

**Université du Québec**  
**INRS-Institut Armand-Frappier**  
**Centre de recherche en santé humaine**

**Rôle de PKC- $\alpha$  dans la phagocytose et les signaux de  
transduction médiés par les récepteurs Fc**

**Par**  
**Anouk Breton**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc) en virologie et  
Immunologie**

**Jury d'évaluation**

Président du jury	Yves St-Pierre, CRSH
Examineur externe	Guy G. Poirier
Directeur de recherche	Albert Descoteaux, CRSH

## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	ii
<b>Liste des figures</b> .....	iv
<b>Liste des abréviations</b> .....	v
<b>Sommaire</b> .....	vii
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Revue de littérature</b> .....	14
<b>1. Macrophages</b> .....	15
1.1 Définition.....	15
1.2 Fonctions.....	16
1.3 Récepteurs.....	17
<b>2. Phagocytose</b> .....	19
2.1 Définition.....	19
2.2 Modulation de l'actine.....	20
2.3 MARCKS.....	23
2.4 Maturation du phagosome et mécanismes d'évasion.....	24
<b>3. Récepteurs Fc</b> .....	29
3.1 Définition.....	29
3.2 Caractéristiques.....	30
3.2.1 Fc $\gamma$ RI.....	30
3.2.2 Fc $\gamma$ RII.....	31
3.2.3 Fc $\gamma$ RIII.....	32
<b>4. Voies de signalisation</b> .....	33
4.1 Généralités.....	33
4.2 Syk / Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K).....	34
4.3 Guanine nucleotide exchange factor (GEF) / Vav.....	36
4.4 Mitogen-activated protein kinase (MAPK).....	38
4.5 Phospholipase C $\gamma$ (PLC $\gamma$ ) / Protein kinase C (PKC).....	41
4.6 NF- $\kappa$ B / I $\kappa$ B.....	42

<b>5. Protéine kinase C</b> .....	43
5.1 Généralités.....	43
5.2 Activateurs – Inhibiteurs.....	44
5.3 Rôle dans la phagocytose via les FcR.....	45
5.4 Rôle dans la transduction des signaux via les FcR .....	46
5.5 Influence d’une stimulation à l’interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ).....	47
<b>Discussion</b> .....	60
<b>Remerciements</b> .....	68
<b>Liste des références</b> .....	69
<b>Annexe 1</b> .....	80

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Quantification de l'expression des Fc $\gamma$ R à la surface des macrophages par cytométrie en flux.....	49
<b>Figure 2.</b> Effet de DN PKC- $\alpha$ sur l'attachement et la phagocytose des IgG-SRBC.....	50
<b>Figure 3.</b> Phosphorylation de Syk lors de la phagocytose via les FcR.....	51
<b>Figure 4.</b> Phosphorylation de ERK lors de la phagocytose via les FcR.....	52

### Annexe 2

<b>Figure A.</b> Tableau de la spécificité des FcR pour les immunoglobulines.....	83
<b>Figure B.</b> Schéma de la cascade de signalisation.....	84
<b>Figure C.</b> Schéma des voies principales des MAPK.....	85
<b>Figure D.</b> Schéma de la famille des protéines kinases C.....	86
<b>Figure E.</b> Phosphorylation de JNK lors de la phagocytose via les FcR.....	87
<b>Figure F.</b> Phosphorylation de P38 lors de la phagocytose via les FcR.....	88
<b>Figure G.</b> Dégradation de I $\kappa$ -B lors de la phagocytose via les FcR.....	89
<b>Figure H.</b> Phosphorylation de Vav lors de la phagocytose via les FcR.....	90



## Liste des abréviations

<b>PKC :</b>	Protéine kinase C
<b>DN PKC-<math>\alpha</math> :</b>	Mutant dominant-négatif de PKC- $\alpha$
<b>FcR :</b>	Récepteur Fc
<b>CR :</b>	Récepteur du complément
<b>SR :</b>	Récepteur scavenger
<b>SRBC :</b>	Érythrocytes de moutons (Sheep red blood cells)
<b>IgG-SRBC :</b>	Sheep red blood cells opsonisées avec des immunoglobulines de type G (IgG)
<b>ITAM :</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
<b>MARCKS :</b>	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
<b>SHIP :</b>	SH <sub>2</sub> -containing polyinositol phosphatase
<b>MAPK :</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>PTK :</b>	Protéine tyrosine kinase
<b>ERK :</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>JNK :</b>	C-jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
<b>PI 3-K :</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>NF-<math>\kappa</math>B :</b>	Nuclear factor- $\kappa$ B
<b>I<math>\kappa</math>B :</b>	Inhibiteur de NF- $\kappa$ B
<b>PLC <math>\gamma</math> :</b>	Phospholipase C
<b>PMA :</b>	Phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharide
<b>IFN-<math>\gamma</math> :</b>	Interféron-gamma

<b>DAG :</b>	Diacylglycérol
<b>SH<sub>2</sub> :</b>	Phosphotyrosine-binding Src-homology 2
<b>BSA :</b>	Bovine serum albumin
<b>PIP<sub>2</sub> :</b>	Phosphatidylinositol diphosphate
<b>PIP<sub>3</sub> :</b>	Phosphatidylinositol triphosphate
<b>LAMP-1 :</b>	Lysosomal-associated membrane protein-1
<b>MEK :</b>	MAPK/ERK kinase
<b>ELK-1 :</b>	Ets domain protein
<b>SAPK :</b>	Stress-activated protein kinase
<b>Rel :</b>	Relish

Les macrophages sont des cellules effectrices qui jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire de l'hôte. La phagocytose, qui représente la principale fonction de ces cellules, consiste en la capture et la destruction des pathogènes, microorganismes invasifs, cellules sénescentes et débris cellulaires. Des études précédentes effectuées avec des inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC), révèlent que l'activation de cette enzyme est une étape essentielle dans l'ingestion par les macrophages, de particules opsonisées.

L'état actuel de nos connaissances ne nous permet pas de dire lequel(s) des six isoenzymes de PKC exprimés chez le macrophage est impliquée dans la phagocytose et l'ingestion de particules. Nous avons donc entrepris l'étude du rôle de l'isoenzyme  $\alpha$  en surexprimant un mutant dominant-négatif (DN) de cet isoenzyme, dans la lignée de macrophage murin RAW 264.7. La surexpression du mutant DN PKC- $\alpha$  ne semble pas avoir d'effets sur l'attachement des érythrocytes opsonisés par des immunoglobulines de type G (IgG-SRBC), mais diminue leur internalisation.

Une analyse des signaux de transduction induits par les érythrocytes opsonisés (IgG-SRBC), révèlent que la surexpression d'un mutant DN PKC- $\alpha$  inhibe la phosphorylation de ERK 1/2 médiée par les FcR, ainsi que l'activation de Vav. Cependant, l'activation de Syk et de la PI 3-Kinase semblent normales dans ces même mutants et la dégradation de  $\text{I}\kappa\text{B}$  n'a pas lieu. Certaines de ces observations suggèrent donc un rôle pour PKC- $\alpha$  dans la phagocytose et également dans la transduction des signaux médiés par les Fc $\gamma$ R. Nous avons également vérifié ce qu'il advenait des voies d'activation des MAP kinases et de  $\text{I}\kappa\text{B}$  chez les macrophages pré-traités à l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ). Nous avons observé que la phosphorylation de ERK dans

les macrophages contrôles pré-traités à l'IFN- $\gamma$  demeure intacte et que cette phosphorylation est toujours absente dans les macrophages DN PKC- $\alpha$ . De plus, la phosphorylation des deux autres MAP kinases, soient JNK et p38, est observée suite à la stimulation via les FcR, et ce, autant dans les macrophages contrôles, que dans les clones surexprimant le mutant DN PKC- $\alpha$ . Également, une dégradation d'I $\kappa$ B est observée uniquement chez les macrophages contrôles suite à la stimulation par les SRBC-IgG.

## **Introduction**

La phagocytose, qui est une des réponses principales contre l'infection, consiste en la capture et la destruction des microorganismes invasifs. Le processus de capture et d'internalisation est médié par l'interaction entre les molécules à la surface de la particule et les récepteurs, les lectines ou autres molécules à la surface de la cellule phagocytaire. De plus, les particules peuvent être reconnues directement par les récepteurs, mais leur reconnaissance peut être facilitée par la présence d'opsonines telles des anticorps, qui recouvrent la particule, et ces opsonines sont elles-mêmes reconnues par les récepteurs spécifiques. Des études précédentes ont démontré l'importance de plusieurs molécules de transduction dans la phagocytose médiée par les récepteurs Fc. Parmi ces molécules, nous retrouvons la tyrosine kinase Syk, les petites GTPase Rho, Rac1 et Cdc42, ainsi que la PI 3-K (*Crowley et al., 1997; Hackman et al., 1997; Cox et al., 1997; Ninomiya et al., 1994*).

Le signal phagocytaire est induit via les récepteurs Fc $\gamma$  présents à la surface des macrophages et des monocytes. Ces récepteurs sont des protéines membranaires qui lient spécifiquement la portion Fc des IgG (*Ravetch et al., 1991; Daëron, 1997*). Les macrophages murins expriment trois sous-types de ces récepteurs Fc $\gamma$ . Le Fc $\gamma$ RI est le plus abondant et il est le seul à posséder trois domaines extracellulaires, lui conférant ainsi une très grande affinité pour son ligand, les IgG monomériques. Contrairement au Fc $\gamma$ RI, les Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII ont deux domaines extracellulaires et lient les IgG agrégées avec une faible affinité (*Kiener et al., 1993*).

L'engagement des Fc $\gamma$ R déclenche une série d'événements incluant une augmentation de calcium intracellulaire, une augmentation de la phosphorylation des protéines tyrosines cellulaires et l'internalisation des particules (*Greenberg et al., 1993; Kiefer et al., 1993*;

*Ninomiya et al., 1994; Liang et al., 1995; Crowley et al., 1997; Sanchez-Mejorada et al., 1998*). L'attachement aux FcR des particules opsonisées avec des IgG induit la phosphorylation des motifs ITAM (Immunoreceptors Tyrosine-based Activation Motifs) par la famille des kinases Src. Cette phosphorylation permet le recrutement et l'activation de la kinase Syk. L'utilisation de macrophages déficients en Syk (Syk<sup>-/-</sup>) a permis à *Kiefer et al.* et *Crowley et al.* de démontrer le rôle essentiel de Syk dans la phagocytose médiée par les FcR. L'importance des autres molécules de transduction incluant Rho, la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K), Rac 1 et Cdc42 a été mise en évidence par d'autres études (*Hackman et al., 1997; Ninomiya et al., 1994; Cox et al., 1997*).

