosome plays its main role in phagotrophy (green proteins), innate immunity (yellow proteins), and adaptive immunity (red proteins). Remarkably, the emergence of a cytokine such as IFN- γ in teleosts, more than 1.2 billion years after the emergence of phagotrophy (Bhattacharya, 2009), allowed the fine-tuning of the expression and/or phosphorylation of proteins of each of these groups (red shadow). Early endosome (EE), late endosome (LE), lysosome (Ly) and endoplasmic reticulum (ER).

Figure S1: Conservation of phagosome proteins of mouse, Drosophila and Dictyostelium identified by mass spectrometry. A) Cross-species comparison from predicted orthologs of MS/MS Identified mouse phagosome proteins were performed against identified MS/MS phagosome proteins in drosophila (641 proteins presented in blue), dictyostelium (282 proteins presented in blue) and both Drosophila and Dictyostelium (225 proteins presented in blue). Already published proteomics data were added to the analysis and lead to the identification of additional orthologs in Drosophila (46 proteins presented in red), dictyostelium (144 proteins presented in red) and both Drosophila and Dictyostelium (65 proteins presented in red) (Gotthardt *et al*, 2006; Stuart *et al*, 2007). To investigate if a limited sampling by MS could have influenced the interspecies comparison, we analyzed the identification rates of different phagosomal functions in B) Drosophila and C) Dictyostelium phagosomes. As identification rates of only selected protein functions in Drosophila and Dictyostelium phagosomes are significantly lower than in mouse phagosomes, a limitation by MS sampling appears unlikely. It rather appears that although many orthologous proteins of the functions “Membrane Receptors”, “Hydrolases” and “Immunity” are present in the genomes of dictyostelium and drosophila, they do not translocate to the phagosomes in the respective species yet.

Figure S3: Gene duplications events of smooth and rough endoplasmic reticulum (RER and SER) proteins and Drosophila phagosome proteome. **A)** Comparison between the origin of paralogs of the rough and smooth endoplasmic reticulum proteome (Gilchrist *et al*, 2006) against the whole rat genome shows lesser differences than what is observed with the mouse phagosome proteome versus the mouse genome (**Figure 3b**). **B)** Comparison between the origin of paralogs of the Drosophila phagosome proteome and the whole drosophila genome showed a significant gene duplication event in bilateria for phagosomal proteins, while the majority of gene duplication events in drosophila are lineage-specific.

Figure S4: Evolutionary origin of IFN- γ -regulated phosphoproteins of mouse phagosome and conservation of phosphorylation sites within the phagosome phosphoproteomes of mouse, *Drosophila* and *Dictyostelium*. **B)** Phylogenetic analyses revealed that 66.1% and 15.8% of the phagosomal proteins differentially phosphorylated upon IFN- γ activation originated in the phagotrophy and innate immunity stage, while 10.6% and 7.5% appear in the early and late adaptive immunity stages respectively. The proteins regulated by IFN- γ are therefore considerably more recent than average phagosomal proteins (**A**). Still, more than 80% of regulated phosphoproteins have their origin before the emergence of IFN- γ in Teleosts, indicating that the appearance of this cytokine during evolution enabled also the modulation of ancient phagosome proteins in ways not possible in basal organisms. **C)** Phagosomal phosphoproteins conserved within the three species were aligned and compared against each species. The alignments revealed that a majority (near 66%) of phosphosites are not conserved (blue), indicating that the mouse phagosome phosphoproteome is globally recent in evolution. About 33% of the residues are conserved with phosphorylatable residues (red) in the three organisms, of which only about 10% and 5% were actually identified to be phosphorylated in *Drosophila* and *Dictyostelium* phagosomes respectively (green). Although this appears low, these phosphosites are significantly more conserved when compared to random S/T/Y of the same phosphoproteins among the three species. Bars indicate 95% confidence interval.

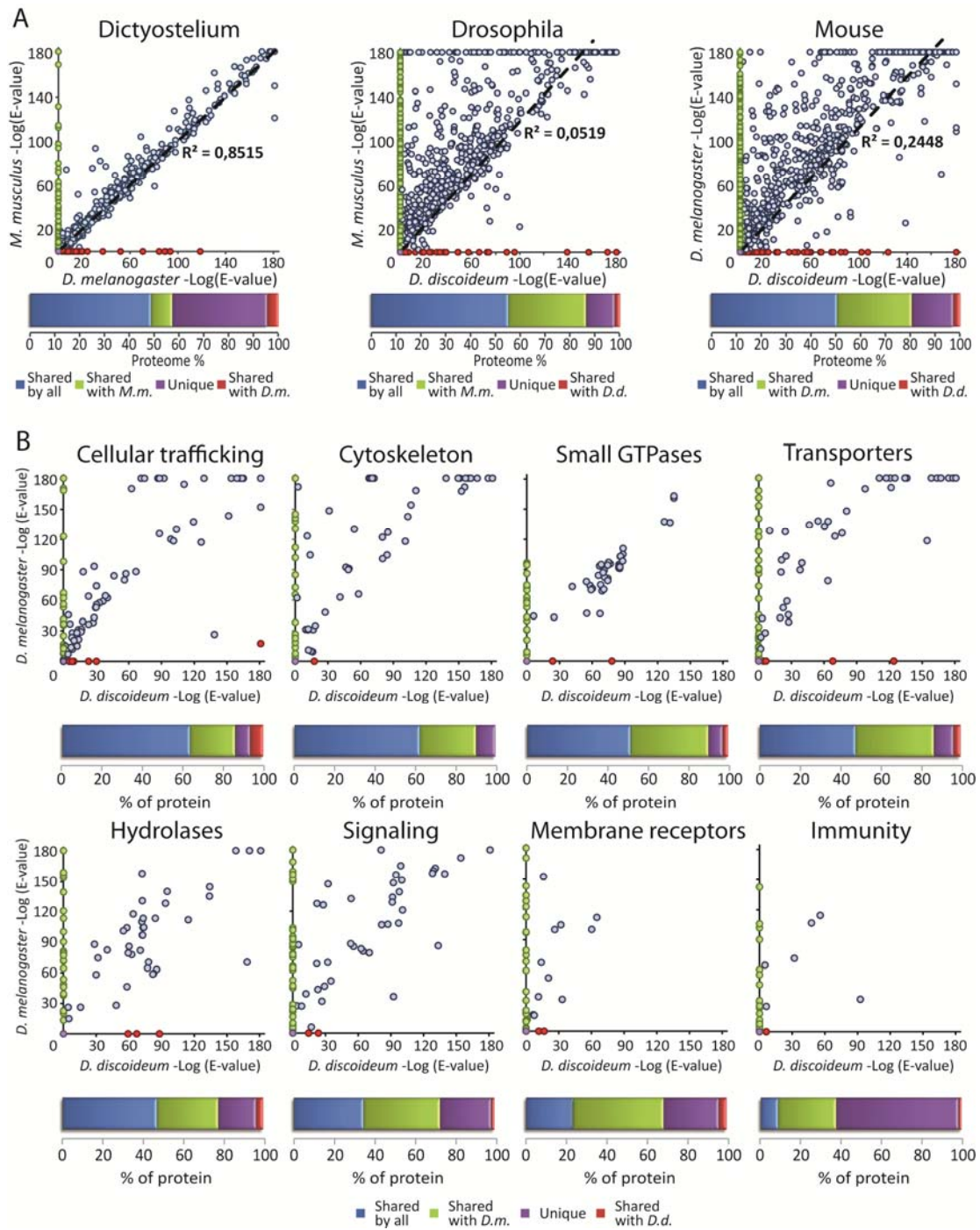


Figure 1. Shared components define the ‘ancient’ phagosome.

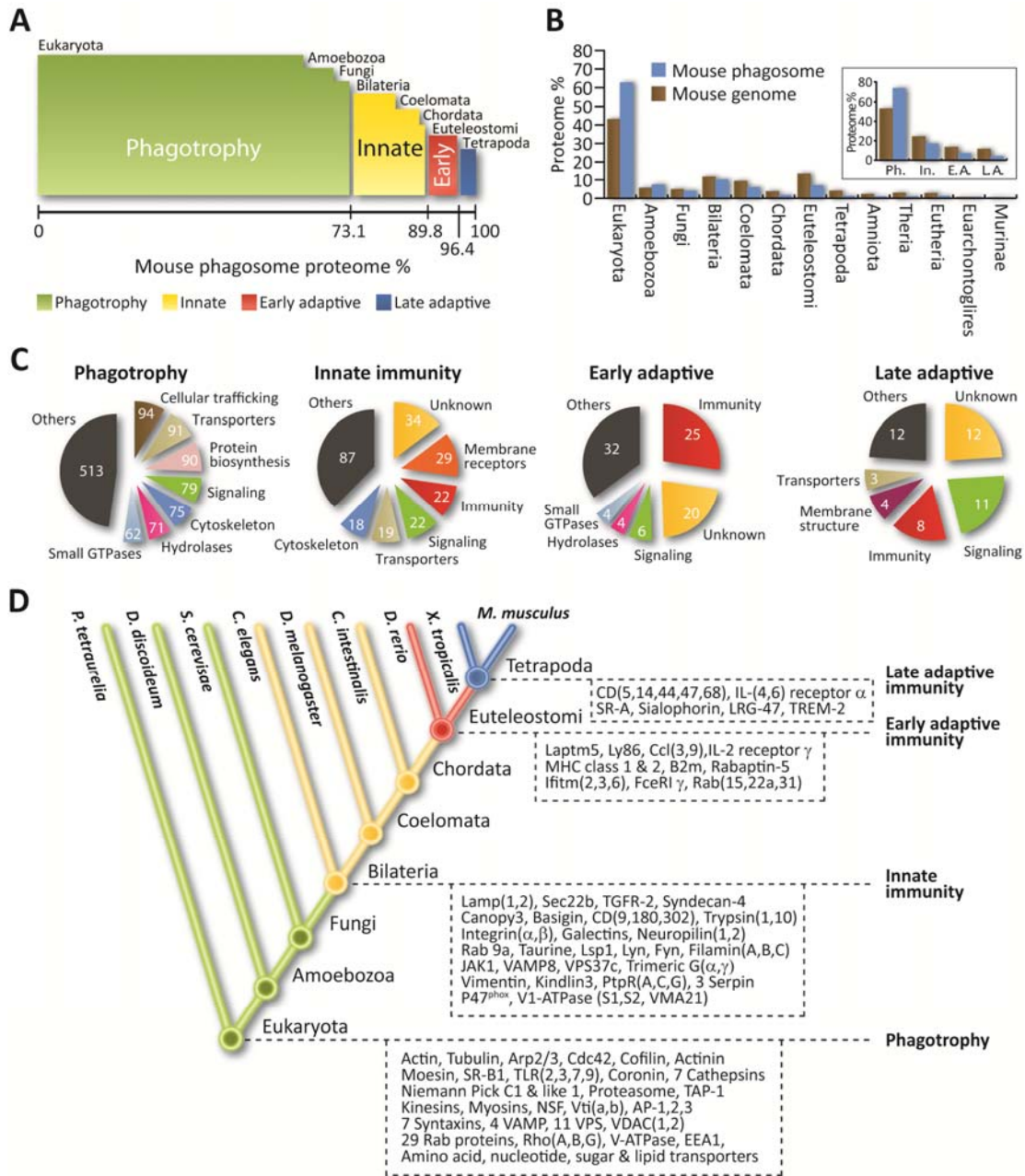


Figure 2. Origin of the mouse phagosome proteome.

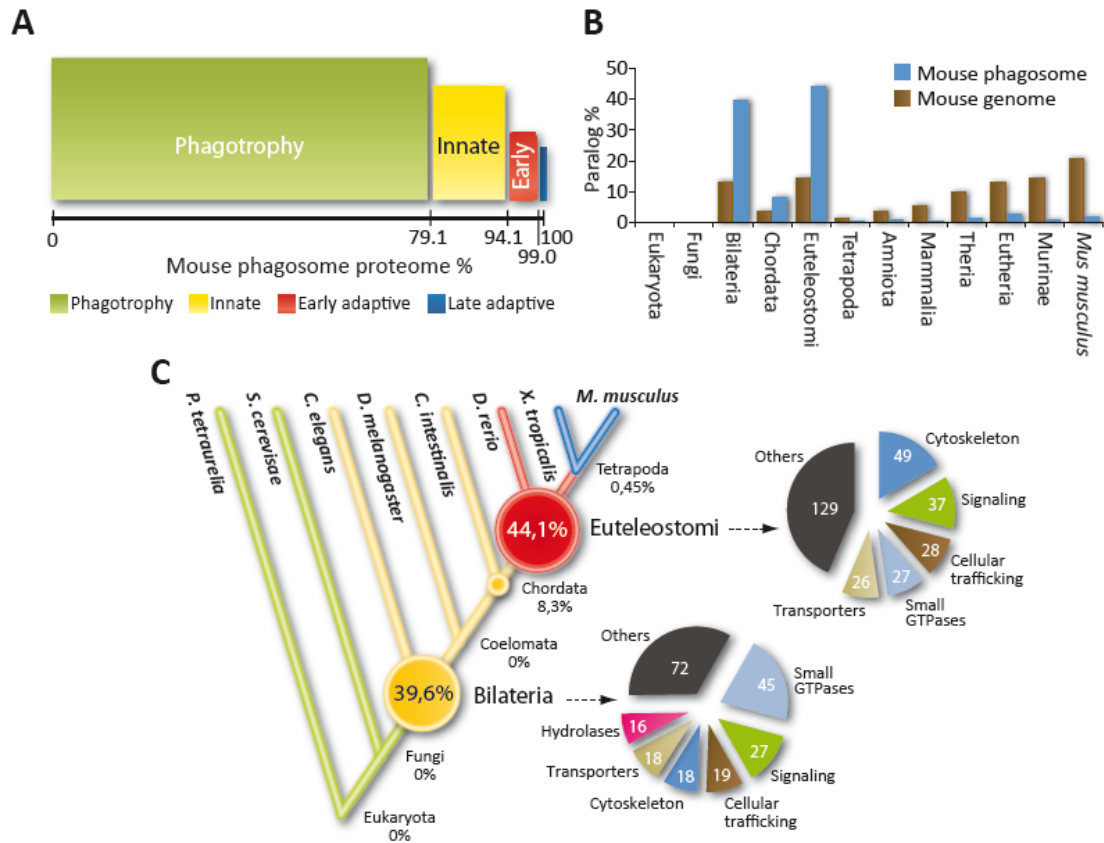


Figure 3. Novel components of the mouse phagosome emerged through two major periods of gene duplication.