L'utilisation d'activateurs et d'inhibiteurs a permis de démontrer l'implication de la protéine kinase C (PKC) dans la modulation de la phagocytose via les FcR. Ainsi, des inhibiteurs de PKC tels la staurosporine ou la calphostine C causent une diminution dose-dépendante de la phagocytose de particules opsonisées d'IgG. Ces études suggèrent donc un rôle pour PKC dans la phagocytose via les Fc $\gamma$ R (*Zheleznyak et al., 1992; Karimi et al., 1995; Karimi et al., 1998*). Malheureusement ces inhibiteurs pharmacologiques ne démontrent pas de spécificité envers les isoenzymes de PKC. Il existe six isoenzymes dans le macrophage, et à ce jour, on ne connaît toujours pas l'identité des isoenzymes impliquées dans la phagocytose. Des études d'*Allen et Aderem* en 1995, ont suggérées un rôle pour l'isoenzyme  $\alpha$  dans la phagocytose et la modulation de l'actine. Nous avons donc tenté de vérifier l'hypothèse suggérant que PKC- $\alpha$  serait impliquée dans la phagocytose et pourrait également jouer un rôle dans la cascade de signalisation intracellulaire.

Pour élucider le rôle de cette isoenzyme dans la phagocytose et la signalisation via les Fc $\gamma$ R, nous avons surexprimé un mutant dominant-négatif (DN) de PKC- $\alpha$  dans les macrophages de souris RAW 264.7. Ce mutant dominant-négatif contient une mutation dans son site d'attachement de l'ATP, rendant ainsi cette kinase inactive. Cette mutation a été introduite par mutagenèse dirigée et consiste à remplacer l'acide aminé lysine par un résidu acide aspartique. Ce mutant DN de PKC- $\alpha$  a par la suite été cloné dans le vecteur d'expression pCin4, obtenant ainsi la construction pCin DN PKC- $\alpha$ . La forme mutante compétitionne avec la forme endogène correspondante (*St-Denis et al., 1998*).

Les deux objectifs de mon projets de maîtrise étaient les suivants :

- 1) Déterminer le rôle de PKC- $\alpha$  dans la phagocytose
- 2) Déterminer le rôle de PKC- $\alpha$  dans la transduction des signaux via les récepteurs Fc $\gamma$ .



## **Revue de littérature**

# 1. Le Macrophage

## 1.1 Définition

Le terme macrophage fut utilisé il y a déjà plusieurs décennies par Metchnikoff, pour décrire cette large cellule phagocytaire mononuclée observée dans les tissus. Les macrophages sont des cellules effectrices pouvant jouer un rôle important dans la réponse immunitaire innée et acquise de l'hôte (*Gordon, 1998*). Ils sont les premières cellules à interagir avec les particules étrangères ou anormales pouvant se retrouver dans l'organisme. Les macrophages originent de la moëlle osseuse où l'on peut retrouver des macrophages résidants aussi bien que des précurseurs (*Adams et Hamilton, 1984*). Ces cellules proviennent de la différenciation des monoblastes, représentant le premier stade de différenciation, en promonocytes puis par la suite en monocytes, tous formés dans la moëlle osseuse. Leur différenciation se concrétise pour donner la forme mature tissulaire; le macrophage. La différenciation d'un monoblaste donne deux promonocytes qui, à son tour, donne deux monocytes et ainsi de suite. Les monocytes sont retrouvés dans le sang et doivent migrer dans les vaisseaux et se fixer à l'endothélium pour atteindre les tissus et ainsi devenir des macrophages (*Auger et Ross, 1992*). Cette adhérence à l'endothélium implique la présence de molécules d'adhésion telles LFA-1 et ICAM-1 (*Adams et Hamilton, 1984*). La présence de ces molécules permet aux monocytes de se rendre aux tissus et facilite leur migration au site d'inflammation. L'expression de ces molécules peut être augmentée par diverses cytokines.

Les macrophages sont des cellules relativement nombreuses puisqu'ils représentent de 1 à 6% des leucocytes dans le sang, et on peut en compter entre 300 et 700 par microlitre de sang. Leurs principales caractéristiques sont : leur grande taille (25 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre), la présence d'un noyau homogène, ainsi que la présence d'un nombre accru de récepteurs pour les IgG et le complément C3 (*Auger et Ross, 1992*). Fait à noter, les FcR sont présents à la surface des monoblastes, soit dès le stade le plus précoce du développement du macrophage.

## 1.2 Fonctions

Les macrophages sont impliqués dans plusieurs activités métaboliques incluant la dégradation des cellules sénescentes, la synthèse d'acide gras et le catabolisme des corticostéroïdes. Ils exécutent également des fonctions sécrétoires majeures, dépendamment de leur stade de différenciation, comprenant entre autres la production d'enzymes, mais aussi la production de lysozyme, la sécrétion d'oxide nitrique ainsi que de plusieurs cytokines proinflammatoires (*Auger et Ross, 1992*). Les macrophages ont de plus la capacité de recruter les cellules hématopoïétiques au site de l'inflammation, et de réguler leur activité. Les cellules phagocytaires telles le macrophage peuvent donc intervenir dans de multiples réactions immunitaires mais leur fonction principale est la phagocytose (*Adams et Hamilton, 1984*).

### 1.3 Récepteurs

Plusieurs récepteurs se retrouvent à la surface du macrophage. Ces récepteurs peuvent servir pour son activation, sa croissance et différenciation, la reconnaissance, sa migration ainsi que sa fonction de sécrétion. Les premiers récepteurs identifiés à la surface du macrophage ont été les récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines, appelés FcR. Ces récepteurs sont présents constitutivement à la surface de la cellule (*Allen et Aderem, 1996b*) et ils sont couplés à un canal spécifique au sodium. Lors de l'engagement du récepteur, il y a une entrée de sodium, abaissant ainsi le potentiel électrique membranaire de la cellule (*Greenberg et al., 1993*) et permettant plusieurs événements chez les macrophages tels la transmission des signaux, la réorganisation du cytosquelette requise pour la phagocytose et aussi la sécrétion de médiateurs solubles (*Zhang et al., 1998*). La phagocytose via ces récepteurs déclenche également la « flambée oxydative » caractérisée par la production de radicaux libres comprenant entre autre le superoxyde anion (*Hed et Stendahl, 1982*). Les notions sur les FcR seront approfondies plus loin (section 3).

Une autre famille de récepteurs se trouvant en grand nombre sur le macrophage sont les récepteurs du complément, principalement le CR1 et le CR3. Ces récepteurs peuvent également être impliqués dans l'attachement et l'ingestion de particules opsonisées de molécules du complément. Une stimulation préalable des macrophages est généralement nécessaire (*Adams et Hamilton, 1984; Allen et Aderem, 1996b*). De plus, la phagocytose via ces récepteurs se fait de façon plus discrète que la phagocytose par les FcR, et ne produit aucune « flambée oxydative » (*Hed et Stendahl, 1982*). Le récepteur CR3, contrairement au CR1, requiert la présence des ions divalents  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  pour lier son ligand (*Greenberg et Silverstein, 1993*). Une pléiade d'autres récepteurs a été identifiée, comprenant en autres les récepteurs de cytokines, permettant une

activation du macrophage, les récepteurs des lipoprotéines, les antigènes de surface tel le CD14, récepteur spécifique au lipopolysaccharide (LPS) ainsi que les récepteurs d'adhésion (*Auger et Ross, 1992*). Les récepteurs « lectine-like », qui sont spécifiques aux oligosaccharides, sont importants dans les interactions cellules-cellules. On retrouve également le récepteur du mannose qui peut médier, indépendamment des FcR et CR, la phagocytose (*Greenberg et Silverstein, 1993; Auger et Ross, 1992*).

Un autre récepteur présent à la surface du macrophage est le récepteur scavenger (SR). La principale fonction de ce récepteur est l'élimination des microbes et de constituants microbiens toxiques pour l'organisme (*Pearson, 1996*), suggérant ainsi un rôle pour les SR dans la défense de l'hôte. Les SR peuvent lier une grande variété de polyanions et des lipoprotéines de faible densité (LDL). Ces lipoprotéines peuvent être modifiées et comprennent les LDL acétylés ou oxydés. Il existe deux types de cette glycoprotéine, soit le type I et le type II, qui possèdent trois domaines extracellulaires pouvant participer à la liaison du ligand. Ces deux types de récepteurs sont obtenus par épissage alternatif et sont donc similaires quant à leur spécificité de liaison. Ce récepteur est de plus impliqué dans la pathogénèse de l'artériosclérose (*Auger et Ross, 1992; Haworth et al., 1997*).

## **2. Phagocytose**

### **2.1 Définition**

La phagocytose est l'élément essentiel de la réaction inflammatoire. Elle consiste en l'ingestion de particules ayant un diamètre plus grand que 0.5  $\mu\text{m}$ , incluant les agents infectieux,

les cellules sénescentes et les débris cellulaires (*Allen et Aderem, 1996b*). Ce processus peut se diviser en trois grandes étapes soit l'adhésion, l'ingestion et la digestion de la particule ingérée. L'adhésion permet un premier contact entre la particule à phagocyter et la cellule phagocytaire. Ce contact peut se faire directement ou peut-être facilité grâce à la présence d'opsonines telles les anticorps et permet ainsi une meilleure reconnaissance par les récepteurs. Les opsonines recouvrant la particule à ingérer peuvent être reconnues par des récepteurs spécifiques.

Suite à l'adhésion, la particule est ingérée et éventuellement digérée. Cette ingestion nécessite, en plus du contact ligand-récepteur, une modification de la membrane cellulaire. Puisque la forme et la structure de la membrane cellulaire sont dépendants du cytosquelette, une modification de la membrane nécessite une altération du cytosquelette ainsi qu'une polymérisation de l'actine. Le signal déclenché suite à l'engagement des récepteurs pour permettre cette internalisation et ce réarrangement de l'actine est encore inconnu. Cependant il est connu que l'actine joue un rôle important dans l'internalisation (*Greenberg et al., 1990; Allen et Aderem, 1995b*).

## 2.2 Modulation de l'actine

Le cytosquelette représente l'ensemble des fibres dans le cytoplasme. Il en existe trois grandes classes chez les eucaryotes, soient; les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (*Keenan et Kellehen, 1998*). L'actine est une composante essentielle du cytosquelette. Il s'agit d'une protéine contractile formant un réseau très organisé au sein de la cellule. Ces filaments (F-actine) sont en étroite relation avec la membrane cytoplasmique. La polymérisation de l'actine permet la formation de pseudopodes. Ces pseudopodes sont des prolongements membranaires permettant de capturer la particule à ingérer. Lors de la phagocytose de particules opsonisées d'IgG (IgG-SRBC) par exemple, on observe une accumulation de la F-actine, soit la forme filamenteuse de l'actine, autour du phagosome naissant (*Boxer et al., 1974*). Pour prouver l'implication de cette protéine dans l'internalisation, *Zigmond et Hirsch (1972)* ont démontré qu'en employant des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine, il y a une inhibition de l'internalisation de la particule. Ceci suggère donc que l'actine est une composante importante du cytosquelette requise lors de la phagocytose (*Greenberg et al., 1990*).

De plus, un fait important démontré en 1990 (*Greenberg et al., 1990*), est que l'actine que l'on retrouve distribuée autour du phagosome naissant est bien de l'actine nouvellement polymérisée et n'est pas dû simplement à une redistribution de l'actine. Ceci confirme que l'actine est une composante importante lors de la phagocytose et permet l'internalisation. Il existe plusieurs autres protéines associées au cytosquelette, telles la myosine et la taline. La taline est aussi colocalisée avec la F-actine lors de la phagocytose médiée par les FcR chez le

macrophage. Elle interagit de façon dynamique avec l'actine, lors de la formation des pseudopodes, permettant ainsi la capture de la particule ingérée (*Greenberg et al., 1990*).

*Kaplan* a démontré en 1977 que les macrophages ingéraient les particules opsonisées de façon différente dépendamment du récepteur qui était engagé pour l'ingestion, soit les CR ou les FcR. Une différence a été observée quant à ces deux modes de phagocytose (*Hed et Stendahl, 1982*) et il existe également une différence quant aux molécules Rho GTPases impliquées (*Caron et Hall, 1998*). Indépendamment du récepteur lié, soit les CR ou encore les FcR, les deux nécessitent les microfilaments d'actine (*Greenberg et al., 1993*). Cette implication fût démontrée au moyen de la cytochalasine C, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (*Zigmond et Hirsch, 1972*). L'actine semble toutefois prendre une place moins importante lors de la phagocytose via les CR (*Kaplan, 1977*) mais nécessite la présence de microtubules intacts contrairement à la phagocytose médiée par les FcR dont la présence des microtubules intacts est facultative mais qui nécessite la présence de tyrosines kinases (*Allen et Aderem, 1996b*).

A la lumière de cette étude, deux modèles furent proposés pour caractériser la phagocytose. Un premier modèle fut proposé par *Griffin et al.* en 1975, soit le mécanisme de « Zipper » (Zippering mechanism). Ce mécanisme semble spécifique à la phagocytose via les FcR. Lors de l'engagement de ce récepteur, on peut observer un soulèvement de la membrane qui englobe de façon très étroite la particule opsonisée. Seulement lorsque la particule est entièrement recouverte par la membrane, il y a ingestion à l'intérieur du macrophage. Une conséquence de ce modèle est que la phagocytose n'est possible que si le macrophage peut recouvrir la surface de la particule (*Griffin et al., 1975; Greenberg et Silverstein, 1993a*). Ce



mécanisme peut être observé lors de la phagocytose de quelques pathogènes incluant *Listeria monocytogenes*, *Yersina pseudotuberculosis* (Finlay et Cossart, 1997) ainsi que *Toxoplasma gondii* (Mordue et Sibley, 1997).

Le deuxième modèle possible lors de la phagocytose survient principalement lors de la phagocytose via les récepteurs du complément, les CR. L'attachement de la particule opsonisée au récepteur, déclenche une ingestion directe. Il ne semble pas nécessaire d'avoir un contact très étroit entre le récepteur membranaire et la particule pour permettre l'internalisation. Ce modèle est donc ainsi très différent du premier modèle proposé par Griffin *et al.* (1975), et ne ressemble donc en rien au modèle de « zipper ». On le surnomme le mécanisme de « trigger » (triggering mechanism) et on peut l'observer lors de la phagocytose de *Salmonella Typhimurium* et de *Shigella* (Finlay et Cossart, 1997). Cette différence dans les modes d'internalisation fut observée à plusieurs reprises et à des temps différents pour bien démontrer que le mode d'internalisation choisi n'est pas simplement un stade différent du même processus. Il reste à expliquer pourquoi les microfilaments d'actine sont moins importants dans le mécanisme « trigger ». Les deux modèles nécessitent la polymérisation de l'actine, cependant la différence dans la sensibilité à la cytochalasine C peut s'expliquer de plusieurs façons. Il se pourrait que l'internalisation via les CR implique principalement des structures autres que les microfilaments d'actine ou encore qu'il y ait plusieurs couches de filaments d'actine et que chaque couche répondent différemment comme l'ont démontré Reaven et Axline en 1973. Si tel est le cas, il est normal de penser que les couches inférieures répondent moins bien aux inhibiteurs (Kaplan, 1977).

## 2.3 MARCKS

Une protéine interagissant avec l'actine est MARCKS (Myristoylated alanine-rich C-Kinase substrate). Cette protéine de 87 kDa est un substrat majeur de la PKC et est phosphorylée durant, entre autre, la phagocytose (*Blackshear, 1993*). Cette protéine fût longtemps utilisée pour vérifier l'activité de la PKC (*Blackshear, 1993*). MARCKS se retrouve liée à l'actine et toutes ses activités sont dépendantes de sa phosphorylation par PKC. Elle possède une extrémité myristoylée lui permettant de s'ancrer à la membrane (*Blackshear, 1993*). Cette position lui permet de se retrouver accolée à la protéine kinase C, permettant ainsi une proximité pour la phosphorylation. Cette phosphorylation cause un relâchement de MARCKS de la membrane vers les organelles tardifs, tels les lysosomes (*Blackshear, 1993*). L'utilisation d'inhibiteurs de PKC a permis de démontrer que l'inhibition de l'activité kinase de PKC permet une réassociation de MARCKS avec la membrane et l'inverse est aussi vrai puisque l'utilisation d'activateur tel le PMA (Phorbol myristate acetate) promeut la phosphorylation de MARCKS et son détachement de la membrane, prouvant ainsi l'interaction entre eux (*Allen et Aderem, 1995a*). La présence de MARCKS aux sites où l'actine interagit avec la surface cytoplasmique de la membrane indique que la protéine MARCKS régule les interactions actine-membrane (*Allen et Aderem, 1995a*).

## 2.4 Maturation du phagosome et mécanismes d'évasion

Suite à l'ingestion de la particule, il y a formation d'une vacuole de phagocytose, le phagosome, qui est constitué initialement de membrane plasmique. Le phagosome est un compartiment qui s'accrole étroitement à la particule ingérée. Cette vacuole contenant la particule ingérée s'acidifiera graduellement suite à la fusion partielle et transitoire avec d'autres organelles

tels les endosomes précoces ou tardifs, puis ensuite avec les lysosomes (Alberts et al., 1990). De façon générale, lors de la fusion du phagosome avec les autres organelles, il y a un échange cytoplasmique permettant l'acquisition d'hydrolases et de protéines impliquées dans la formation de la pompe à protons, pour favoriser l'acidification du phagosome (Alberts et al., 1990), et il y a également un échange de molécules de surface (Desjardins, 1995). Ce transfert se fait probablement par la présence d'un pore de fusion. Chaque organelle possède à sa surface des marqueurs qui lui sont spécifiques et qui les distinguent des autres organelles. L'échange de ces molécules permet d'identifier le stade de maturation des organelles mais aussi permet de vérifier que le phagosome a bien fusionné avec telle ou telle autres organelles. Cette fusion avec les autres organelles est un processus qui est probablement dépendant des microtubules, permettant ainsi le trafic cellulaire (Desjardins, 1995). La formation d'une vacuole finale, le phagolysosome, riche en hydrolases et à pH acide (pH 4.7-5.2) (Alberts et al., 1990; Antoine et al., 1990) engendre la dégradation de la particule ingérée en fragments.

La dégradation de la particule ingérée semble inévitable suite à la fusion entre phagosome et organelles plus acides, pourtant bon nombre de parasites peuvent détourner cette maturation du phagosome et ainsi éviter la destruction pour causer des infections persistantes. Les mécanismes utilisés sont complexes et encore peu connus. Cependant, certains ont été étudiés et commencent à être élucidés.

### *Toxoplasma gondii*

Suite à l'invasion active de la cellule hôte, le parasite protozoaire *Toxoplasma gondii* réside dans une vacuole intracellulaire. Son entrée peut se faire autant dans des cellules

phagocytaires que non phagocytaires et elle se fait de façon silencieuse, sans induire la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de radicaux libres (*Joiner et al., 1990*). La vacuole contenant *T.gondii* est incapable de fusionner avec d'autres organelles, tels les endosomes ou lysosomes, empêchant ainsi l'acidification et le dégradation du parasite (*Joiner et al., 1990*). Le parasite peut demeurer ainsi et il peut se multiplier pendant 8 à 10 heures pour finalement lyser la cellule environ 24 heures plus tard (*Mordue et al., 1997*). Deux hypothèses sont possibles pour expliquer cette résistance. Tout d'abord, lors de son entrée le parasite peut produire un inhibiteur du processus de maturation du phagosome, qu'il libère par exocytose, ou encore, le parasite forme une membrane vacuolaire ne possédant pas les signaux nécessaires pour la fusion avec les autres compartiments intracellulaires. D'une façon comme une autre, le parasite empêche ainsi sa dégradation (*Joiner et al., 1990; Mordue et al., 1997*).

*T. gondii* peut pénétrer dans la cellule de deux façons; soit l'invasion active tel qu'expliqué précédemment, ou encore, l'invasion passive caractérisée par une phagocytose via les FcR (*Erbe et al., 1991*). Ce mode d'invasion diffère du premier puisque *T. gondii* peut être éliminé de la cellule par le processus d'acidification habituel. Contrairement à l'invasion active du parasite via les FcR, la phagocytose donne lieu à un phagosome ayant la capacité de fusionner avec les organelles de maturation tels les endosomes, et lysosomes et d'ainsi acidifier le phagosome et détruire le parasite. Cette maturation du phagosome peut être observée par l'acquisition des marqueurs de surfaces spécifiques (*Mordue et al., 1997*). La phagocytose du parasite est possible lorsqu'il est opsonisé d'anticorps antitoxoplasma (*Erbe et al., 1991*).