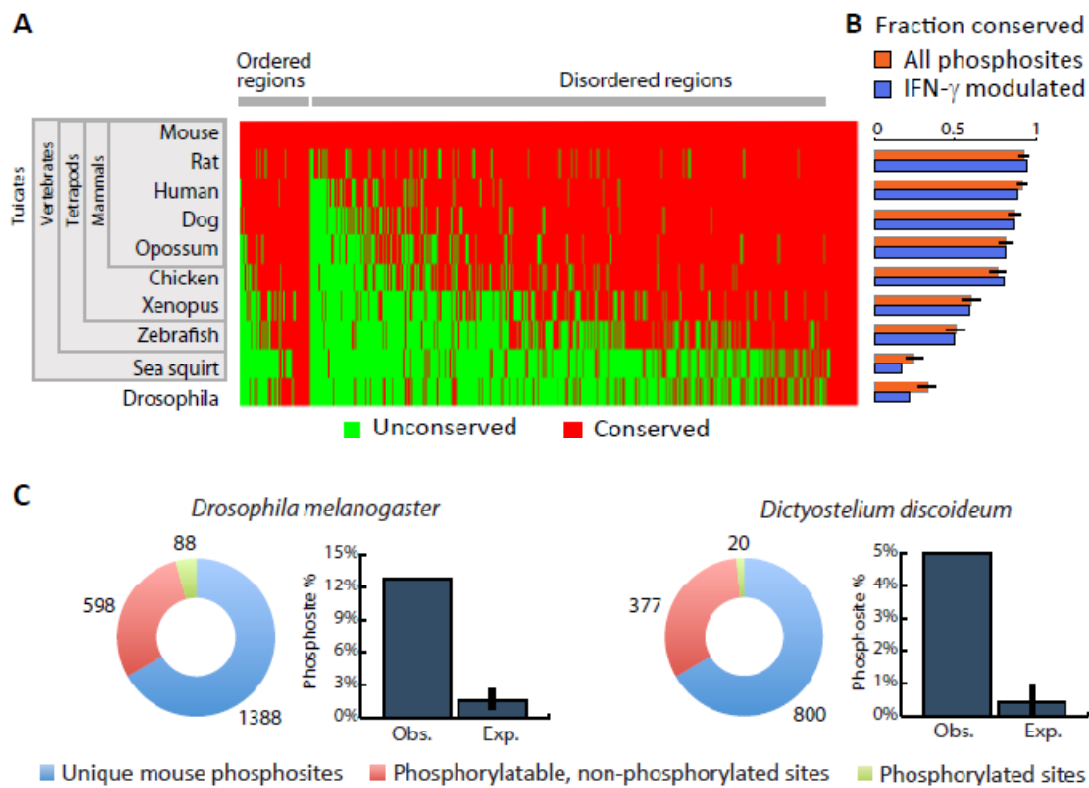


Figure 4. Evolution of the phagosome phosphoproteome.

Tableau I | Interaction levels of the phagosome network within different phagocytosis purpose

	Nodes	Edges (Degree)	vs. Phagotrophy	vs. Innate	vs. Adaptive
Phagotrophy	864	2,387 (2.76)	1589 (1.84)	511 (0.59)	287 (0.33)
Innate immunity	243	723 (2.98)	511 (2.10)	118 (0.49)	94 (0.39)
Adaptive immunity	151	419 (2.77)	287 (1.90)	104 (0.62)	38 (0.25)
Total network	1,258	2,637 (2.10)			

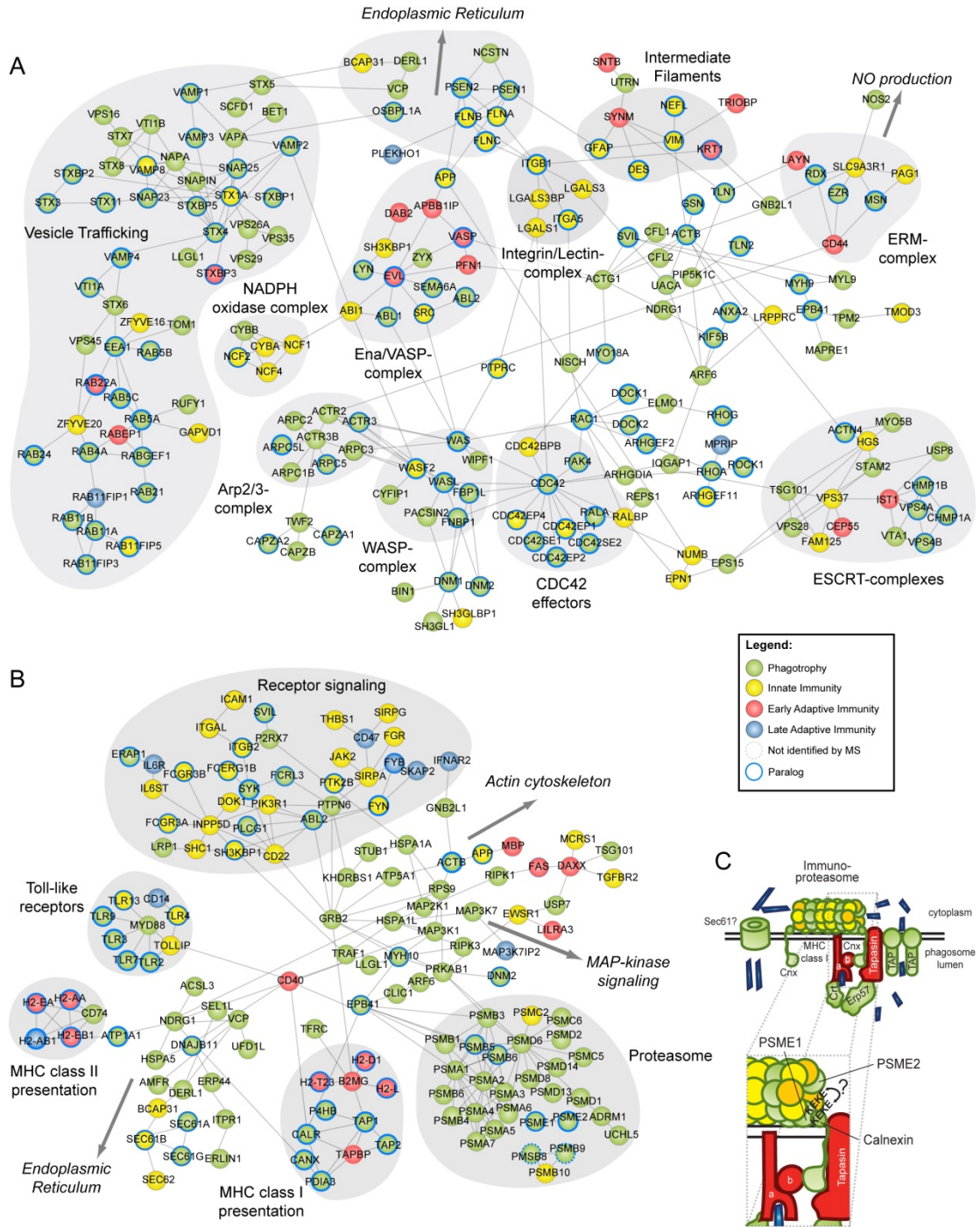


Figure 5. Evolution of the phagosome proteins network.

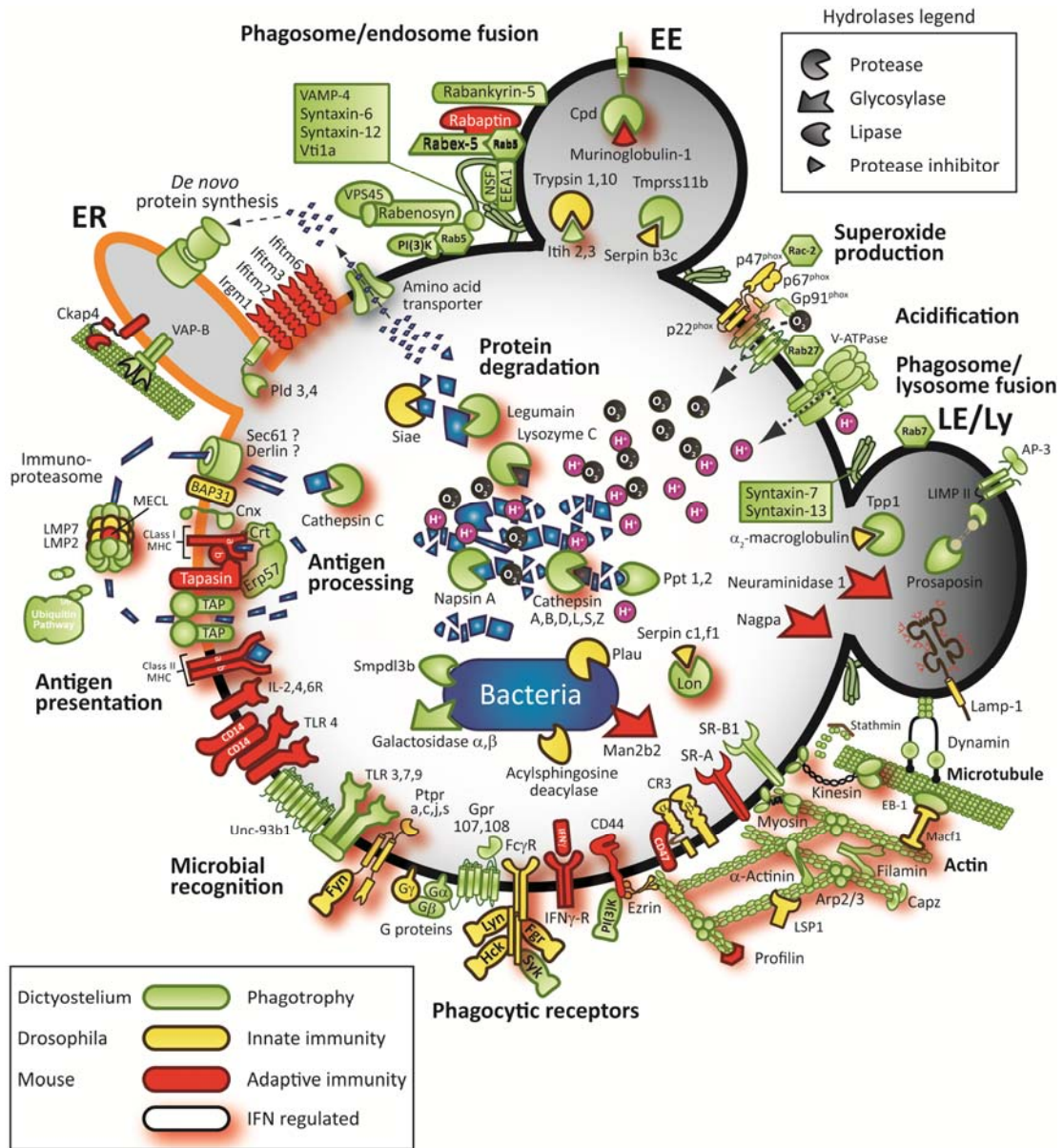


Figure 6. Role of molecular machines of mixed origin in phagosome functions.

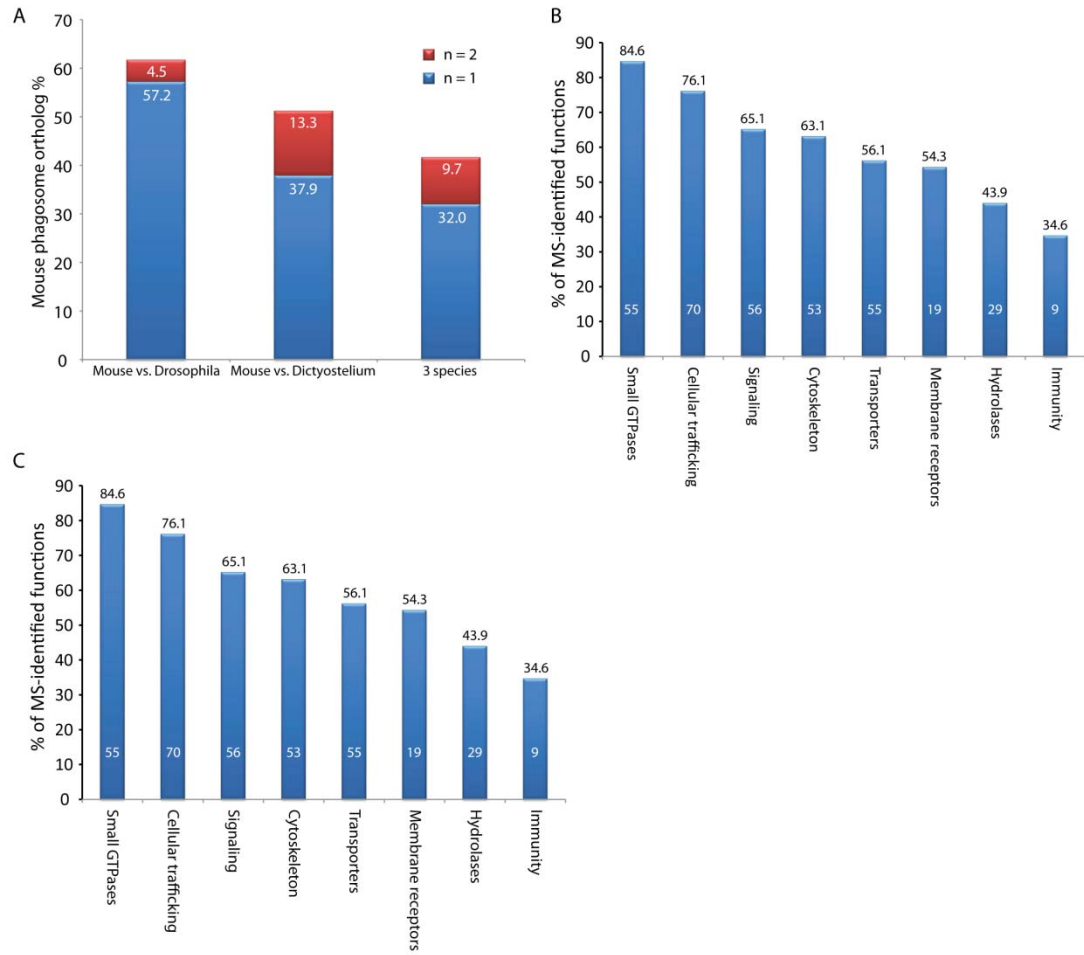


Figure S1. Conservation of phagosome proteins of mouse, Drosophila and Dictyostelium identified by mass spectrometry.

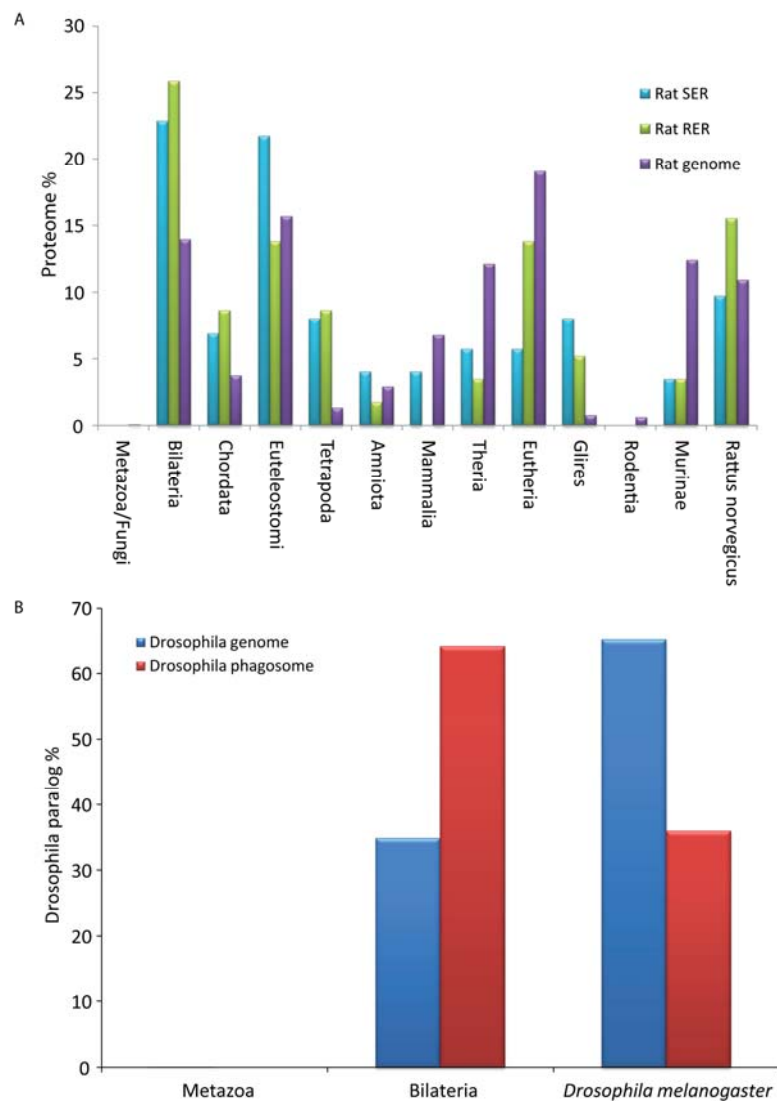


Figure S3. Gene duplications events of smooth and rough endoplasmic reticulum (RER and SER) proteins and *Drosophila* phagosome proteome.

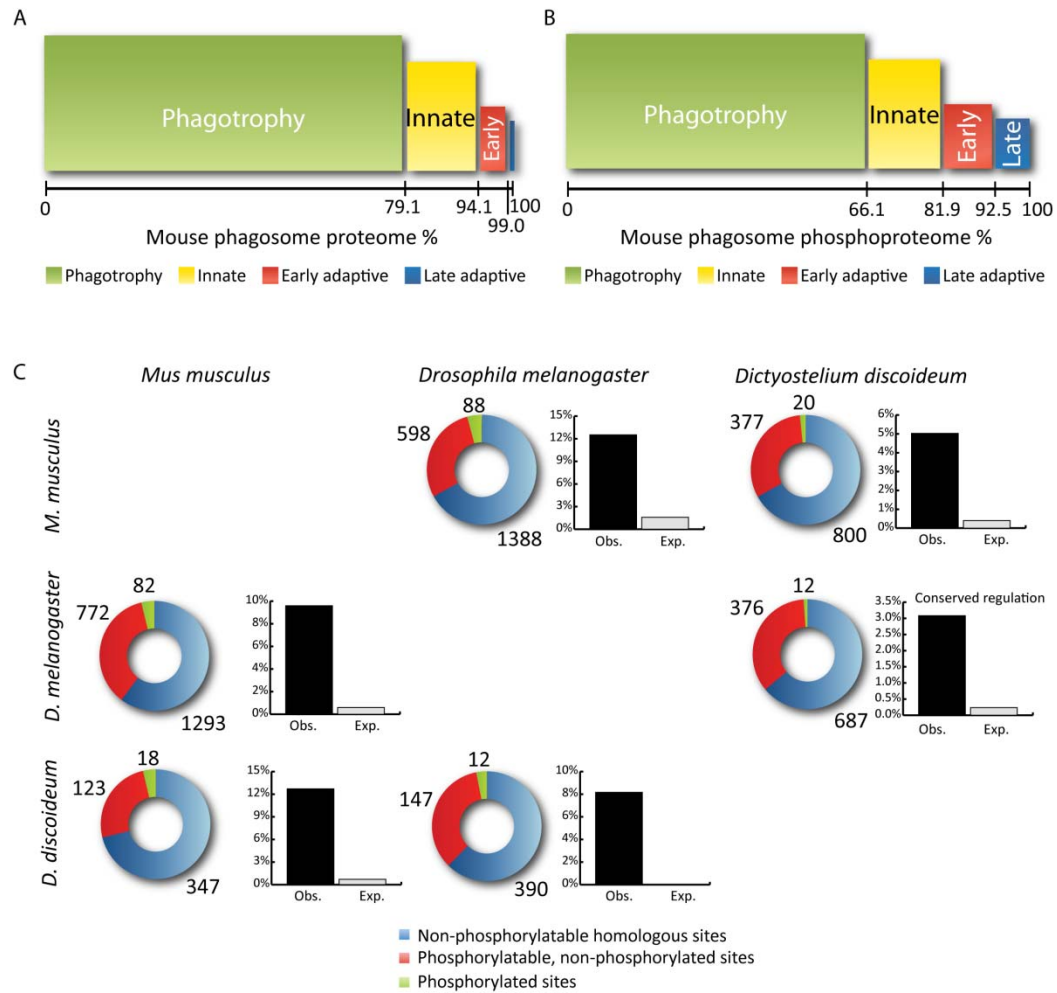


Figure S4. Evolutionary origin of IFN- γ -regulated phosphoproteins of mouse phagosome and conservation of phosphorylation sites within the phagosome phosphoproteomes of mouse, *Drosophila* and *Dictyostelium*.

CHAPITRE 3 : Discussion

Discussion générale

12.10 La protéomique dans l'étude de la phagocytose

La phagocytose est sans contredit un mécanisme clé de la défense immunitaire, puisqu'elle permet de générer une organelle, le phagosome, à partir duquel divers processus immunitaires tels que la destruction microbienne et la présentation antigénique sont initiés. À travers l'évolution, certains pathogènes ont développé des mécanismes ingénieux et efficaces pour échapper au système immunitaire en se camouflant à l'intérieur des phagocytes. Connaître de façon approfondie le fonctionnement de ces processus s'avère essentiel à la compréhension des divers aspects de l'immunité innée et acquise. Malgré le rôle crucial de cette organelle dans la réponse immunitaire, peu de détails sont connus concernant la composition et l'organisation fonctionnelle impliquées lors de la formation et de la maturation du phagosome. Afin de pallier à cette lacune, notre laboratoire avait entamé, préalablement à cette thèse, la caractérisation protéomique du phagosome murin (Brunet *et al*, 2003; Garin *et al*, 2001). Pionnières, ces publications ont révélé les premières listes de protéines associées au phagosome sans toutefois déterminer leur(s) rôle(s) au niveau des différents processus moléculaires de la phagocytose. Plusieurs études fonctionnelles se sont inspirées de ces listes protéomiques afin de générer divers modèles biologiques qui ont subséquentement mené à la découverte de nouvelles fonctions associées au phagosome (Dermine *et al*, 2001; Gagnon *et al*, 2002; Gueirard *et al*, 2008; Houde *et al*, 2003; Jutras *et al*, 2005). Innovatrices, ces publications illustrent bien que l'élaboration de modèles biologiques, à partir de données protéomiques, peut s'avérer une stratégie efficace dans la caractérisation fonctionnelle de la phagocytose.

12.11 L'analyse de la phagocytose chez la drosophile par biologie systémique

La vérification de modèles biologiques inspirés de données protéomiques nécessite classiquement diverses techniques de biologie cellulaire et peut s'avérer longue et laborieuse. Différentes approches de criblage à haut débit peuvent cependant être utilisées afin d'étudier plus globalement un ensemble de protéines comme celles du phagosome identifiées par protéomique (Ramet *et al*, 2002). Au cours de la première étude de cette thèse (Stuart *et al*, 2007), nous avons caractérisé le protéome du phagosome de la drosophile en combinant diverses techniques de criblage à haut débit (protéomique, réseaux d'interactions protéique et ARN interférent) afin d'identifier des joueurs clés du processus d'internalisation de la phagocytose. En utilisant cette approche, nous avons identifié 617 protéines phagosomales par spectrométrie de masse à partir desquelles nous avons construit des réseaux d'interactions protéique. Positionnées comme point d'ancrage (composé primaire), les protéines phagosomales cartographiées ont mené à l'expansion du réseau par l'identification de composés secondaires ; des protéines potentiellement non-identifiées par protéomique mais prédites pour interagir avec les composés primaires du réseau. La construction d'un tel interactome nous a permis de structurer les données protéomiques sous forme de biomodules fonctionnels, en plus de récupérer certains faux-négatifs engendrés par les limitations de la spectrométrie de masse (sous-échantillonnage, sensibilité et peptides hydrophobes) ou de l'échantillon (recrutement transitoire de certaines protéines à l'organelle ou des protéines cargo spécifiques) (Mallick & Kuster, 2010; Manadas *et al*, 2010; Nilsson *et al*, 2010). La cohérence du réseau est d'ailleurs confirmée par un ensemble de classes fonctionnelles préalablement reconnues pour leur(s) rôle(s) au niveau de la phagocytose et de la maturation du phagosome. C'est le cas notamment des Rabs, des régulateurs d'actine, du protéasome et des chaperones (Houde *et al*, 2003; Lee *et al*, 2005; Underhill & Ozinsky, 2002). Toutefois, il est aussi possible d'y retrouver un ensemble intéressant de classes fonctionnelles dont le ou les rôles sont inconnu(s) dans le contexte de la phagocytose. Ces classes comprennent une myosine (didum),

le complexe T Chaperonin-containing, ainsi que le complexe de l'exocyst impliqué dans le contrôle d'événements de pré-fusion vésiculaire lors de l'exocytose à la membrane plasmique (**voir section 10.3**).