### *Mycobacterium tuberculosis*

Le même processus d'inhibition de fusion est observé pour *Mycobacterium*, une bactérie intracellulaire. Sa survie est possible dans la vacuole de phagocytose et il y a incapacité à former le phagolysosome et ainsi d'exposer le parasite aux hydrolases lysosomales. La fusion avec les endosomes fût toutefois observée mais jamais avec les lysosomes (Clemens et Horwitz, 1996), limitant ainsi sa maturation. Dans le cas de ce parasite, l'effet de limiter sa fusion peut être dû aux interactions ioniques entre les sulfatides, des lipides acides, et la membrane des organelles. Les sulfatides exercent une inhibition sur la membrane de fusion, ils interfèrent dans leur capacité de fusionner et de former le phagolysosome (Frehel et Rastogi, 1987). L'introduction directe de sulfatides dans les phagosomes cause un effet d'antifusion (Goren et al., 1976; Frehel et Rastogi, 1987). Cette absence de fusion peut être détectée par l'absence du marqueur de surface LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein-1) caractéristique des lysosomes. L'acidification de la vacuole requiert l'acquisition d'une pompe à proton-ATPase. Or, cette pompe est absente des vacuoles contenant le parasite *Mycobacterium* (Sturgill-Koszycki et al., 1994; Russell, 1995). Si toutefois le présence de LAMP peut-être détectée quelque fois sur les phagosomes, l'absence de la pompe ATPase est certaine (Sturgill-Koszycki et al., 1994).

### *Leishmania donovani*

*Leishmania* est un parasite intracellulaire obligatoire causant une infection persistante et qui existe sous deux formes. La forme promastigote se retrouve principalement dans le vecteur du *Leishmania*; soit le moustique *Phlebotomus*. Cette forme flagellée sera injectée à l'homme lors d'un repas sanguin par le moustique vecteur. Une fois dans l'organisme de l'humain, il sera

phagocyté comme tout autre pathogène. Il prendra alors une autre forme, non flagellée cette fois, la forme amastigote. Contrairement à tous les autres pathogènes, *Leishmania* peut survivre dans un environnement hostile et acide mais en plus il peut y proliférer (Turco et Descoteaux., 1992). Suite à sa prolifération dans le phagolysosome, il lysera le macrophage, relâchant ainsi plusieurs amastigotes qui infecteront les macrophages voisins. Cette résistance serait attribuée à la présence d'un composé glycolipidique à la surface des promastigotes uniquement, le lipophosphoglycan (LPG). Ce composé permet le transfert du parasite, du moustique vecteur vers l'intérieur du phagolysosome contenu dans le macrophage. Une fois à l'intérieur du macrophage, le LPG permet la survie du promastigote en inhibant entre autre l'activité de PKC, qui serait probablement responsable du mouvement des organelles, et la synthèse d'oxide nitrique. La présence du LPG permettrait la survie de la forme promastigote durant la phase précoce d'infection en inhibant la fusion phagosome-lysosome, jusqu'à la différenciation en amastigote, forme sans LPG résistante à l'acidification (Desjardins et Descoteaux, 1997). En plus de rendre le promastigote résistant à la destruction, le LPG serait le ligand permettant au parasite d'être phagocyté.

Le macrophage n'est pas seulement une cellule hôte pour les parasites, mais c'est aussi une cellule présentatrice d'antigène. Mais suite à une infection par *Leishmania*, il y a une faible présentation de ce parasite à la surface. Probablement parce que le parasite ne libère que peu d'antigènes, ou encore parce qu'il interfère dans une des étapes menant à l'exposition du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) lié au peptide à la surface de la cellule (Wolfram et al., 1995).

## *Shigella flexneri*

*Shigella* est une bactérie gram-négative. Ce pathogène entérique envahit la muqueuse de l'estomac et du côlon chez l'humain. La pathogénécité de cet organisme virulent est liée au fait qu'il induit sa propre phagocytose par les cellules épithéliales, il croît rapidement dans la cellule et finalement il tue la cellule hôte. Le mécanisme par lequel *S. Flexneri* peut survivre dans l'organisme commence à être élucidé (Clerc et al., 1986). Tel que mentionné précédemment, un pathogène phagocyté se retrouve prisonnier d'une vacuole de phagocytose, le phagosome. *Shigella* possède la particularité de s'évader du phagosome en quelques minutes suivant sa phagocytose et de se multiplier librement dans le cytoplasme. Elle évite ainsi l'acidification graduelle du phagosome et éventuellement sa destruction (Clerc et al., 1986). Une fois libre dans le cytoplasme, elle peut se répandre et infecter les cellules voisines via les jonctions cellulaires. *Shigella* causera éventuellement l'apoptose du macrophage. Suite à une infection avec une souche sauvage de *Shigella*, une fragmentation de l'ADN, caractéristique à l'apoptose, peut être observée. Cette apoptose est induite par la protéase ICE (Zychlinsky et al., 1997a). On peut observer un taux d'apoptose plus élevé dans la muqueuse rectale des patients atteints de Shigellose. Cette infection persistente est la cause de plusieurs symptômes, mais le plus caractéristique est la diarrhée saignante (Zychlinsky et al., 1997b).

*Shigella* libère quatre invasines causant la mort cellulaire. Ces invasines se nomment Ipa A, Ipa B, Ipa C, Ipa D. Toutefois seul Ipa B semble nécessaire pour induire l'apoptose puisqu'elle est la seule à se fixer à la protéase ICE. Il est permis de penser que ce mécanisme de résistance induit par *Shigella* ainsi que l'apoptose du macrophage permet deux choses. Tout d'abord, en induisant l'apoptose du macrophage, *Shigella* élimine la cellule la plus efficace contre



les infections, bactériennes et autres, assurant ainsi sa survie. De plus, en induisant une réponse inflammatoire causant des dommages tissulaires, cela rend une future invasion bactérienne possible (Zychlinsky et al., 1997a).

### 3 Récepteurs Fc

#### 3.1 Définition

Les macrophages expriment une variété de récepteurs à leur surface incluant les CR et surtout les FcR. Ces récepteurs Fc sont des protéines membranaires qui reconnaissent la portion Fc des Ig. Les FcR sont définis par leur spécificité pour les isotypes des immunoglobulines. Il existe cinq classes de FcR soit une pour chacune des cinq classes d'immunoglobulines. Ainsi, les  $Fc\alpha R$ ,  $Fc\epsilon R$ ,  $Fc\mu R$ ,  $Fc\delta R$  sont spécifiques pour les IgA, IgE, IgM, IgD respectivement. Ceux qui nous intéressent particulièrement sont les  $Fc\gamma R$ , spécifiques aux IgG. Ils sont capables d'engendrer l'activation des cellules par une phosphorylation de leurs motifs intracytoplasmiques, ressemblant aux sous-unités de transduction que l'on retrouve pour le BCR (B cell receptor) ou encore le TCR (T cell receptor). Les récepteurs ne possédant pas ces motifs d'activation ne peuvent que difficilement activer une cellule. L'activation de ces récepteurs et la transmission d'un signal requiert l'aggrégation des FcR par un anticorps ou encore un antigène multivalent (Daëron, 1997). Ces FcR sont des membres de la superfamille des immunoglobulines et ils se divisent en trois classes soient les  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RII$  et  $Fc\gamma RIII$ . Chaque classe possède des caractéristiques qui lui sont propres tant au niveau des domaines extracellulaires qu'intracellulaires et, de plus, ils possèdent une affinité différente pour les anticorps (**Figure A**).



### 3.2 Caractéristiques

Les Fc $\gamma$ RI (CD64) sont exprimés principalement à la surface des macrophages, monocytes et neutrophiles. Ils ont un poids moléculaire avoisinant les 72 kDa (*Sanchez-Mejorada et Rosales, 1998*). La propriété la plus distincte de ces récepteurs est leur grande affinité pour le ligand (*Ravetch et Kinet, 1991*), principalement les IgG monomériques (*Kiener et al., 1993*). Cette forte affinité pourrait s'expliquer par la présence des trois domaines extracellulaires « Immunoglobuline-like ». De plus, on retrouve en portion intracytoplasmique, une chaîne  $\gamma$  en plus de leur chaîne  $\alpha$ , permettant la transduction des signaux à l'intérieur de la cellule (*Kiener et al., 1991*). La liaison de certains récepteurs peut causer un signal d'inhibition contraire au signal d'activation habituel (*Sutterwala et Mosser, 1999*). Il semblerait donc que la liaison de Fc $\gamma$ RI cause une augmentation de la production de l'interleukine 10 ainsi qu'une inhibition de la production de l'interleukine 12 (*Sutterwala et Mosser, 1999*).

Les Fc $\gamma$ RII (CD32) se divisent en deux sous-classes principales soient les Fc $\gamma$ RIIA et les Fc $\gamma$ RIIB. Les récepteurs Fc $\gamma$ RIIA se retrouvent principalement chez le macrophage tandis que les Fc $\gamma$ RIIB se retrouvent surtout sur les cellules B et T. Ils ont un poids moléculaire d'environ 40 kDa et deux domaines extracellulaires « Immunoglobuline-like » expliquant leur plus faible affinité pour les IgG agrégés (*Kiener et al., 1993*). Les Fc $\gamma$ RII se distinguent des autres classes de récepteurs Fc par le fait qu'ils sont les seuls à avoir la capacité d'acheminer les signaux et

d'activer la cellule sans sous-unité supplémentaire (tel la sous-unité  $\gamma$ ). Seule leur chaîne  $\alpha$  est requise pour la transmission des signaux (*Sanchez-Mejorada et Rosales, 1998*).

Les récepteurs possèdent dans leurs portions intracytoplasmiques des motifs d'activation pour permettre la transduction des signaux. Ces motifs se nomment ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) et seront décrits ultérieurement (section 4). Cependant, il a été découvert récemment (*Clynes et al., 1999*) que les Fc $\gamma$ RIIB possèdent des motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) , donc des motifs d'inhibition, en remplacement des motifs ITAM habituels et ils recrutent ainsi la protéine phosphatase SHIP (SH<sub>2</sub>-containing polyinositol phosphatase) (*Ravetch, 1997*). La présence de ces motifs semblerait inhiber la phagocytose spécifique pour les Fc $\gamma$ RIIA. Le moyen par lequel il y a tout de même phagocytose via ce récepteur est encore inconnu, cependant deux hypothèses sont plausibles; soit que la phagocytose via le récepteur Fc $\gamma$ RIIA ait lieu dans les cellules possédant un plus grand nombre de récepteurs Fc $\gamma$ RIIA que Fc $\gamma$ RIIB ou bien que la phagocytose ait lieu lorsque l'affinité de la particule opsonisée d'immunoglobulines est plus grande pour le récepteur de phagocytose que pour celui d'inhibition.

Finalement, le CD16 (Fc $\gamma$ RIII) possède lui aussi deux domaines extracellulaires « Immunoglobuline-like », donc une faible affinité pour les IgG agrégés, et a un poids variant

entre 50-70 kDa. On retrouve deux types de Fc $\gamma$ RIII, soit les Fc $\gamma$ RIIIA et les Fc $\gamma$ RIIIB. Les Fc $\gamma$ RIIIA se retrouvent principalement chez les cellules NK et les macrophages et peuvent transmettre les signaux intracellulaires uniquement si la chaîne  $\gamma$  est présente. Quant aux Fc $\gamma$ RIIIB, ils se retrouvent sur les neutrophiles et ne possède aucune portion intracytoplasmique (*Sanchez-Mejorada et Rosales, 1998*). Ce récepteur peut déclencher tous les événements précoces de la phagocytose en initiant un signal de transduction tel l'influx calcique ou encore la polymérisation de l'actine mais est incapable de phagocyter (*Sanchez-Mejorada et Rosales, 1998*).

#### **4 Voie de signalisation**

##### **4.1 Généralités**

Les récepteurs de surface servent à répondre à divers stimuli. Suite à l'attachement ou l'ingestion d'une particule opsonisée par les récepteurs tels les FcR, on peut observer un réarrangement du cytosquelette ainsi que le déclenchement d'une cascade biochimique intracytoplasmique. Cette voie de signalisation permet la régulation des protéines kinases et contrôle également l'activité des protéines impliquées dans les événements métaboliques et transcriptionnels. L'attachement de la particule au récepteur est suffisant pour engendrer la phosphorylation de plusieurs substrats se trouvant en aval de la portion intracytoplasmique du récepteur (*Sanchez-Mejoradas et Rosales, 1998*). L'engagement du récepteur permet, par un

mécanisme encore inconnu, la déphosphorylation d'une kinase de la famille des Src. Cette kinase se retrouve initialement repliée sur elle-même suite à une interaction intramoléculaire entre sa queue et son domaine SH<sub>2</sub>, bloquant ainsi tout accès à son site catalytique et rendant l'enzyme inactive. La déphosphorylation se fait probablement par une phosphatase, CD45, et libère ainsi son domaine catalytique permettant l'activation de Src et la phosphorylation des motifs ITAMs se trouvant sur la chaîne intracytoplasmique  $\gamma$  des récepteurs. Par la suite, il y a recrutement aux motifs ITAMs d'une autre protéine tyrosine kinase, p72<sup>Syk</sup> (Kiener *et al.*, 1993; Cox *et al.*, 1996; Crowley *et al.*, 1997) (Figure B)

#### 4.2 Syk / Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)

Il semble y avoir un lien très étroit entre les protéines tyrosines kinases (PTK) non-récepteurs de la famille Src et Syk. L'activation des protéines de la famille Src recrute de façon générale celles de la famille Syk. Cette relation entre la famille Src et Syk fut démontrée il y a quelques années lorsqu'on construisit un triple mutant pour les trois tyrosines kinases de la famille des Src, soit *hck*<sup>-/-</sup> *fgr*<sup>-/-</sup> *lyn*<sup>-/-</sup>. Suite à cette construction, l'on observa une déficience dans la phosphorylation de Syk suite à son activation par les FcR (Crowley *et al.*, 1997). Par la suite, plusieurs études ont démontré l'importance de cette tyrosine dans la phagocytose médiée par les FcR ainsi que dans la signalisation et la polymérisation d'actine (Cox *et al.*, 1996; Crowley *et al.*, 1997; Sada *et al.*, 1997; Kiefer *et al.*, 1998). Syk est une PTK de 72 kDa. Elle possède deux

domaines amino-terminal SH<sub>2</sub> (phosphotyrosine-binding Src-homology 2) pouvant se lier aux ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) phosphorylé de la sous-unité de signalisation des récepteurs. Cette PTK est essentielle dans la phagocytose puisqu'une mutation de ce gène (Syk *-/-*) dans les macrophages donne lieu à une inhibition de phagocytose et l'activation de plusieurs événements de signalisation comprenant entre autres l'activation de ERK et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) (Crowley *et al.*, 1997; Kiefer *et al.*, 1998). L'implication de Syk dans la polymérisation de l'actine lors de la phagocytose médiée par les FcR a été démontrée par Cox *et al.* en 1996. De plus, la surexpression de Syk permet une augmentation locale de l'accumulation d'actine lors de la phagocytose d'IgG-SRBC mais cette accumulation d'actine seule ne permet pas l'ingestion et l'internalisation de la particule (Crowley *et al.*, 1997). L'implication de Syk n'est donc pas unique dans ce processus et d'autres éléments doivent être requis pour permettre le processus phagocytaire. Certains de ces éléments ont déjà été découverts mais plusieurs restent encore à déterminer.

Tel que mentionné précédemment, Syk semble avoir une influence sur la PI 3-K (Crowley *et al.*, 1997). La phosphorylation de cette enzyme est observée suite à l'engagement des FcR. Cette enzyme est constituée de deux sous-unités, soit une sous-unité de régulation de 85 kDa (p85) et une catalytique de 110 kDa (p110). Il existe quatre membres de cette même famille, soient p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . Les deux premiers isoformes semblent être ubiquitaires, tandis que les deux autres se sont principalement exprimées dans les cellules hématopoïétiques (Duronio *et al.*, 1998).

L'activation de cette protéine est permise lors de la liaison entre les deux domaines SH<sub>2</sub> de la p85 avec une tyrosine phosphorylée (*Kanakaraj et al., 1994*). La PI 3-Kinase phosphoryle la position 3-OH des anneaux inositol de PI, PIP et PIP<sub>2</sub>. Les principaux produits de PI 3-kinase sont le PIP<sub>2</sub> et le PIP<sub>3</sub> (*Duronio et al., 1998*). La phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) permet l'hydrolyse de ces produits pour donner de l'IP<sub>3</sub> et du diacylglycérol (DAG) (*Kanakaraj et al., 1994; Ninomiya et al., 1994*). Le DAG est le principal activateur de la PKC.

Plusieurs études précédentes par *Ninomiya et al.* en 1994 ont permis de démontrer que la PI 3-Kinase était également impliquée dans la phagocytose mais selon *Duronio et al.* ainsi que *Ferby et al.*, la PI 3-K n'est pas impliquée dans l'activation des MAPK, telle Extracellular signal-regulated kinase (ERK), contrairement à Syk. L'implication de PI 3-K dans la phagocytose fut démontrée par l'utilisation de la Wortmannin, un inhibiteur de la PI 3-K. Cet inhibiteur abolit la phagocytose via les FcR, suggérant ainsi un rôle pour la PI 3-K dans ce processus. Pour démontrer que la PI 3-K n'était pas impliquée dans l'activité de MAPK, ils ont utilisé deux techniques, soit l'utilisation de l'inhibiteur Wortmannin, ainsi qu'un mutant dominant-négatif pour la p85. Ces expériences démontrent bien que la PI 3-K ne joue aucun rôle dans l'activation des MAPK.

Après plusieurs études sur l'interaction entre la PI 3-K et PKC, il y aurait des évidences que l'activité de PI 3-K pourrait être importante pour la régulation de certaines isoenzymes, principalement la PKC $\zeta$  (*Duronio et al., 1998*). Il existe également une association possible entre la PI 3-K et Vav, protooncogène permettant l'échange de guanine, soit le recyclage de la GDP en GTP.

### 4.3 Guanine nucleotide exchange factor (GEF) / Vav

Le principal facteur d'échange est Vav. Vav est un protooncogène de 95 kDa qui est présent dans toutes les cellules hématopoïétiques (*Collins et al., 1997*). Il fonctionne comme un facteur d'échange pour Ras et les petites GTPases de la famille Rho impliquées dans la réorganisation du cytosquelette et la production de cytokines chez les cellules T. Ce protooncogène permet la transformation du GDP en GTP (*Kong et al., 1998*) et s'avère être très utile pour Ras. Vav est fortement et rapidement phosphorylé en réponse à l'engagement des récepteurs de surface (*Bustelo, 1996*), tels que le BCR, TCR, les FcεR et FcγR, les récepteurs des cytokines interleukines (IL) IL-2, IL-3, IL-5, IFN-α ainsi que plusieurs autres (*Costello et al., 1997*). Il peut se lier à plusieurs protéines en raison de ses nombreux domaines et possède donc différentes fonctions dans la cascade de signalisation. L'utilisation de cellules B et T déficientes en Vav (*Vav<sup>-/-</sup>*) a permis de déterminer un rôle pour ce protooncogène dans le développement de ces cellules ainsi qu'un rôle dans l'hématopoïèse (*Collins et al., 1997*). De plus, une délétion du gène Vav (*Vav<sup>-/-</sup>*) dans des cellules T a permis de démontrer un rôle pour ce protooncogène dans la phosphorylation des MAPK et du facteur de transcription NF-κB (*Costello et al., 1999*).

Ces principales liaisons se font tout d'abord avec certaines protéines de la famille des Src, telle lck (*Gupta, 1994*). La liaison entre les deux protéines est médiée par le domaine SH2 et permet la phosphorylation de Vav. L'association avec une autre PTK non-récepteur, Syk/Zap-

70, est possible aussi grâce au domaine SH2. Ce domaine chez Vav semble servir à plusieurs interactions puisque c'est au moyen de ce même domaine que Vav peut interagir avec SHC (SH<sub>2</sub>-domain-containing adaptor protein), la sous-unité régulatrice de la PI 3-K et PLC  $\gamma$  (*Collins et al., 1997*).

Un autre domaine présent chez Vav est le domaine SH3. Ce domaine permet des interactions toutes aussi importantes que celles médiées par le domaine SH2. Une séquence riche en proline dans la portion N-terminale de ce domaine se lie au domaine SH3 de Grb2. Cette association en plus de celle avec SHC, permet la formation d'un complexe (Vav-SHC-Grb2-Sos) impliqué dans la voie de signalisation de Ras et aussi de Rac-1. Ras est éventuellement impliqué dans la régulation de la voie des MAPK (ERK) et Rac-1 est impliqué dans la régulation de la voie de deux autres MAPK, JNK (c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) et p38 (*Cobb et al., 1995*). Le domaine PH de Vav permet des interactions avec l'actine, suggérant un rôle pour Vav dans le réarrangement du cytosquelette (*Bustelo, 1996*). De plus, des études ont démontré que des cellules T Vav *-/-* sont déficientes quant à la polymérisation de l'actine, suite à la liaison du CD3 avec un anticorps spécifique. On observe le même phénomène lors de l'utilisation de la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (*Kong et al., 1998*).