L'application combinée de techniques de criblage à haut débit semble nettement efficace dans l'étude des processus complexes de la phagocytose ainsi que pour l'identification de nouvelles fonctions. Le criblage par ARN interférent à haut débit de 837 gènes provenant des réseaux d'interactions protéique du phagosome couplé à un essai de phagocytose par tri cellulaire à fluorescence activée indique que 28 % de ces gènes cibles participent significativement au processus d'internalisation de la phagocytose. Ce niveau représente un gain surpassant 5 fois le criblage précédent par ARN interférent aléatoire (Ramet *et al*, 2002) et démontre la pertinence et la puissance d'une telle analyse interdisciplinaire dans l'étude de la complexité de la phagocytose. La combinaison de techniques de criblage à haut débit nous a permis d'apporter de nouveaux concepts sur l'organisation fonctionnelle du phagosome tout en créant un cadre à partir duquel il est possible d'approfondir nos connaissances sur les différents mécanismes de la phagocytose.

12.12 Le complexe de l'exocyst est associé au phagosome

L'exocyst est un complexe de huit sous-unités conservé à travers l'évolution qui prépare les événements pré-fusionnels d'exocytose vésiculaire aux sites actifs de sécrétion de la membrane plasmique. En plus de ce rôle, les composants de l'exocyst sont concentrés au niveau des endosomes de recyclage régulant le recyclage de récepteurs en plus de distribuer la membrane nécessaire aux aires d'expansions localisées de la membrane plasmique (Prigent *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2004).

Bien que le complexe de l'exocyst n'ait jamais été identifié au niveau du phagosome, six de ses huit composants ont été identifiés chez la drosophile par notre analyse protéomique (Stuart *et al*, 2007). Étonnement, ces six sous-unités sont regroupées au sein du plus grand ensemble interactif de l'interactome du phagosome.

Malgré cette primeur, des évidences indirectes préalables à notre découverte semblaient indiquer une participation potentielle de l'exocyst au niveau du processus de la phagocytose. En effet, les sous-unités Sec10 et Sec15 semblent interagir respectivement avec ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) et Rab11, deux petites GTPases qui régulent le recrutement d'endosomes et de membrane à la coupe phagocytaire (Bajno *et al*, 2000; Cox *et al*, 2000; Niedergang *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2004). Nos données d'immunofluorescence et d'immunobuvardage confirment clairement la présence de sous-unités de l'exocyst au niveau des phagosomes de mammifères et de la drosophile. Cette observation suggère d'ailleurs une conservation évolutive du rôle de l'exocyst lors de la phagocytose. Ce complexe serait plus précisément impliqué dans l'apport de récepteurs ou dans le recrutement membranaire. Toutefois, nos données d'ARN interférent indiquent que l'exocyst ne semble nullement impliqué dans la reconnaissance bactérienne et de ce fait, qu'il ne joue aucun rôle dans le transport de récepteurs vers la membrane plasmique. Ce complexe interviendrait plutôt au niveau du processus d'internalisation, puisque l'ARN interférent des sous-unités Sec8, Sec10 et Sec15 affecte significativement la phagocytose des deux types bactériens *S. aureus* et *E. coli* par une réduction de 25 à 30% de l'internalisation. Étonnamment, les sous-unités Sec3, Sec5 et Exo70 traités par ARN interférent semblent contribuer différemment à la phagocytose de ces deux variétés bactériennes, ce qui serait expliqué par l'assemblage de sous-complexes variés de l'exocyst (Boyd *et al*, 2004; Mehta *et al*, 2005). Puisque les composants Sec3 et Exo70 sont distinctement localisés à la membrane plasmique (Boyd *et al*, 2004), il serait possible que Sec3 et Exo70 soient recrutés en fonction du type de récepteur engagé afin d'offrir au reste du complexe un repère d'arrimage distinct sous la coupe phagocytaire pour le ciblage vésiculaire. Une étude récente semble démontrer que la sous-unité Exo70 s'accumule à la membrane plasmique au site d'invasion de *Salmonella typhimurium* et induit le recrutement de nouvelles membranes (fronçage ou « ruffling ») via le complexe de l'exocyst (Braun & Brumell, 2010; Nichols & Casanova, 2010). Ce recrutement semble impliquer la GTPase RalA, un effecteur bien connu de l'exocyst puisqu'elle interagit avec les sous-unités Sec5 et Exo84 (Jin *et al*, 2005; Spiczka & Yeaman, 2008).

Selon nos données, l'exocyst semblerait effectuer des rôles supplémentaires au niveau du phagosome mature, puisque les sous-unités Sec6 et Sec8 s'accumulent avec la maturation du phagosome. Est-ce que ces sous-unités participent aux événements de fusion entre le phagosome et les vésicules de la voie endo-lysosomale lors de la maturation du phagosome et/ou contribuent à l'apport membranaire par fusion vésiculaire lors du processus d'initiation de la phagocytose ? Est-ce que le complexe de l'exocyst participe au recrutement du réticulum endoplasmique au cours de la phagocytose ? Jusqu'à ce jour, ces rôles potentiels représentent de bonnes hypothèses, mais demeurent inconnus et nécessitent une investigation approfondie.

12.13 Analyses protéomiques des phagosomes de l'amibe, la drosophile et la souris

Comme il est possible d'observer au cours du premier article de cette thèse, la phagocytose est un mécanisme hautement conservé à travers l'évolution. L'environnement dégradatif retrouvé au niveau de la lumière du phagosome est utilisé chez les amibes en tant que mécanisme de prédation et de nutrition. Les organismes multicellulaires utilisent toutefois la phagocytose comme processus de défense afin d'éliminer les microorganismes infectieux ainsi que dans l'initiation de la réponse immunitaire acquise chez les vertébrés à mâchoire. Malgré la présence de mécanismes fortement conservés lors de la phagocytose chez les eucaryotes, certains événements évolutifs semblent avoir contribué au remodelage fonctionnel du phagosome au niveau de sa capacité à relier l'immunité innée et l'immunité acquise chez les vertébrés à mâchoire. Néanmoins, ces mécanismes moléculaires ayant contribué à l'émergence de nouvelles fonctions phagosomales à travers l'évolution sont très peu connus. Dans le deuxième article de de cette thèse (Boulais *et al*, 2010), nous avons entrepris la première analyse protéomique et phosphoprotéomique comparative de phagosomes provenant de trois organismes évolutivement distants (*Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster* et *mus musculus*) et chez lesquels la phagocytose est utilisée à des fins distinctes. En utilisant un des plus

précis et des plus sensibles spectromètres de masse disponible jusqu'à ce jour (Orbitrap), nous avons identifié 818 protéines chez l'amibe, 1132 protéines chez la drosophile et 1391 protéines chez la souris. Comparé aux analyses protéomiques antérieures (Garin *et al*, 2001; Gotthardt *et al*, 2006; Jutras *et al*, 2008; Rogers & Foster, 2007; Stuart *et al*, 2007), nos analyses protéomiques surpassent de deux à quatre fois le nombre de protéines préalablement identifiées, procurant une couverture protéomique inégalée de cette organelle.

12.14 Comparaison protéomique des phagosomes de l'amibe, de la drosophile et de la souris

Les positions phylogénétiques des trois espèces à l'étude nous révèlent que la souris et la drosophile sont plus près phylogénétiquement qu'envers l'amibe *Dictyostelium*. Similaire à ces relations, les protéomes des phagosomes de la souris et de la drosophile démontrent aussi une relation phylogénétique plus intime que celle qu'ils partagent avec celui de l'amibe *Dictyostelium*. Toutefois, nos données indiquent qu'une certaine proportion de protéines semble maintenue de l'amibe à la souris et représenterait une relique évolutive du protéome du phagosome de l'ancêtre commun de ces trois espèces. L'analyse fonctionnelle de ce sous-ensemble hautement conservé révèle que ces protéines sont principalement des composants du cytosquelette, des protéines associées au trafic cellulaire, ainsi que des petites GTPases. La forte conservation de ces fonctions pourrait être expliquée par l'implication hypothétique de ces protéines au cours de l'émergence de la phagocytose chez les cellules pré-eucaryotiques (Cavalier-Smith, 2009; Jekely, 2003; Yutin *et al*, 2009). À l'opposé, d'autres groupes fonctionnels tels que des récepteurs membranaires, des protéines de signalisation et de l'immunité semblent majoritairement exclusifs au phagosome de la souris ou partagés entre la drosophile et la souris. Plus récentes au niveau de leur origine évolutive, ces protéines représentent de nouvelles fonctions ayant émergé au niveau du phagosome des organismes multicellulaires.

Néanmoins, ces données comparatives sont des prédictions orthologiques potentielles entre les trois espèces étudiées et ne peuvent indiquer avec assurance la présence de ces orthologues sur le phagosome des deux autres espèces à l'étude. Nos analyses de comparaisons protéomiques inter-espèces indiquent qu'une forte proportion des orthologues prédits de la souris semble réellement conservée puisque ces orthologues murins ont été identifiés par protéomique sur le phagosome de la drosophile (61.7%) et de l'amibe (51.2%). À titre comparatif, notre taux d'identification d'orthologues par protéomique chez les trois espèces étudiées (41.7%) surpasse largement celui obtenu par le groupe de Koonin (13.1%) déterminé à partir d'analyses protéomiques désuètes et anciennes de phagosomes isolés chez les mêmes espèces (Yutin *et al*, 2009).

Malgré ce progrès significatif, il demeure que ce taux d'identification d'orthologues chez les trois espèces par protéomique est incomplet (41.7%). Cette performance pourrait être expliquée par la limitation d'échantillonnage de la spectrométrie de masse qui aurait potentiellement entravé l'identification de certains orthologues. De plus, l'identification précise d'orthologues à l'échelle du génome s'avère aussi un problème central et persistant de la génomique comparative (Altenhoff & Dessimoz, 2009; Mao *et al*, 2006). Bien que nous ayons utilisé les bases de données disponibles les plus rigoureuses, il demeure que les relations orthologiques recèlent certaines erreurs et que les orthologues prédits ne peuvent inférer avec certitude la fonction des gènes chez d'autres organismes. De ce fait, de fausses prédictions orthologiques pourraient expliquer en partie cette différence observée. Toutefois, il est aussi plausible que certains orthologues des organismes basaux (*Dictyostelium* et la drosophile) soient localisés au niveau du cytoplasme et qu'ils aient été recrutés sur le phagosome à travers l'évolution par co-option (l'utilisation de trait existant de gènes à de nouveaux usages). Parmi ces explications, nos contrôles indiquent que la limitation d'échantillonnage provenant du spectromètre de masse ne semble être en cause mais que le recrutement par co-option serait en partie responsable de la différence observée entre les prédictions orthologiques et l'observation réelle d'orthologues sur les phagosomes. Pour répondre avec plus de précision, des analyses quantitatives supplémentaires sont requises pour confirmer

que certains orthologues prédits du phagosome murin sont exprimés chez la drosophile et/ou l'amibe mais toutefois absents au niveau de leur phagosome.

12.15 Analyses par génomique comparative de l'origine évolutive du protéome phagosomal de la souris

Le phagosome est une organelle formée à la suite de l'internalisation de particules extracellulaires. Par conséquent, le phagosome est composé de molécules provenant de sources intracellulaires variées incluant le cytoplasme, le cytosquelette et diverses organelles membranaires. Malgré l'évolution de ces systèmes cellulaires, le phagosome des mammifères semble majoritairement composé de protéines d'origine ancienne, puisque qu'une forte proportion (73.1%) de son protéome semble conservée chez les eucaryotes unicellulaires phagotrophes, les Amobozaaires et les Fungi qui ont perdu la capacité de phagocyter. Cette observation dépeint la phagocytose comme un processus très ancien, processus ayant potentiellement participé à l'émergence de la cellule eucaryote lors de l'eucaryogenèse (Cavalier-Smith, 1975; Cavalier-Smith, 2002). Appuyant cette théorie, nous avons identifié chez la souris un ensemble d'environ 300 protéines phagosomales présentes autant sur le phagosome de la drosophile que sur celui de l'amibe *Dictyostelium*. Ce groupe constitue un cœur protéique ancien à partir duquel auraient évolué les fonctions immunitaires effectuées par le phagosome des organismes multicellulaires. Hautement conservées, ces protéines constituent de potentiels joueurs clés de la phagocytose et par ce statut, il serait intéressant d'évaluer par ARN interférent ou par déplétion si en effet ces protéines contribuent davantage au processus d'internalisation de la phagocytose. À partir de ce cœur protéique ancien, il est désormais possible d'analyser la distribution phylétique de ces protéines chez les procaryotes et de détailler avec plus de précision l'origine de la cellule eucaryote en plus d'estimer la composition hypothétique du phagosome primordial de l'ancêtre des eucaryotes.

12.16 Le remodelage fonctionnel du phagosome à travers l'évolution

Bien que la phagocytose soit conservée et, de ce fait, fortement répandue à travers une vaste diversité d'organismes eucaryotiques, il s'avère que ce processus a sans contredit évolué depuis 1,2 milliards d'années, allant d'une organelle de digestion et de nutrition à un compartiment complexe impliqué dans l'élimination de pathogènes ainsi qu'à l'apprêtement de leurs protéines pour la présentation antigénique. La transformation de cette organelle est le résultat d'un remodelage de protéines anciennes, de l'incorporation de nouvelles protéines ainsi que de la duplication de protéines phagosomales procurant au phagosome des fonctionnalités d'origine mixte.

12.16.1 La transformation du phagosome murin a eu lieu lors de deux périodes de duplication de gènes

La duplication de gènes ou l'expansion de famille par paralogie est un des mécanismes les plus importants dans la transformation d'organelles puisqu'elle engendre l'innovation de fonctions (Dacks & Field, 2007). Au cours de l'évolution de la souris, la duplication de gènes aurait contribué de façon constante à la complexification de son génome entier. Le protéome du phagosome murin semble regrouper une certaine proportion de paralogues (50%) dont les paires seraient toujours associées au phagosome. À l'inverse du génome entier de la souris, l'origine de duplication de ces paralogues nous indique que le protéome du phagosome fut principalement réorganisé lors de deux périodes précises de duplication de gènes, chez les ancêtres des bilatériens et des eutélostéens, deux périodes qui coïncident avec l'émergence de l'immunité innée et de l'immunité acquise. Ces résultats suggèrent fortement que des contraintes sélectives ont engendré le maintien de ces paralogues au sein du phagosome afin d'assurer l'incorporation de nouvelles fonctions qui sont demeurées associées à cette organelle. L'ensemble des fonctions les plus enrichies de ces paralogues (cytosquelette, petites GTPases, trafic cellulaire

et signalisation) laisse sous-entendre qu'une sophistication du système endomembranaire fut essentielle à la transformation d'une organelle purement phagotrophique en un compartiment entièrement optimisé pour la destruction de pathogènes ainsi qu'à la présentation antigénique.

La duplication de gène peut s'effectuer par duplication de région ou par le dédoublement du génome complet. Cependant, ces événements de duplications n'induisent pas de changements dramatiques immédiats pour l'espèce en question. Les gènes dupliqués divergeront tranquillement au niveau de leur structure sous l'influence de mutation, de sélection et de dérive génétique. Éventuellement, un des gènes sera transformé en un gène codant une protéine possédant une fonction liée mais différente, tandis que l'autre gène conservera sa fonction originelle. D'anciennes évidences démontrent que l'ancêtre des vertébrés aurait subi une ou deux rondes de duplication génomique entière par tétraploïdisation (Ohno *et al*, 1968). Ces duplications génomiques entières semblent avoir joué un rôle crucial dans l'émergence de l'immunité acquise des vertébrés à mâchoire, puisque plusieurs paralogues provenant de ces duplications génomiques sont désormais essentiels au système immunitaire acquis des vertébrés à mâchoire (Kasahara, 1998; Okada & Asai, 2008). Puisque nous remarquons le même phénomène au niveau des paralogues du phagosome, serait-ce possible de conclure que les rondes de duplication génomique entière observées chez l'ancêtre des vertébrés puissent être responsables de la transformation du phagosome lors de cette période ? Plusieurs molécules associées au phagosome, telles que les CMH de classe I et II, les sous-unités de l'immunoprotéasome, les transporteurs de peptides antigéniques TAP1 et TAP2, tapasin et 10 des 11 cathepsins sont encodées au sein des paralogons du CMH qui proviennent des duplications génomiques entières observées chez l'ancêtre des vertébrés. La phagocytose et les fonctions cellulaires qui lui sont associées auraient donc bénéficié de ces rondes de duplication génomique. Toutefois, des évidences suggèrent aussi que de multiples événements précis de duplication de gènes ont eu lieu juste avant l'émergence de l'immunité innée chez les bilateria (Koyanagi *et al*, 1998; Lundin, 1999; Ono *et al*, 1999; Suga *et al*, 1999; Suga *et al*, 1997). Ces évidences concordent avec nos données puisqu'elles soulèvent la possibilité que des protéines

impliquées dans la transduction de signaux et de protéines du cytosquelette aient subi une ou des duplication(s) massive(s) au cours de la même période observée au niveau des paralogues du phagosome. D'ailleurs, la duplication d'autres protéines telles que les TLRs, les hydrolases, les SNAREs et les Rabs auraient tout aussi contribué à la spécialisation de lignées cellulaires ainsi qu'à l'établissement de l'immunité innée (Stuart & Ezekowitz, 2008).

12.16.2 Innovations moléculaires sur le phagosome murin suite à l'établissement de l'immunité acquise

Étonnamment, le remodelage du protéome du phagosome semble avoir même persisté après l'établissement de l'immunité acquise (intitulée immunité acquise tardive) chez les vertébrés à mâchoire avec l'intégration d'au moins 50 protéines chez l'ancêtre des tétrapodes il y a de cela environ 450 millions d'années. Cette découverte révèle que l'évolution du phagosome se perpétue toujours, perfectionnant potentiellement les capacités immunitaires de cette organelle, tel que démontré par la présence des protéines IRG47 un facteur de résistance puissant induit par les interférons (Howard, 2008), CD5 un récepteur scavenger nécessaire à la sélection des lymphocytes B et T (Raman, 2002), CD14 un co-récepteur de TLR4 et MD-2 pour la détection de LPS bactérien (Sepulcre *et al*, 2009) et CD47 qui régule la phagocytose via le récepteur Sirp α (Hatherley *et al*, 2009). Cette liste inclut aussi de nombreuses protéines inconnues dont la protéine Tfg qui pourrait jouer un rôle potentiel dans la réponse immunitaire acquise, puisqu'elle possède un domaine PB1 notamment observé sur les sous-unités p67^{phox} et p40^{phox} du complexe de la NADPH oxydase. Au niveau du phagosome, l'activation maximale de la NADPH oxydase nécessite la formation d'un complexe entre les sous-unités p67^{phox} et p40^{phox} via l'association de leur domaine PB1, où p40^{phox} stimule avec puissance (20 fois) la NADPH oxydase (Kuribayashi *et al*, 2002; Nakamura *et al*, 1998). À l'aide de son domaine PB1, la protéine inconnue Tfg pourrait s'avérer comme un nouveau régulateur du complexe de la NADPH oxydase au niveau du phagosome. Cette liste d'inconnues possède

aussi d'autres candidats intéressants tels que trois récepteurs olfactifs Olfr1305, Olfr749 et Olfr869 possédant chacun une région de 7 domaines transmembranaires reconnue pour induire une transduction de signal via les protéines G. Non-caractérisés, ces récepteurs pourraient être impliqués dans l'identification de pathogènes tel que démontré par la famille des chimiosenseurs voméronasaux et s'avérer de nouveaux récepteurs phagocytaires (Riviere *et al*, 2009).

12.16.3 Remodelage des sites de phosphorylation des anciennes protéines du phagosome murin

L'émergence de nouvelles protéines n'est pas l'unique façon par laquelle les fonctions phagosomales ont été modifiées au cours de l'évolution. Bien qu'elles présentent une forte conservation envers les organismes distants, de nombreuses protéines du phagosome murin ont été modifiées par le remodelage de leurs sites de phosphorylation et de ce fait, nous révèle qu'elles ne sont pas fixes. Plus rapide que l'introduction de nouvelles protéines, la réorganisation de sites de phosphorylation aurait potentiellement muni ces phosphoprotéines de fonctions additionnelles et/ou introduit des voies de régulation plus fines afin de réguler leur activité et/ou de modifier leur(s) interaction(s) protéique. C'est le cas notamment de protéines dotées de régions désordonnées majoritairement impliquées au cœur d'interactions protéine-protéine lors de différents processus tel que l'endocytose et la transduction de signaux (Brown *et al*, 2002; Dafforn & Smith, 2004; Iakoucheva *et al*, 2002; Tompa, 2005). Ces séquences linéaires hautement propices à une dégradation protéolytique par le protéasome évoluent beaucoup plus rapidement que les régions ordonnées (domaines) en plus d'arbore 80% de l'ensemble des sites de phosphorylation (Collins *et al*, 2008; Landry *et al*, 2009).

L'impact de la plasticité du phosphoprotéome sur les capacités fonctionnelles du phagosome est jusqu'à ce jour inconnu. Des études récentes ont démontré que l'interféron- γ modifie l'expression ainsi que le niveau de phosphorylation d'un grand nombre de protéines phagosomales provenant de macrophages activés (Jutras *et al*,

2008; Trost *et al*, 2009). Étonnamment, plusieurs phosphoprotéines du phagosome murin semblent avoir été présentes chez l'ancêtre commun des eucaryotes soit 1.2 milliards d'années précédant l'innovation de l'interféron- γ chez les téléostéens (Bhattacharya, 2009; Savan *et al*, 2009). En regardant le niveau de conservation des sites de phosphorylation régulés par l'interféron- γ de phosphoprotéines conservées parmi différentes espèces, il est possible d'observer la conservation significative de ces sites de phosphorylation qu'à partir des téléostéens. De ces évidences, il semble donc que l'émergence de l'interféron- γ à partir des poissons semble avoir été un événement important conférant de nouvelles propriétés fonctionnelles au phagosome des vertébrés par la fine régulation de l'expression et/ou la phosphorylation de nombreuses protéines de cette organelle dont les protéines d'origine ancienne. Malgré l'apparence récente du phosphoprotéome du phagosome murin, nos données révèlent la présence de sites de phosphorylation ancestraux, maintenus et phosphorylés depuis plus d'un milliard d'années, indiquant leur forte importance au niveau fonctionnel du phagosome. Ces sites sont observés notamment au niveau de la protéine VAMP-7 impliquée dans l'apport membranaire par la fusion de vésicules à la coupe phagocytaire lors du processus d'internalisation de la phagocytose (Braun *et al*, 2004) et de la protéine Prkab1 un régulateur de la pompe à protons V-ATPase via la PKA (protéine kinase A) (Hallows *et al*, 2009). Muter les sites de phosphorylation conservés de ces deux protéines pourrait procurer de nouvelles informations pertinentes à propos de la régulation du processus de la phagocytose.

12.17 La contamination des phagosomes de billes de latex

Le profilage par protéomique d'organelles combine la spectrométrie de masse à la biologie cellulaire afin de disséquer à un haut niveau de pureté les compartiments subcellulaires de la cellule. Diverses organelles, telles que le lysosome, le noyau, la mitochondrie, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et le phagosome, ont fait l'objet d'analyses protéomiques approfondies, où le nombre respectif de protéines identifiées au sein de ces organelles ne fait qu'augmenter. Mais quelle est la

signification réelle de ces chiffres ? Dans la majorité de ces cas, les listes de protéines détectées incluent un certain nombre de protéines non-spécifiques à l'organelle investiguées. Que ces protéines s'avèrent des contaminants, ou qu'elles présentent une association transitoire avec l'organelle, ou que ces protéines soient associées à plus d'une organelle sont des problèmes auxquels se butent tous les chercheurs du domaine de la protéomique. En un sens, la protéomique est victime de son propre succès. Les spectromètres de masse sont très sensibles et peuvent détecter des traces de peptides provenant autant de contaminants que de protéines associées à une organelle.

Le profilage protéomique du phagosome de billes de latex est un des grands succès de la protéomique (Huber *et al*, 2003). Son isolation par centrifugation isopycnique sur gradient de sucrose permet d'obtenir une organelle d'un niveau de pureté de plus de 95% surpassant la grande majorité des autres organelles (Stuart *et al*, 2007). La présence de certaines protéines pouvant être considérées comme étant des contaminants du phagosome pourrait s'expliquer du fait de l'interaction directe entre les autophagosomes et les phagosomes (Sanjuan *et al*, 2007). Un des bons exemples est la présence de protéines ribosomales dans nos échantillons. Étonnamment, la présence de protéines ribosomales peut désormais être considérée comme un processus de défense cellulaire puisque les interactions phagosome-autophagosome lors d'infection mycobactérienne semblent induire l'apport et la dégradation de protéines ribosomales au niveau de la lumière de ces organelles, résultant en la production de molécules bactéricides (Ponpuak *et al*, 2010). D'ailleurs, les trois sous-unités ribosomales, les protéines L30, S19 et S30, impliquées lors de ce nouveau mécanisme de défense cellulaire ont été identifiées au niveau de nos échantillons de phagosomes.

12.18 Conclusion

La phagocytose est un processus clé du système immunitaire permettant la séquestration et l'élimination des pathogènes dans une organelle, le phagosome. Dynamique, cette organelle mature par une série d'interactions rapides avec les organelles de l'appareil endocyttaire où elle acquiert progressivement les outils moléculaires bactériostatiques nécessaires à la destruction du pathogène internalisé. Bien que ces mécanismes aient été étudiés depuis des décennies, ce n'est que très récemment que l'élucidation par protéomique de ces mécanismes fut entamée. Ces analyses révèlent que le phagosome murin est une organelle très complexe composée de plus de 1300 protéines. Afin d'analyser cette forte complexité moléculaire, nous avons développé une méthode combinant diverses techniques de criblage à haut débit afin d'identifier les joueurs clés du processus d'internalisation de la phagocytose. La force de cette approche nous a permis de raffiner nos recherches sur de nouveaux mécanismes moléculaires de la phagocytose qui seront subséquentement validées et étudiées en détails par l'application de diverses techniques de biologie cellulaire. C'est le cas notamment du complexe de l'exocyst, un nouveau régulateur de la phagocytose que nous avons identifié et qui semble être recruté au phagosome selon le type de récepteur engagé. Dans le même ordre d'idée, nous avons entrepris la caractérisation moléculaire des étapes évolutives ayant contribué au remodelage des propriétés fonctionnelles de la phagocytose au cours de l'évolution. Cette caractérisation évolutive a mené à l'identification d'un cœur protéique ancien fortement conservé au niveau des phagosomes des organismes eucaryotiques. Bien qu'elles soient conservées, ces protéines ont été significativement remodelées par l'introduction de nouveaux sites de phosphorylation. Depuis plus de 1.2 milliards d'années d'évolution, diverses fonctions immunitaires du phagosome se seraient développées à partir de ce cœur protéique ancien, notamment par la duplication de gènes lors de l'émergence de l'immunité innée et de l'immunité acquise. Étonnamment, nous avons identifié un groupe de 50 protéines récemment acquis par le phagosome murin bien après l'émergence de l'immunité acquise, indiquant que l'évolution du phagosome est persistante. Après 20 années de recherche et

d'innovation, l'étude de la phagocytose par profilage protéomique semble dessiner un portrait moléculaire complet et réaliste des divers joueurs impliqués lors de ce processus. Ces cibles peuvent désormais faire l'objet de recherches plus poussées et mener à l'identification de nouvelles fonctions associées au phagosome.