#### 4.4 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

Suite à l'activation des PTK non-récepteurs de la famille Src et Syk par un signal extracellulaire, il y a transmission d'instructions intracellulaires pour coordonner une réponse appropriée. Plusieurs voies peuvent être activées, mais celle qui est activée de façon préférentielle est celle des MAPK (*Robinson et Cobb, 1997*). Les MAPK font partie d'une voie de signalisation menant à l'activation de facteurs de transcription nucléaires. Les deux principaux embranchements comprennent la voie de Ras, passant par RAF-1, MEK (MAPK/ERK kinase) pour mener à l'activation de MAPK (ERK 1/2) permettant l'activation entre autre de c-myc, SAP-1 et ELK-1 (Ets domain protein) (*Gupta et al., 1994; Seger et al., 1995*). L'autre voie, celle de Rac-1, mène à l'activation de deux MAPK médiées en réponse à des facteurs de stress cellulaire soit JNK/SAPK (c-jun NH<sub>2</sub>-terminale/ stress-activated protein kinase) et p38. Ils permettent l'activation entre autre des facteurs de transcription c-jun, ATF2 et MAX (*Robinson et al., 1997*).

MAPK est aussi connue sous le nom de ERK (extracellular signal-regulated kinase). Il s'agit d'une protéine sérine/thréonine kinase. Son activation requiert la phosphorylation de résidus thréonine et tyrosine spécifiques par la MAPK/ERK kinase (MEK). Il existe cinq membres de la famille MEK, soient MEK 1 à 5. Il a été démontré par *Waskiewicz et al.* en 1995 que la MEK 1/2 agit sur ERK 1/2, que MEK 3 agit sur p38 et que MEK4 agit sur JNK/SAPK (Stress-activated

protein kinase), et possiblement aussi sur p38. MEK5 n'a pas de substrat connu (**Figure C**). Des études précédentes de *Sanchez-Mejorada et Rosales* en 1996, ont démontré que l'inhibition de MEK dans les monocytes diminuait l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B lors de la phagocytose via les FcR, et que ce processus d'activation semblait être indépendant de Ras et Raf-1. Effectivement, lors de l'utilisation de mutants dominant-négatif pour Ras ou Raf, aucune modulation de l'activité de NF- $\kappa$ B ne fut observée. Ceci suggère que MEK/ MAPK sont impliqués dans l'activation de NF- $\kappa$ B mais que ce processus est indépendant des protéines Ras et Raf que l'on retrouve en amont.

La kinase MEK est elle-même le substrat de phosphorylation d'une autre kinase, MEK kinase (MEKK) (*Blumer et al, 1994*). MEKK1 active autant ERK 1/2 que JNK et p38. L'effet de MEKK1 peut dépendre du type cellulaire employé (*Robinson et al, 1997*). Cependant, MEKK2 active préférentiellement JNK/SAPK et MEKK3 active ERK.

Près de la moitié des kinases ERK présentes dans une cellule inactive sont liées au cytosquelette, supportant ainsi la possibilité que ERK soit impliquée dans le réarrangement du cytosquelette et la phagocytose. A l'aide d'un inhibiteur de MEK permettant de diminuer l'activité des MAPK, une inhibition de la phagocytose fut observée, suggérant ainsi un rôle pour les MAPK dans la cascade de signalisation précédant l'internalisation (*Suchard et al., 1997*). Cependant, des études plus récentes de *Karimi et Lennartz*, en 1998, ont démontré le contraire. Pour vérifier si les MAPK étaient requises pour la phagocytose, ils ont utilisé le PD098059, un

inhibiteur spécifique de MEK et qui n'affecte que la phosphorylation de MAPK sans affecter celle de p38 et JNK. L'inhibition de MEK ne diminue pas de façon significative la phagocytose de particules opsonisées d'Ig, suggérant que MAPK n'est pas requise lors du processus phagocytaire via les FcR. *Karimi et Lennartz* soulèvent donc l'hypothèse que MAPK (ERK 1/2) serait activée durant le processus phagocytaire via les FcR mais qu'elle ne serait pas requis pour la phagocytose. Cette différence pourrait être due à la lignée cellulaire utilisée qui diffère dans ces deux expériences. *Suchard et al.* mentionnent que l'incapacité d'obtenir plus de 50% d'inhibition de la phagocytose pourrait s'expliquer par le fait qu'il y a implication d'une voie parallèle ou convergente. De plus, il faut mentionner que *Karimi et Lennartz* n'ont pas mesuré directement l'activité de MEK suite à l'utilisation de l'inhibiteur, donc ils ne peuvent exclure la possibilité que PD098059 inactive MAPK par une voie qui court-circuite MEK.

#### 4.5 Phospholipase C (PLC $\gamma$ ) / Protéine kinase C (PKC)

La phospholipase C catalyse l'hydrolyse du produit de la PI 3-kinase, le PIP<sub>2</sub>, en IP<sub>3</sub> et en DAG. L'IP<sub>3</sub> est nécessaire à l'influx calcique dans la cellule et le DAG est un activateur endogène de la PKC. Il agit en se liant aux domaines C1 riches en cystéines des PKC. L'activation de la PKC permet plusieurs fonctions du macrophage, telles la phagocytose, la sécrétion de cytokines et l'activation de plusieurs protéines. Tel que décrit dans la section suivante (section 5.3), l'implication de PKC dans la phagocytose a été démontrée à plusieurs

reprises (*Zheleznyak et Brown, 1992; Allen et Aderem, 1995b*). Tout d'abord, l'implication de PKC- $\zeta$  dans l'activation de la PI 3-kinase a été démontrée par l'utilisation d'inhibiteurs de PI 3-K, la Wortmannin, qui diminuerait l'activité de la PKC- $\zeta$ , et également par l'utilisation d'un dominant-négatif DN de la sous-unité p85 de PI 3-K inhibant l'activité de cette même PKC (*Herrera-Velit et al., 1997*). La même isoenzyme de PKC, soit PKC- $\zeta$ , est aussi impliquée dans l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Un mutant DN de PKC- $\zeta$  inhibe de façon considérable l'activation de NF- $\kappa$ B, tandis qu'une surexpression de l'isoenzyme permet une nette augmentation de l'activité du même facteur de transcription (*Diaz-Meco et al., 1993; Diaz-Meco et al., 1994*). D'autres isoenzymes peuvent intervenir dans l'activation d'autres protéines comme c'est le cas pour Raf-1. L'isoenzyme  $\alpha$  phosphoryle directement Raf-1 (*Kolch et al., 1993*), qui fait partie de la cascade de signalisation de Ras et mène à l'activation des MAPK lors d'une stimulation par le TPA (12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), un activateur de certaines isoenzymes de PKC, dans les fibroblastes. Ces résultats permettaient de croire à un lien existant entre PKC- $\alpha$  et les MAPK. Ce processus dépend aussi de PKC- $\epsilon$  (*Cai et al., 1997; Schönwasser et al., 1998*) mais passerait par une voie indépendante de Ras. La construction de mutants DN pour les isoenzymes  $\alpha$  et  $\epsilon$  ont permis de vérifier leur rôle dans l'activation de Raf-1. Le rôle de PKC- $\alpha$  dans la cascade de signalisation sera discuté ultérieurement (section 5.4).

#### 4.6 NF- $\kappa$ B / I $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription eucaryotique ubiquitaire présent entre autre dans les macrophages, les cellules B et certaines neurones. NF- $\kappa$ B est un dimère de protéines membres de la famille rel, comprenant les sous-unités p50 et p65. Chaque membre comprend un domaine N-terminal de 300 acides aminés conservés connu sous le nom de domaine d'homologie à Rel (Relish) (RHD). Cette région contient une séquence de localisation nucléaire et est responsable de la liaison à l'ADN, de la dimérisation et de l'interaction avec I $\kappa$ B. Le nom NF- $\kappa$ B vient du fait qu'il a été décrit en 1986 comme étant un facteur nécessaire pour la transcription de la chaîne légère kappa des immunoglobulines chez les cellules B (*Ghosh et al., 1998*). NF- $\kappa$ B existe dans le cytoplasme sous une forme inactive puisque lié à I $\kappa$ B, son inhibiteur. I $\kappa$ B forme un complexe avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, et suite à la phosphorylation de I $\kappa$ B, on observe sa dissociation et sa dégradation. Cette dissociation permet à NF- $\kappa$ B d'être actif et de transloquer au noyau (*Ghosh et al., 1998*). NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée en modulant la production de cytokines essentielles à la réponse immune telles IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  et IFN- $\gamma$  (*Ghosh et al., 1998*). Ces cytokines ont des effets multiples contribuant à l'inflammation, suggérant ainsi que NF- $\kappa$ B est une protéine importante dans la régulation de la réponse à l'inflammation.

## 5. Protéine kinase C

### 5.1 Définition

La PKC est une protéine sérine/thréonine kinase qui joue différents rôles dans le cycle cellulaire tels la régulation, la différenciation et le développement cellulaire (*Nishizuka, 1995*). Ses principaux activateurs sont le DAG, produit par l'action de la PLC sur le PIP<sub>2</sub> lors du cycle du phosphatidylinositol (PI), ainsi que les phorbol esters tel le PMA. La famille des PKC comprend douze isoenzymes. Ces isoenzymes ont été regroupées en trois sous-familles dépendamment de leur structure et de leur mode d'activation; soient les PKC classiques (ou conventionnelles), nouvelles et atypiques (**Figure D**).

On peut retrouver jusqu'à quatre domaines conservés (C) et quatre domaines variables (V), mais tous ces domaines varient selon l'isoenzyme. Le domaine C1 est le site de liaison du DAG et des phorbol esters. Ce domaine est requis pour l'activation des PKC par ces molécules et il se doit d'être dupliqué pour être actif. Le deuxième domaine, le C2, représente le site de liaison du calcium (Ca<sup>2+</sup>). Le site d'attachement de l'ATP se situe principalement dans le domaine C3. Puis finalement en portion C-terminale du domaine C3, on retrouve le domaine C4 servant aussi de site de liaison de l'ATP.