Références

Abi-Rached L, Gilles A, Shiina T, Pontarotti P, Inoko H (2002) Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. *Nat Genet* **31**: 100-105

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

Aiba K, Fang H, Yamaguchi N, Tanaka Y, Urushihara H (1997) Isoforms of gp138, a cell-fusion related protein in Dictyostelium discoideum. *J Biochem* **121**: 238-243

Al-Sharif WZ, Sunyer JO, Lambris JD, Smith LC (1998) Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. *J Immunol* **160**: 2983-2997

Altenhoff AM, Dessimoz C (2009) Phylogenetic and functional assessment of orthologs inference projects and methods. *PLoS Comput Biol* **5**: e1000262

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402

Andersson E, Matsunaga T (1996) Jaw, adaptive immunity and phylogeny of vertebrate antibody VH gene family. *Res Immunol* **147**: 233-240

Areschoug T, Gordon S (2008) Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib Microbiol* **15**: 45-60

Artavanis-Tsakonas K, Love JC, Ploegh HL, Vyas JM (2006) Recruitment of CD63 to Cryptococcus neoformans phagosomes requires acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15945-15950

Aubry L, Klein G, Martiel JL, Satre M (1993) Kinetics of endosomal pH evolution in Dictyostelium discoideum amoebae. Study by fluorescence spectroscopy. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**: 861-866

Bajno L, Peng XR, Schreiber AD, Moore HP, Trimble WS, Grinstein S (2000) Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* **149**: 697-706

Barabasi AL, Oltvai ZN (2004) Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* **5**: 101-113

Barrett AJ, Kirschke H (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* **80 Pt C**: 535-561

Berglund AC, Sjolund E, Ostlund G, Sonnhammer EL (2008) InParanoid 6: eukaryotic ortholog clusters with inparalogs. *Nucleic Acids Res* **36**: D263-266

Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, Houde M, Desjardins M, Sher A, Sacks D (2006) Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol* **177**: 3525-3533

Berton G, Bellavite P, de Nicola G, Dri P, Rossi F (1982) Plasma membrane and phagosome localisation of the activated NADPH oxidase in elicited peritoneal macrophages of the guinea-pig. *J Pathol* **136**: 241-252

Beyenbach KW, Wiczorek H (2006) The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* **209**: 577-589

Bhattacharya D, Yoon, H.S., Hedges, S.B. and Hacket, J.D. (2009) Eukaryotes (Eukaryota). In *The Timetree of Life*, Hedges SBaK, S. (ed), pp 116-120. Oxford University Press

Bogdanovic A, Bennett N, Kieffer S, Louwagie M, Morio T, Garin J, Satre M, Bruckert F (2002) Syntaxin 7, syntaxin 8, Vti1 and VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7) form an active SNARE complex for early macropinocytic compartment fusion in Dictyostelium discoideum. *Biochem J* **368**: 29-39

Boulais J, Trost M, Landry CR, Dieckmann R, Levy ED, Soldati T, Michnick SW, Thibault P, Desjardins M (2010) Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* **6**: 423

Boyd C, Hughes T, Pypaert M, Novick P (2004) Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J Cell Biol* **167**: 889-901

Bozzaro S, Bucci C, Steinert M (2008) Phagocytosis and host-pathogen interactions in Dictyostelium with a look at macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol* **271**: 253-300

Bozzaro S, Roseman S (1983) Adhesion of Dictyostelium discoideum cells to carbohydrates immobilized in polyacrylamide gels. I. Evidence for three sugar-specific cell surface receptors. *J Biol Chem* **258**: 13882-13889

Braciale TJ, Morrison LA, Sweetser MT, Sambrook J, Gething MJ, Braciale VL (1987) Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes. *Immunol Rev* **98**: 95-114

Braun V, Brumell JH (2010) Bacterial invasion: entry through the exocyst door. *Curr Biol* **20**: R677-679

- Braun V, Fraisier V, Raposo G, Hurbain I, Sibarita JB, Chavrier P, Galli T, Niedergang F (2004) TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J* **23**: 4166-4176
- Brown CJ, Takayama S, Campen AM, Vise P, Marshall TW, Oldfield CJ, Williams CJ, Dunker AK (2002) Evolutionary rate heterogeneity in proteins with long disordered regions. *J Mol Evol* **55**: 104-110
- Brown GD, Gordon S (2001) Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**: 36-37
- Brunet S, Thibault P, Gagnon E, Kearney P, Bergeron JJ, Desjardins M (2003) Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends in cell biology* **13**: 629-638
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**: 467-480
- Burkhardt J, Huber LA, Dieplinger H, Blocker A, Griffiths G, Desjardins M (1995) Gaining insight into a complex organelle, the phagosome, using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **16**: 2249-2257
- Burlak C, Whitney AR, Mead DJ, Hackstadt T, Deleo FR (2006) Maturation of human neutrophil phagosomes includes incorporation of molecular chaperones and endoplasmic reticulum quality control machinery. *Mol Cell Proteomics* **5**: 620-634
- Caron E, Hall A (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**: 1717-1721
- Caron E, Self AJ, Hall A (2000) The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol* **10**: 974-978
- Carroll MC (2004) The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* **5**: 981-986
- Cavalier-Smith T (1975) The origin of nuclei and of eukaryotic cells. *Nature* **256**: 463-468
- Cavalier-Smith T (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 297-354
- Cavalier-Smith T (2009) Predation and eukaryote cell origins: a coevolutionary perspective. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 307-322
- Chang Y, Finnemann SC (2007) Tetraspanin CD81 is required for the alpha v beta5-integrin-dependent particle-binding step of RPE phagocytosis. *J Cell Sci* **120**: 3053-3063

Chen G, Zhuchenko O, Kuspa A (2007) Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science* **317**: 678-681

Clarke M, Kohler J, Arana Q, Liu T, Heuser J, Gerisch G (2002) Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of Dictyostelium cells. *J Cell Sci* **115**: 2893-2905

Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, Griffiths G (1998) Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem* **273**: 9842-9851

Collins MO, Yu L, Campuzano I, Grant SG, Choudhary JS (2008) Phosphoproteomic analysis of the mouse brain cytosol reveals a predominance of protein phosphorylation in regions of intrinsic sequence disorder. *Mol Cell Proteomics* **7**: 1331-1348

Consortium TU (2009) The Universal Protein Resource (UniProt) 2009. *Nucleic Acids Res* **37**: D169-174

Cornillon S, Gebbie L, Benghezal M, Nair P, Keller S, Wehrle-Haller B, Charette SJ, Bruckert F, Letourneur F, Cosson P (2006) An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features. *EMBO Rep* **7**: 617-621

Cornillon S, Pech E, Benghezal M, Ravanel K, Gaynor E, Letourneur F, Bruckert F, Cosson P (2000) Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* **275**: 34287-34292

Cox D, Chang P, Zhang Q, Reddy PG, Bokoch GM, Greenberg S (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med* **186**: 1487-1494

Cox D, Lee DJ, Dale BM, Calafat J, Greenberg S (2000) A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 680-685

Cuttell L, Vaughan A, Silva E, Escaron CJ, Lavine M, Van Goethem E, Eid JP, Quirin M, Franc NC (2008) Undertaker, a Drosophila Junctophilin, links Draper-mediated phagocytosis and calcium homeostasis. *Cell* **135**: 524-534

Dacks JB, Field MC (2007) Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *J Cell Sci* **120**: 2977-2985

Dacks JB, Poon PP, Field MC (2008) Phylogeny of endocytic components yields insight into the process of nonendosymbiotic organelle evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 588-593

Dafforn TR, Smith CJ (2004) Natively unfolded domains in endocytosis: hooks, lines and linkers. *EMBO Rep* **5**: 1046-1052

Danchin EG, Abi-Rached L, Gilles A, Pontarotti P (2003) Conservation of the MHC-like region throughout evolution. *Immunogenetics* **55**: 141-148

De Duve C (1969) Evolution of the peroxisome. *Ann N Y Acad Sci* **168**: 369-381

Dehal P, Boore JL (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* **3**: e314

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

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

Desjardins M, Houde M, Gagnon E (2005) Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev* **207**: 158-165

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

Desowitz RS (1987) The thorn in the starfish : how the human immune system works. *New York : WW Norton ed*: 277

Dieckmann R, Gopaldass N, Escalera C, Soldati T (2008) Monitoring time-dependent maturation changes in purified phagosomes from *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol* **445**: 327-337

Du Pasquier L (2004) Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *C R Biol* **327**: 591-601

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

Duclos S, Diez R, Garin J, Papadopoulou B, Descoteaux A, Stenmark H, Desjardins M (2000) Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Sci* **113 Pt 19**: 3531-3541

Dzik JM (2010) The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim Pol*

Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**: 113

Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sucgang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P *et al* (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43-57

Eisenberg E, Levanon EY (2003) Preferential attachment in the protein network evolution. *Phys Rev Lett* **91**: 138701

Emes RD, Pocklington AJ, Anderson CN, Bayes A, Collins MO, Vickers CA, Croning MD, Malik BR, Choudhary JS, Armstrong JD, Grant SG (2008) Evolutionary expansion and anatomical specialization of synapse proteome complexity. *Nat Neurosci* **11**: 799-806

English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, Alexander D, Leib D, Norbury C, Lippe R, Desjardins M (2009) Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* **10**: 480-487

Erickson HP (2007) Evolution of the cytoskeleton. *Bioessays* **29**: 668-677

Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U (2003) Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* **5**: 673-690

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

Fajardo M, Schleicher M, Noegel A, Bozzaro S, Killinger S, Heuner K, Hacker J, Steinert M (2004) Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology* **150**: 2825-2835

Fey P, Stephens S, Titus MA, Chisholm RL (2002) SadA, a novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* **159**: 1109-1119

Flajnik MF, Kasahara M (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* **11**: 47-59

Freeman MR, Delrow J, Kim J, Johnson E, Doe CQ (2003) Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* **38**: 567-580

Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, Field MC, Kuo A, Paredez A, Chapman J, Pham J, Shu S, Neupane R, Cipriano M, Mancuso J, Tu H, Salamov A, Lindquist E, Shapiro H, Lucas S, Grigoriev IV *et al* (2010) The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**: 631-642

Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG (2000) The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* **18**: 495-527

Fugmann SD, Messier C, Novack LA, Cameron RA, Rast JP (2006) An ancient evolutionary origin of the Rag1/2 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3728-3733

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

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

Gaullier JM, Ronning E, Gillooly DJ, Stenmark H (2000) Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues. *J Biol Chem* **275**: 24595-24600

Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T, Bergeron JJ (2006) Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* **127**: 1265-1281

Gordon S (2008) Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol* **38**: 3257-3264

Gotthardt D, Blancheteau V, Bosserhoff A, Ruppert T, Delorenzi M, Soldati T (2006) Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics* **5**: 2228-2243

Gotthardt D, Warnatz HJ, Henschel O, Bruckert F, Schleicher M, Soldati T (2002) High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Mol Biol Cell* **13**: 3508-3520

Grotzke JE, Harriff MJ, Siler AC, Nolt D, Delepine J, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM (2009) The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome is a HLA-I processing competent organelle. *PLoS Pathog* **5**: e1000374

Gueirard P, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M (2008) Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol* **10**: 100-111

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

Hacker U, Albrecht R, Maniak M (1997) Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* **110 (Pt 2)**: 105-112

Hallows KR, Alzamora R, Li H, Gong F, Smolak C, Neumann D, Pastor-Soler NM (2009) AMP-activated protein kinase inhibits alkaline pH- and PKA-induced apical vacuolar H⁺-ATPase accumulation in epididymal clear cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**: C672-681

Hartenstein V (2006) Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 677-712

Hatherley D, Graham SC, Harlos K, Stuart DI, Barclay AN (2009) Structure of signal-regulatory protein alpha: a link to antigen receptor evolution. *J Biol Chem* **284**: 26613-26619

Hedges SB (2009) Vertebrates (Vertebrata). In *The Timetree of Life*, Hedges SBaK, S. (ed), pp 309-314. Oxford University Press

Hoebe K, Janssen E, Beutler B (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* **5**: 971-974

Honey K, Rudensky AY (2003) Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **3**: 472-482

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

Howard J (2008) The IRG proteins: a function in search of a mechanism. *Immunobiology* **213**: 367-375