Les PKC classiques (cPKC) regroupent les isoenzymes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ . Ces isoenzymes peuvent être activées par le DAG et les phorbol ester et de plus, possèdent un site de liaison pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette sous-famille possède les quatre domaines conservés. Les PKC nouvelles (nPKC) regroupent les isoenzymes  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\theta$ . Cette sous-famille contient les isoenzymes qui sont dépendantes du DAG et des phorbol esters mais qui sont calcium-indépendantes. La troisième catégorie comprend les PKC atypiques (aPKC); soit  $\iota$  et  $\zeta$ . Ces dernières sont indépendantes du DAG-PMA et du calcium.

## 5.2 Activateurs – Inhibiteurs

Tel que mentionné précédemment, il existe des activateurs et des inhibiteurs des PKC. Le DAG est le principal activateur physiologique tandis que les phorbol esters sont les principaux activateurs synthétiques. La calphostine C, la staurosporine et le H7 quant à eux sont les principaux inhibiteurs connus (*Blobe et al., 1996*). Les inhibiteurs ont permis de démontrer un rôle possible pour la PKC dans plusieurs fonctions du macrophage. *Zheleznyak et Brown* ont démontré en 1992, que l'incubation de monocytes avec des billes opsonisées par des IgG (billes opsonisées de sérum d'albumine bovine (BSA) et des IgG anti-BSA) augmentait l'activité de PKC associée à la membrane. Toutefois cette association pouvait être bloquée par des inhibiteurs de PKC et ces inhibiteurs réduisaient également l'internalisation de particules opsonisées et phagocytées par les FcR. Cette réduction d'internalisation serait une conséquence directe de l'inhibition de l'activité des PKC. La translocation de PKC du cytosol à la membrane est

sélective et dépend des isoenzymes et du récepteur engagé. Un des problèmes majeurs de l'utilisation des inhibiteurs, est le fait qu'ils ne soient pas spécifiques aux différentes isoenzymes de PKC (*Livneh et Fishman, 1997*). Le fait que les inhibiteurs bloquent une fonction n'indique pas quelle(s) des isoenzymes est impliquée(s) dans ce processus.

*Greenberg et al.* ont contredit ces expériences en 1993, en démontrant que les inhibiteurs des PKC ne bloquaient pas l'ingestion des érythrocytes opsonisés d'immunoglobulines par les FcR. Ceci était vrai pour plusieurs inhibiteurs étudiés, soit le H7, le HA1004, la calphostine C et la staurosporine. Toutefois ces études démontrent que l'utilisation d'inhibiteurs de PTK, tel que la genestein, cause une diminution de la phagocytose de particules opsonisées démontrant ainsi que les PTK sont essentielles à la phagocytose via les FcR.

### 5.3 Rôle de PKC- $\alpha$ dans la phagocytose

Des études (*Zheleznyak et al., 1992; Allen et al., 1995; Allen et al., 1996*) ont démontré que PKC est impliquée dans la phagocytose. Comme *Allen et Aderem* l'ont démontré en 1995, lors de la phagocytose de zymosan, PKC- $\alpha$  est associée au phagosome. Cette association est précoce et se fait dès la formation du phagosome, en même temps que la polymérisation de l'actine, et demeure jusqu'à la fin du processus soit jusqu'à la fusion du phagosome avec les lysosomes. La présence de PKC- $\alpha$  fut démontrée par immunofluorescence. L'association de PKC- $\alpha$  avec le phagosome tout au long de ce processus de maturation suggère que cette isoenzyme est un



élément important requis dès le processus d'attachement et d'internalisation, qu'il est impliqué également dans les changements dynamiques du cytosquelette et dans le processus de maturation du phagosome.

#### 5.4 Rôle de PKC- $\alpha$ dans la transduction des signaux

Certaines études ont clarifié le rôle de PKC- $\alpha$  dans l'internalisation mais l'implication de cette protéine dans la signalisation est encore obscure. Des chercheurs se sont intéressés au rôle de PKC- $\alpha$  dans l'activation de certaines protéines faisant parties de la cascade intracellulaire. Des études démontrent un rôle pour cet isoenzyme dans l'activation de ERK par une phosphorylation directe de Raf-1 (*Kolch et al., 1993*). Un mutant DN de PKC- $\alpha$  inhibe l'activation de Raf-1 contrairement à la surexpression de PKC $\alpha$  qui permet une augmentation de son activité. Ces résultats obtenus, dans des fibroblastes lors d'une stimulation par le TPA, sont similaires avec ceux obtenus quant à l'effet de PKC- $\alpha$  sur la prolifération, indiquant que PKC- $\alpha$  fonctionne comme activateur de Raf dans les cellules de mammifères (*Cai et al., 1997*).

Une autre étude de *Schönwasser et al.* en 1998 réalisée dans des fibroblastes stimulés avec du TPA, a également démontré un rôle pour l'isoenzyme  $\alpha$  dans l'activation de Raf, MAPK (ERK 1/2) et de sa kinase MEK. L'utilisation d'un mutant DN de PKC- $\alpha$  montre une inhibition

de la stimulation de ERK, tandis qu'une surexpression montre bien une augmentation de l'activité de ERK ainsi que de MEK. Il est intéressant de noter que Raf-1 est normalement phosphorylée sur les sites Ser-259 et Ser-499. Pour vérifier l'interaction entre ces sites et PKC- $\alpha$ , des mutations ont été introduites dans ces sites de liaison. La coexpression de ces deux mutants de Raf avec PKC- $\alpha$  permet d'observer une phosphorylation similaire à celle observée dans les cellules Raf sauvages, suggérant que ces sites ne sont pas requis lors de l'activation par PKC- $\alpha$ , et que la phosphorylation se ferait sur d'autres sites bien distincts.

#### 5.5 Influence d'une stimulation à l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ )

L' IFN $\gamma$  une cytokine pléiotropique agissant à plusieurs niveaux dans la cellule. Elle augmente l'activité tumoricidale du macrophage, la présentation antigénique, la production de cytokines et la phagocytose. Le récepteur pour l'IFN- $\gamma$  est distinct du récepteur commun des IFN- $\alpha$  et  $\beta$ . Des études ont démontré qu'une stimulation à l'IFN- $\gamma$  permettait une augmentation de l'expression des FcR de surface principalement les Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIII (*Sivo et al., 1993*), et que de plus, l'expression de la portion intracytoplasmique responsable de la transduction des signaux, soit la sous-unité  $\gamma$  des FcR, était augmentée (*Durden et al., 1994*). Il est intéressant de préciser que suite à une stimulation avec l'IFN- $\gamma$ , les macrophages recevant une stimulation ultérieure, notamment via le LPS ou les IgG-SRBC, on alors une nette augmentation de l'activité de leur

PKC (*Politis et al., 1990*). Les résultats de *Sivo et al.* de 1993, démontrent également qu'une stimulation des macrophages à l'IFN- $\gamma$  augmente l'attachement et la phagocytose de particules opsonisées d'IgG par les FcR.

## **Article**

## **Protein kinase C- $\alpha$ participates in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in macrophages**

Anouk Breton and Albert Descoteaux<sup>1</sup>

INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531, des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7. Tel: (450) 687-5010 ext. 4465. Fax: (450) 686-5501. E-mail: [albert.descoteaux@iaf.quebec.ca](mailto:albert.descoteaux@iaf.quebec.ca)

*Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**: 472-476 (2000)

## **ABSTRACT**

Phagocytosis of IgG-opsonized particles by macrophages requires the activation of protein kinase C (PKC), a family of protein serine/threonine kinases. In the present study, we have investigated the role of the PKC- $\alpha$  isoenzyme in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis using clones of the mouse macrophage cell line RAW 264.7 overexpressing a dominant-negative (DN) mutant of PKC- $\alpha$ . Overexpression of DN PKC- $\alpha$  had no effect on the attachment of IgG-opsonized sheep red blood cells, but inhibited their internalization. Further analysis of the signaling events induced by IgG-opsonized sheep red blood cells revealed that whereas tyrosine phosphorylation of Syk was normal, phosphorylation of ERK 1/2 (p42/44) was impaired in DN PKC- $\alpha$ -overexpressing macrophages. These observations suggest a role for PKC- $\alpha$  in the regulation of Fc $\gamma$ R-induced phagocytosis and signal transduction.

**Key Words** Phagocytosis, macrophage, Fc receptor, protein kinase C, signal transduction, ERK1/2.

Abbreviations used: PKC, protein kinase C; SRBC, sheep red blood cells; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; DN, dominant-negative; LPS, lipopolysaccharide; Fc $\gamma$ R, receptor for the Fc portion of immunoglobulin G; MARCKS, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate; FITC, fluorescein isothiocyanate.

## **INTRODUCTION**

Phagocytosis, an essential arm of the host response against infections, consists in the uptake and destruction of invading microorganisms. The uptake process, which requires reorganization of filamentous actin, is initiated by the interaction of molecules on the surface of the particles with phagocytic receptors present on phagocytes. Depending of the phagocytic receptors involved, distinct intracellular signalisation cascades are activated. Hence, immunoglobulin-dependent uptake is accompanied by an inflammatory response whereas complement receptor-mediated phagocytosis is silent (1). Phagocytosis by Fc $\gamma$ R, which bind IgG-opsonized particles, requires the recruitment and the activation of the Syk kinase (2-6). Subsequent events include the activation of PI 3-kinase, Rho, Rac1, Cdc42, ARF6, MAPKs, and PKC, which modulate cytoskeleton reorganization and gene expression (7-14).

Several observations indicate that PKC activity is required for Fc $\gamma$ R-mediated particle uptake. Phagocytosis of IgG-opsonized particles induces PKC activation and translocation to the membrane fraction, and PKC inhibitors such as staurosporine or calphostin C cause a dose-dependent decrease in particle uptake (15-19). Furthermore, both the  $\alpha$  isoenzyme of PKC and its major substrate, the actin-binding protein MARCKS, associate with the nascent phagosome (19, 20). Inasmuch as PKC- $\alpha$  regulates the interaction of MARCKS with actin, its localization to the phagosome suggests a role in phagocytosis and phagosome maturation (1, 19). Using clones of the mouse macrophage cell line RAW 264.7 overexpressing a DN PKC- $\alpha$ , we have recently provided evidence that PKC- $\alpha$  regulates innate macrophage functions involved in the control of infection by two intracellular parasites which replicate within a phagosome (21). In the present study, we used this approach to investigate the possible role of PKC- $\alpha$  in Fc $\gamma$ R-dependent phagocytosis and signaling. We provide evidence that PKC- $\alpha$  is required for the internalization of IgG-opsonized SRBC. In addition, our results suggest that PKC- $\alpha$  is part of the signaling cascade leading to Fc $\gamma$ R-mediated activation of ERK1/2.