Hubbard TJ, Aken BL, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Clarke L, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Gordon L, Graf S, Haider S, Hammond M, Holland R, Howe K *et al* (2009) Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res* **37**: D690-697

Huber LA, Pfaller K, Vietor I (2003) Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res* **92**: 962-968

- Huerta-Cepas J, Bueno A, Dopazo J, Gabaldon T (2008) PhylomeDB: a database for genome-wide collections of gene phylogenies. *Nucleic Acids Res* **36**: D491-496
- Huerta-Cepas J, Dopazo H, Dopazo J, Gabaldon T (2007) The human phylome. *Genome Biol* **8**: R109
- Hughes AL (1998) Protein phylogenies provide evidence of a radical discontinuity between arthropod and vertebrate immune systems. *Immunogenetics* **47**: 283-296
- Hughes AL (1999) Genomic catastrophism and the origin of vertebrate immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **47**: 347-353
- Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S (2007) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* **26**: 313-324
- Iakoucheva LM, Brown CJ, Lawson JD, Obradovic Z, Dunker AK (2002) Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol* **323**: 573-584
- Janeway CA, Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**: 11-16
- Jekely G (2003) Small GTPases and the evolution of the eukaryotic cell. *Bioessays* **25**: 1129-1138
- Jekely G (2007) Origin of phagotrophic eukaryotes as social cheaters in microbial biofilms. *Biol Direct* **2**: 3
- Jin R, Junutula JR, Matern HT, Ervin KE, Scheller RH, Brunger AT (2005) Exo84 and Sec5 are competitive regulatory Sec6/8 effectors to the RalA GTPase. *EMBO J* **24**: 2064-2074
- Ju JS, Cho MH, Brade L, Kim JH, Park JW, Ha NC, Soderhall I, Soderhall K, Brade H, Lee BL (2006) A novel 40-kDa protein containing six repeats of an epidermal growth factor-like domain functions as a pattern recognition protein for lipopolysaccharide. *J Immunol* **177**: 1838-1845
- Jutras I, Desjardins M (2005) Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 511-527
- Jutras I, Houde M, Currier N, Boulais J, Duclos S, LaBoissiere S, Bonneil E, Kearney P, Thibault P, Paramithiotis E, Hugo P, Desjardins M (2008) Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics* **7**: 697-715
- Jutras I, Laplante A, Boulais J, Brunet S, Thinakaran G, Desjardins M (2005) Gamma-secretase is a functional component of phagosomes. *J Biol Chem* **280**: 36310-36317

Kasahara M (1998) What do the paralogous regions in the genome tell us about the origin of the adaptive immune system? *Immunol Rev* **166**: 159-175

Kasahara M (2007) The 2R hypothesis: an update. *Curr Opin Immunol* **19**: 547-552

Kasahara M, Suzuki T, Pasquier LD (2004) On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends Immunol* **25**: 105-111

Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**: 373-384

Kerrien S, Alam-Faruque Y, Aranda B, Bancarz I, Bridge A, Derow C, Dimmer E, Feuermann M, Friedrichsen A, Huntley R, Kohler C, Khadake J, Leroy C, Liban A, Lieftink C, Montecchi-Palazzi L, Orchard S, Risse J, Robbe K, Roechert B *et al* (2007) IntAct--open source resource for molecular interaction data. *Nucleic Acids Res* **35**: D561-565

Kersey PJ, Duarte J, Williams A, Karavidopoulou Y, Birney E, Apweiler R (2004) The International Protein Index: an integrated database for proteomics experiments. *Proteomics* **4**: 1985-1988

Klein J, Sato A (1998) Birth of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* **47**: 199-209

Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle T, Hoffmann JA, Reichhart JM, Ferrandon D, Ramet M, Ezekowitz RA (2005) Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* **123**: 335-346

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

Koyanagi M, Suga H, Hoshiyama D, Ono K, Iwabe N, Kuma K, Miyata T (1998) Ancient gene duplication and domain shuffling in the animal cyclic nucleotide phosphodiesterase family. *FEBS Lett* **436**: 323-328

Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H (2002) The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J* **21**: 6312-6320

Kurucz E, Markus R, Zsomboki J, Folkl-Medzihradzky K, Darula Z, Vilmos P, Udvardy A, Krausz I, Lukacsovich T, Gateff E, Zettervall CJ, Hultmark D, Ando I (2007) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr Biol* **17**: 649-654

Landry CR, Levy ED, Michnick SW (2009) Weak functional constraints on phosphoproteomes. *Trends Genet* **25**: 193-197

Lardy B, Bof M, Aubry L, Paclet MH, Morel F, Satre M, Klein G (2005) NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* **1744**: 199-212

Lee WL, Kim MK, Schreiber AD, Grinstein S (2005) Role of ubiquitin and proteasomes in phagosome maturation. *Mol Biol Cell* **16**: 2077-2090

Lemaitre B, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**: 697-743

Lennon-Dumenil AM, Bakker AH, Maehr R, Fiebiger E, Overkleeft HS, Roseblatt M, Ploegh HL, Lagaudriere-Gesbert C (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**: 529-540

Li J, Rechsteiner M (2001) Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators. *Biochimie* **83**: 373-383

Li W, Guan KL (2004) The Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) interacts with and activates Pak. *J Biol Chem* **279**: 32824-32831

Lorenzi R, Brickell PM, Katz DR, Kinnon C, Thrasher AJ (2000) Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* **95**: 2943-2946

Lundin LG (1999) Gene duplications in early metazoan evolution. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 523-530

Mallick P, Kuster B (2010) Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol* **28**: 695-709

Manadas B, Mendes VM, English J, Dunn MJ (2010) Peptide fractionation in proteomics approaches. *Expert Rev Proteomics* **7**: 655-663

Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, Nakanishi Y (2004) Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem* **279**: 48466-48476

Maniak M, Rauchenberger R, Albrecht R, Murphy J, Gerisch G (1995) Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* **83**: 915-924

- Manoury B, Hewitt EW, Morrice N, Dando PM, Barrett AJ, Watts C (1998) An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* **396**: 695-699
- Mao F, Su Z, Olman V, Dam P, Liu Z, Xu Y (2006) Mapping of orthologous genes in the context of biological pathways: An application of integer programming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 129-134
- Margulis L (1970) *The origin of Eukaryotic cells*, New Haven, Connecticut: Yale University Press.
- Market E, Papavasiliou FN (2003) V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol* **1**: E16
- Massol P, Montcourrier P, Guillemot JC, Chavrier P (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J* **17**: 6219-6229
- Matsunaga T, Rahman A (1998) What brought the adaptive immune system to vertebrates?--The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunol Rev* **166**: 177-186
- May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol* **2**: 246-248
- McCoy CE, O'Neill LA (2008) The role of toll-like receptors in macrophages. *Front Biosci* **13**: 62-70
- McNew JA, Parlati F, Fukuda R, Johnston RJ, Paz K, Paumet F, Sollner TH, Rothman JE (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**: 153-159
- Metchnikov II (1954) Lektsii o sravnitel'noi patologii vospaleniya. *Akad Sobr Soch (Academic Collection of Works)* **5**: 99 - 214
- Mehta SQ, Hiesinger PR, Beronja S, Zhai RG, Schulze KL, Verstreken P, Cao Y, Zhou Y, Tepass U, Crair MC, Bellen HJ (2005) Mutations in *Drosophila* sec15 reveal a function in neuronal targeting for a subset of exocyst components. *Neuron* **46**: 219-232
- Melendez AJ, Tay HK (2008) Phagocytosis: a repertoire of receptors and Ca²⁺ as a key second messenger. *Biosci Rep* **28**: 287-298
- Michod RE (2007) Evolution of individuality during the transition from unicellular to multicellular life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104 Suppl 1**: 8613-8618
- Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* **73**: 209-212

Mukhopadhyay S, Gordon S (2004) The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology* **209**: 39-49

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

Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S (2005) Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* **182**: 1-15

Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C (2008) *Janeway's immunobiology*, 7th edn. New York: Garland Science.

Mushegian A, Medzhitov R (2001) Evolutionary perspective on innate immune recognition. *J Cell Biol* **155**: 705-710

Nakamura R, Sumimoto H, Mizuki K, Hata K, Ago T, Kitajima S, Takeshige K, Sakaki Y, Ito T (1998) The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Biochem* **251**: 583-589

Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, Morishita S (2007) Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Res* **17**: 1254-1265

Ng Yan Hing JD, Desjardins M, Descoteaux A (2004) Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C- α in phagosome maturation. *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 810-816

Nichols CD, Casanova JE (2010) Salmonella-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. *Curr Biol* **20**: 1316-1320

Niedergang F, Colucci-Guyon E, Dubois T, Raposo G, Chavrier P (2003) ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol* **161**: 1143-1150

Niedermann G, Grimm R, Geier E, Maurer M, Realini C, Gartmann C, Soll J, Omura S, Rechsteiner MC, Baumeister W, Eichmann K (1997) Potential immunocompetence of proteolytic fragments produced by proteasomes before evolution of the vertebrate immune system. *J Exp Med* **186**: 209-220

Niewohner J, Weber I, Maniak M, Muller-Taubenberger A, Gerisch G (1997) Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol* **138**: 349-361

Nilsson T, Mann M, Aebersold R, Yates JR, 3rd, Bairoch A, Bergeron JJ (2010) Mass spectrometry in high-throughput proteomics: ready for the big time. *Nat Methods* **7**: 681-685

Nonaka M, Yamada-Namikawa C, Flajnik MF, Du Pasquier L (2000) Trans-species polymorphism of the major histocompatibility complex-encoded proteasome subunit LMP7 in an amphibian genus, *Xenopus*. *Immunogenetics* **51**: 186-192

Ohno S (1996) The origin of immunoglobulins and T-cell receptors is likely to be the cell death sensor of macrophages. *Res Immunol* **147**: 247-252

Ohno S, Wolf U, Atkin NB (1968) Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* **59**: 169-187

Okada K, Asai K (2008) Expansion of signaling genes for adaptive immune system evolution in early vertebrates. *BMC Genomics* **9**: 218

Okada M, Huston CD, Mann BJ, Petri WA, Jr., Kita K, Nozaki T (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* **4**: 827-831

Okada M, Huston CD, Oue M, Mann BJ, Petri WA, Jr., Kita K, Nozaki T (2006) Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol* **145**: 171-183

Ono K, Suga H, Iwabe N, Kuma K, Miyata T (1999) Multiple protein tyrosine phosphatases in sponges and explosive gene duplication in the early evolution of animals before the parazoon-eumetazoan split. *J Mol Evol* **48**: 654-662

Pancer Z, Cooper MD (2006) The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **24**: 497-518

Pang KM, Lee E, Knecht DA (1998) Use of a fusion protein between GFP and an actin-binding domain to visualize transient filamentous-actin structures. *Curr Biol* **8**: 405-408

Panopoulou G, Poustka AJ (2005) Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications -- the adventure of a hypothesis. *Trends Genet* **21**: 559-567

Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, Virgin HWt, Kyei GB, Johansen T, Vergne I, Deretic V (2010) Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity* **32**: 329-341

Powis SH, Mockridge I, Kelly A, Kerr LA, Glynn R, Gileadi U, Beck S, Trowsdale J (1992a) Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II

region of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1463-1467

Powis SJ, Deverson EV, Coadwell WJ, Ciruela A, Huskisson NS, Smith H, Butcher GW, Howard JC (1992b) Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule. *Nature* **357**: 211-215

Prigent M, Dubois T, Raposo G, Derrien V, Tenza D, Rosse C, Camonis J, Chavrier P (2003) ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J Cell Biol* **163**: 1111-1121

Raman C (2002) CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance. *Immunol Res* **26**: 255-263

Ramet M, Manfruelli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA (2002) Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* **416**: 644-648

Rauchenberger R, Hacker U, Murphy J, Niewohner J, Maniak M (1997) Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol* **7**: 215-218

Ravetch JV, Bolland S (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **19**: 275-290

Rechsteiner M, Hill CP (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* **15**: 27-33

Rezabek BL, Rodriguez-Paris JM, Cardelli JA, Chia CP (1997) Phagosomal proteins of *Dictyostelium discoideum*. *J Eukaryot Microbiol* **44**: 284-292

Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**: 735-749

Riviere S, Challet L, Fluegge D, Spehr M, Rodriguez I (2009) Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature* **459**: 574-577

Rocha B (2007) The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut. *Immunol Rev* **215**: 166-177

Rocha B, Vassalli P, Guy-Grand D (1994) Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J Exp Med* **180**: 681-686

Rogers LD, Foster LJ (2007) The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18520-18525

Rokas A (2008) The origins of multicellularity and the early history of the genetic toolkit for animal development. *Annu Rev Genet* **42**: 235-251

Ross GD, Cain JA, Lachmann PJ (1985) Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol* **134**: 3307-3315

Ruan J, Li H, Chen Z, Coghlan A, Coin LJ, Guo Y, Heriche JK, Hu Y, Kristiansen K, Li R, Liu T, Moses A, Qin J, Vang S, Vilella AJ, Ureta-Vidal A, Bolund L, Wang J, Durbin R (2008) TreeFam: 2008 Update. *Nucleic Acids Res* **36**: D735-740

Russell DG (2001) Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 569-577

Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S, Green DR (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**: 1253-1257

Savan R, Ravichandran S, Collins JR, Sakai M, Young HA (2009) Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 115-124

Savina A, Amigorena S (2007) Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* **219**: 143-156

Sepulcre MP, Alcaraz-Perez F, Lopez-Munoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML, Mulero V (2009) Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J Immunol* **182**: 1836-1845

Sillo A, Bloomfield G, Balest A, Balbo A, Pergolizzi B, Peracino B, Skelton J, Ivens A, Bozzaro S (2008) Genome-wide transcriptional changes induced by phagocytosis or growth on bacteria in Dictyostelium. *BMC Genomics* **9**: 291

Silva E, Au-Yeung HW, Van Goethem E, Burden J, Franc NC (2007) Requirement for a Drosophila E3-ubiquitin ligase in phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* **27**: 585-596

Simpson AG, Roger AJ (2004) The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol* **14**: R693-696

Spiczka KS, Yeaman C (2008) Ral-regulated interaction between Sec5 and paxillin targets Exocyst to focal complexes during cell migration. *J Cell Sci* **121**: 2880-2891

Steinberg BE, Huynh KK, Grinstein S (2007) Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences. *Biochem Soc Trans* **35**: 1083-1087

Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD (2006) Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol* **4**: e4

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

Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RA, Moore KJ (2005) Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* **170**: 477-485

Stuart LM, Ezekowitz RA (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* **8**: 131-141

Suga H, Koyanagi M, Hoshiyama D, Ono K, Iwabe N, Kuma K, Miyata T (1999) Extensive gene duplication in the early evolution of animals before the parazoan-eumetazoan split demonstrated by G proteins and protein tyrosine kinases from sponge and hydra. *J Mol Evol* **48**: 646-653

Suga H, Kuma K, Iwabe N, Nikoh N, Ono K, Koyanagi M, Hoshiyama D, Miyata T (1997) Intermittent divergence of the protein tyrosine kinase family during animal evolution. *FEBS Lett* **412**: 540-546

Sumimoto H (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* **275**: 3249-3277

Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 639-649

Tanji T, Ohashi-Kobayashi A, Natori S (2006) Participation of a galactose-specific C-type lectin in *Drosophila* immunity. *Biochem J* **396**: 127-138

Tauber AI, Chernyak L (1989) The birth of immunology. II. Metchnikoff and his critics. *Cell Immunol* **121**: 447-473

Thingholm TE, Jorgensen TJ, Jensen ON, Larsen MR (2006) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nature protocols* **1**: 1929-1935

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta* **216**: 193-202

- Tomba P (2005) The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* **579**: 3346-3354
- Trinchieri G, Sher A (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* **7**: 179-190
- Trost M, English L, Lemieux S, Courcelles M, Desjardins M, Thibault P (2009) The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* **30**: 143-154
- True JR, Carroll SB (2002) Gene co-option in physiological and morphological evolution. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 53-80
- Tuxworth RI, Stephens S, Ryan ZC, Titus MA (2005) Identification of a myosin VII-talin complex. *J Biol Chem* **280**: 26557-26564
- Tuxworth RI, Weber I, Wessels D, Addicks GC, Soll DR, Gerisch G, Titus MA (2001) A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr Biol* **11**: 318-329
- Tweedie S, Ashburner M, Falls K, Leyland P, McQuilton P, Marygold S, Millburn G, Osumi-Sutherland D, Schroeder A, Seal R, Zhang H (2009) FlyBase: enhancing Drosophila Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res* **37**: D555-559
- Uinuk-Ool TS, Takezaki N, Kuroda N, Figueroa F, Sato A, Samonte IE, Mayer WE, Klein J (2003) Phylogeny of antigen-processing enzymes: cathepsins of a cephalochordate, an agnathan and a bony fish. *Scand J Immunol* **58**: 436-448
- Ulsamer AG, Wright PL, Wetzel MG, Korn ED (1971) Plasma and phagosome membranes of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* **51**: 193-215
- Underhill DM, Ozinsky A (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* **20**: 825-852
- Unkeless JC, Shen Z, Lin CW, DeBeus E (1995) Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB. *Semin Immunol* **7**: 37-44
- Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, Van de Peer Y (2004) Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1638-1643
- Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* **366**: 689-704
- Vienne A, Shiina T, Abi-Rached L, Danchin E, Vitiello V, Cartault F, Inoko H, Pontarotti P (2003) Evolution of the proto-MHC ancestral region: more evidence for

the plesiomorphic organisation of human chromosome 9q34 region. *Immunogenetics* **55**: 429-436

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

Vivier E, Malissen B (2005) Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol* **6**: 17-21

Vogel G, Thilo L, Schwarz H, Steinhart R (1980) Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J Cell Biol* **86**: 456-465

Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, Jones DT (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* **337**: 635-645

Watson FL, Puttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, Kondo M, Rebel VI, Schmucker D (2005) Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* **309**: 1874-1878

Wickstead B, Gull K, Richards TA (2010) Patterns of kinesin evolution reveal a complex ancestral eukaryote with a multifunctional cytoskeleton. *BMC Evol Biol* **10**: 110

Wojtowicz WM, Flanagan JJ, Millard SS, Zipursky SL, Clemens JC (2004) Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell* **118**: 619-633

Yanez-Mo M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdes M, Sanchez-Madrid F (2009) Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in cell biology* **19**: 434-446

Yates RM, Hermetter A, Taylor GA, Russell DG (2007) Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* **8**: 241-250

Yutin N, Wolf MY, Wolf YI, Koonin EV (2009) The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct* **4**: 9

Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 107-117

Zhang XM, Ellis S, Sriratana A, Mitchell CA, Rowe T (2004) Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**: 43027-43034

Annexes I. Article III

Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma

Jutras I., Houde M., Currier N., **Boulais J.**, Duclos S., LaBoissière S., Bonneil E., Kearney P., Thibault P., Paramithiotis E., Hugo P. and Desjardins M.

Mol Cell Proteomics. 2008 Apr;7(4):697-715.

Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma

Jutras I., Houde M., Currier N., **Boulais J.**, Duclos S., LaBoissière S., Bonneil E., Kearney P., Thibault P., Paramithiotis E., Hugo P. and Desjardins M.

Mol Cell Proteomics. 2008 Apr;7(4):697-715.

Abstract

Macrophages are immune cells that function in the clearance of infectious particles. This process involves the engulfment of microbes into phagosomes where these particles are lysed and degraded. In the current study, we used a large scale quantitative proteomics approach to analyze the changes in protein abundance induced on phagosomes by interferon-gamma (IFN-gamma), an inflammatory cytokine that activates macrophages. Our analysis identified 167 IFN-gamma-modulated proteins on phagosomes of which more than 90% were up-regulated. The list of phagosomal proteins regulated by IFN-gamma includes proteins expected to alter phagosome maturation, enhance microbe degradation, trigger the macrophage immune response, and promote antigen loading on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. A dynamic analysis of IFN-gamma-sensitive proteins by Western blot indicated that newly formed phagosomes display a delayed proteolytic activity coupled to an increased recruitment of the MHC class I peptide-loading complex. These phagosomal conditions may favor antigen presentation by MHC class I molecules on IFN-gamma-activated macrophages.

Contribution

Dans cet article, j'ai généré les tables de donnée protéomique à partir de la base de données MySQL de notre laboratoire. Avec cet outil, j'ai pu calculer le nombre de peptides identifiés pour chaque protéine, le niveau de régulation par l'interféron- γ des protéines phagosomales, en plus de fournir les annotations fonctionnelles de chaque protéine afin de permettre leur classification selon leur fonction.

Annexes II. Article IV

Gamma-secretase is a functional component of phagosomes

Jutras I., Laplante A., **Boulais J.**, Brunet S., Thinakaran G. and Desjardins M.

J Biol Chem. 2005 Oct 28;280(43):36310-7.

Gamma-secretase is a functional component of phagosomes

Jutras I., Laplante A., **Boulais J.**, Brunet S., Thinakaran G. and Desjardins M.

J Biol Chem. 2005 Oct 28;280(43):36310-7.

Abstract

Gamma-secretase is a high molecular mass protein complex that catalyzes the intramembrane cleavage of its protein substrates. Two proteins involved in phagocytosis, CD44 and the low density lipoprotein receptor-related protein, are gamma-secretase substrates, suggesting that this complex might regulate some aspects of phagocytosis. Our results indicate that the four components of gamma-secretase, viz. presenilin, nicastrin, APH-1, and PEN-2, are present and enriched on phagosome membranes from both murine macrophages and *Drosophila* S2 phagocytes. The gamma-secretase components form high molecular mass complexes in lipid microdomains of the phagosome membrane with the topology expected for the functional enzyme. In contrast to the majority of the phagosome proteins studied so far, which appear to associate transiently with this organelle, gamma-secretase resides on newly formed phagosomes and remains associated throughout their maturation into phagolysosomes. Finally, our results indicate that interferon-gamma stimulates gamma-secretase-dependent cleavages on phagosomes and that gamma-secretase activity may be involved in the phagocytic response of macrophages to inflammatory cytokines.

Contribution

Lors de cet article, j'ai effectué les immunobuvardages sur des extraits de membranes totales et de phagosomes (60'0') purifiés à partir de cellules S2 de drosophile. Les résultats de ces immunobuvardages ont permis de déterminer que la localisation des composants du complexe de la γ -secretase est conservée chez les phagocytes de la mouche à fruit.

Annexes III. Article V

Molecular characterization of phagosomal membrane microdomains during phagolysosome biogenesis

Goyette G., Carruthers N.J., Landry C.R., Jutras I., **Boulais J.**, Duclos S., Dermine J.F., Michnick S.W., Thibault P., LaBoissière S., Lajoie G. et Desjardins M.

Submitted

Molecular characterization of phagosomal membrane microdomains during phagolysosome biogenesis

Goyette G., Carruthers N.J., Landry C.R., Jutras I., **Boulais J.**, Duclos S., Dermine J.F., Michnick S.W., Thibault P., LaBoissière S., Lajoie G. et Desjardins M.

Submitted

Abstract

After their formation at the cell surface, phagosomes become fully functional through a complex maturation process involving sequential interactions with various intracellular organelles. In the last decade, series of data indicated that some of the phagosome functional properties occur in specialized membrane microdomains. The molecules associated with membrane microdomains, as well as the organization of these structures during phagolysosome biogenesis are largely unknown. In this study, we combined proteomics and lipidomics analyses to characterize the dynamic association of proteins and lipids to maturing phagosomes. Our analyses led to the first thorough characterization of the phagosome phospholipidome and its modulation during phagosome maturation. Our data also indicate that groups of proteins shuffle from detergent-soluble to detergent-resistant membrane microdomains during maturation, supporting a model in which the modulation of the phagosome functional properties involves an important reorganization of the phagosome lipidomes and the coordinated spatial segregation of proteins.

Contribution

Ma contribution pour cet article représente bien l'étendu et la versatilité qu'apporte à un laboratoire de protéomique la base de donnée qui fut développée au cours de cette thèse. Guillaume Goyette, l'auteur principal de cet article, a utilisé cette base de donnée afin d'annoter, classifier et comparer différentes listes protéomique entre elles. J'ai donc aidé Guillaume à utiliser avec efficacité cette base de données afin de lui permettre d'identifier des groupes de protéines phagosomales qui se déplacent vers les microdomaines lipidiques lors de la maturation du phagosome.

Annexes IV. Articles VI

The endosomal proteome of macrophage and dendritic cells

Duclos S., Clavarino G., Rousserie G., Goyette G., **Boulais J.**, Camossetto V., Gatti E., Pierre P. et Desjardins M.

Proteomics. 2011 Mar;11(5):854-64.

The endosomal proteome of macrophage and dendritic cells

Duclos S., Clavarino G., Rousserie G., Goyette G., **Boulais J.**, Camossetto V., Gatti E., Pierre P. et Desjardins M.

Proteomics. 2011 Mar;11(5):854-64.

Abstract

The essential roles of the endovacuolar system in health and disease call for the development of new tools allowing a better understanding of the complex molecular machinery involved in endocytic processes. We took advantage of the floating properties of small latex beads (sLB) on a discontinuous sucrose gradient to isolate highly purified endosomes following internalization of small latex beads in J774 macrophages and bone marrow-derived dendritic cells (DC). We particularly focused on the isolation of macrophages early endosomes and late endosomes/lysosomes (LE/LYS) as well as the isolation of LE/LYS from immature and lipopolysaccharide-activated (mature) DC. We subsequently performed a comparative analysis of their respective protein contents by MS. As expected, proteins already known to localize to the early endosomes were enriched in the earliest fraction of J774 endosomes, while proteins known to accumulate later in the process, such as hydrolases, were significantly enriched in the LE/LYS preparations. We next compared the LE/LYS protein contents of immature DC and mature DC, which are known to undergo massive reorganization leading to potent immune activation. The differences between the protein contents of endocytic organelles from macrophages and DC were underlined by focusing on previously poorly characterized biochemical pathways, which could have an unexpected but important role in the endosomal functions of these highly relevant immune cell types.

Contribution

Dans cet article, j'ai encore une fois utilisé notre base de données pour générer les tables de données protéomique, annoter les protéines identifiées, produit et imagé les réseaux d'interactions protéique, quantifié par compte peptidique les protéines endosomales identifiées et calculé le niveau d'enrichissement entre les protéines d'endosomes précoces et tardifs ainsi qu'entre les endosomes tardifs de cellules dendritiques immatures et matures.