## MATERIALS AND METHODS

*Cell lines.* The murine macrophage cell line RAW 264.7 transfected with the expression vector pCIN-4, and the DN PKC- $\alpha$ -overexpressing clones A2 and C2 (22) were cultured in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub> in complete medium [Dulbecco's modified Eagle's medium with glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 10 mM HEPES pH 7.3, and antibiotics] supplemented with 500  $\mu$ g/ml G418 (Life Technologies Inc.).

*Antibodies.* The hybridoma producing the anti-SRBC monoclonal antibody TIB111 (IgG2a) was from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). The 4G10 antiphosphotyrosine mouse monoclonal antibody was from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY). The rabbit anti-Syk antiserum was kindly provided by A. Veillette (McGill University, Montréal, Canada). The mouse monoclonal antibody 2.4G2 coupled to FITC was kindly provided by S. Lemieux (INRS- Institut Armand-Frappier, Laval, Canada). Rabbit polyclonal antibodies against ERK1/2 and Phospho-specific ERK1/2 (Thr202/Tyr204) were from New England Biolabs (Beverly, MA). Peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antisera were from Amersham Life Science.

*Quantification of cell surface Fc $\gamma$ R by flow cytometry.* Macrophages were washed twice with PBS containing 1% BSA and 0.2% sodium azide and were incubated for 20 min at room temperature with 50  $\mu$ g/ml normal rabbit serum. Excess antibodies were washed away and the FITC-conjugated 2.4G2 monoclonal antibody was added for 30 min at 4°C. Macrophages were washed twice in PBS, resuspended in 400  $\mu$ l PBS and analyzed by flow cytometry (Coulter XL). The WinMDI analysis software was used to generate the three-dimensional histogram overlays.



*Opsonization of SRBC.* SRBC (Cappel) were opsonized by incubation with 10 µg/ml of the IgG2a monoclonal antibody TIB-111 for 1 h at 4°C in DMEM without FBS. IgG-opsonized SRBC (IgG-SRBC) were washed and resuspended in DMEM with 10% FBS.

*Binding and phagocytosis of IgG-SRBC.* Analysis of IgG-SRBC binding and phagocytosis was performed as described (23). Briefly, for attachment of IgG-SRBC to macrophages,  $2 \times 10^6$  cells were adhered on glass coverslips for 2 h. SRBC or IgG-SRBC were added to macrophages and incubated in DMEM without serum at 4°C for 30 min. Unbound SRBC or IgG-SRBC were removed by two washes with cold DMEM without serum. For binding studies, coverslips were immediately fixed after washing. For phagocytosis studies, macrophages were transferred at 37°C after the binding step. At the end of the incubation period, cell cultures were treated with 0.14 M NH<sub>4</sub>Cl for 7 min to lyse non-internalized SRBC, and fixed. Coverslips were stained with Leukostat, mounted, and SRBC were enumerated by light microscopy.

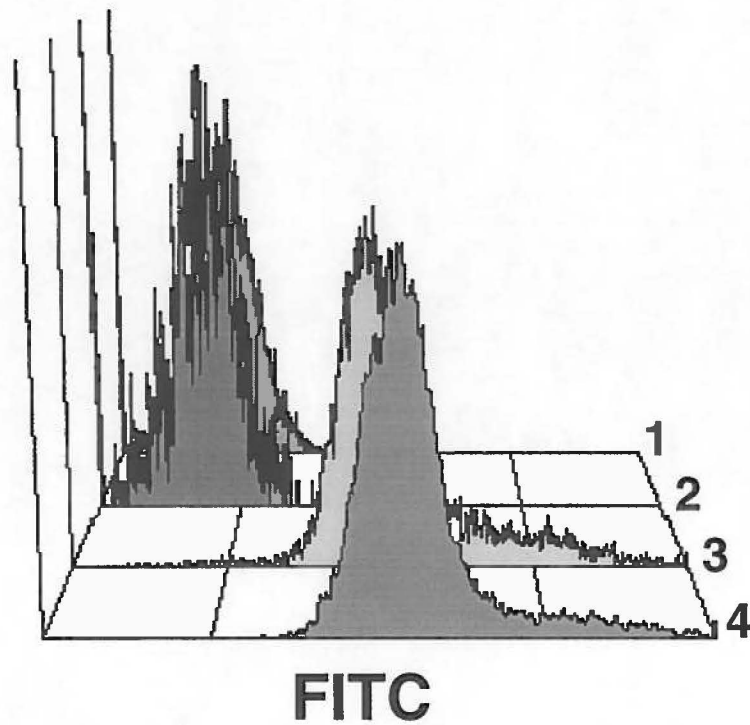
*Immunoblotting and immunoprecipitation analyses.* For immunoblotting experiments, adherent macrophages ( $2 \times 10^6$ /well) were stimulated with either IgG-SRBC or 100 ng/ml LPS for the indicated periods of time at 37°C. Total proteins (15 µg) were resolved in 10% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto Hybond-ECL membranes (Amersham Life Science, ON, Canada) and immunodetection was achieved by chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science). For immunoprecipitation studies,  $4 \times 10^6$  cells were seeded in 100-mm plastic tissue culture dishes, two days before stimulation. Stimulation with IgG-SRBC was carried out as described above. After incubation, cells were washed once with ice-cold phosphate buffer saline (PBS). Samples were lysed on ice with lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL pH 7.5, 1% Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitors. Syk was immunoprecipitated using a rabbit anti-Syk antiserum. Immunocomplexes were resolved in 10% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto Hybond-ECL membranes (Amersham Life Science), and immunodetection was achieved by chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science).

## RESULTS

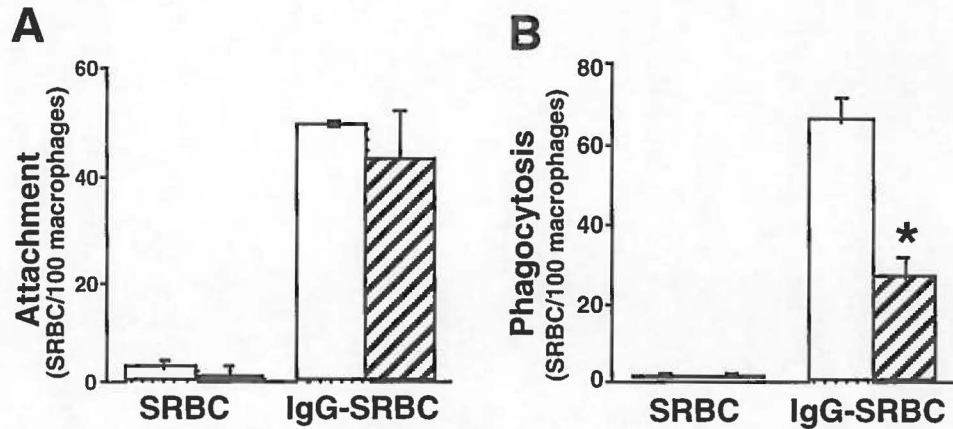
*Attachment and phagocytosis of IgG-SRBC in DN PKC- $\alpha$ -overexpressing macrophages.* Based on its localization to nascent phagosomes, it has been proposed that PKC- $\alpha$  plays a role in phagocytosis (1, 19, 20). To examine the role of this isoenzyme in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis, we used clones of the RAW 264.7 macrophage cell line overexpressing DN PKC- $\alpha$  (21, 22). We first ascertained by flow cytometry that Fc $\gamma$ R expression was similar in control RAW 264.7 cells and in DN PKC- $\alpha$  overexpressing cells (Figure 1). Consistently, there was no difference in the attachment of IgG-SRBC to the DN PKC- $\alpha$ -overexpressing cells and to control RAW 264.7 cells (Figure 2A). In contrast, phagocytosis of IgG-SRBC was significantly reduced (65%) in DN PKC- $\alpha$ -overexpressing cells (Figure 2B). Similar results were obtained with other DN PKC- $\alpha$ -overexpressing clones (data not shown). These results suggest a role for PKC- $\alpha$  in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis.

*Effect of DN PKC- $\alpha$  overexpression on Fc $\gamma$ R-induced tyrosine phosphorylation of Syk and activation of ERK1/2 (p44/p42).* Ligation of Fc $\gamma$ R results in the tyrosine phosphorylation of the ITAM motifs present in the  $\gamma$  subunits by a member of the Src-family kinase. These phosphorylated ITAMs allow the recruitment and activation of a second tyrosine kinase, Syk, which is required for downstream signaling events and phagocytosis (3-6). To elucidate the mechanism(s) involved in the phagocytic defect observed in DN PKC- $\alpha$ -overexpressing macrophages, we examined the signal transduction pathway activated following Fc $\gamma$ R ligation. Following stimulation with IgG-SRBC, we immunoprecipitated Syk with a rabbit anti-Syk antiserum, and determined tyrosine phosphorylation levels by Western blotting using the anti-phosphotyrosine 4G10 monoclonal antibody. As expected, IgG-SRBC-induced tyrosine phosphorylation of Syk took place in DN PKC- $\alpha$ -overexpressing macrophages (Figure 3A), indicating that the phagocytosis defect was not the consequence of an impaired recruitment and activation of Syk. Previous studies revealed that Fc $\gamma$ R ligation induces MAP kinase activation (5,

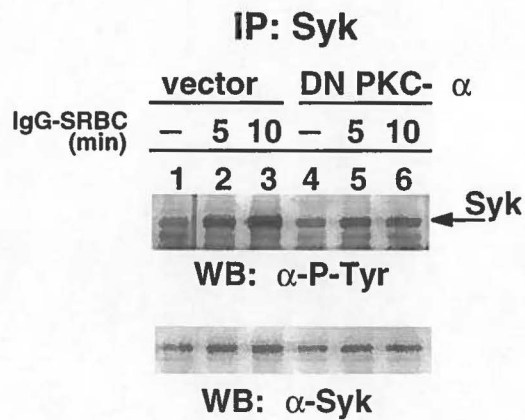
6, 24). Furthermore, Karimi and Lennartz demonstrated that FcγR-induced ERK2 activation is a PKC-dependent process (24). To examine the role of PKC-α in FcγR-induced ERK1/2 activation, we performed immunoblots on total cell extracts from normal and DN PKC-α-overexpressing macrophages following stimulation with IgG-SRBC. To detect activated ERK1/2, we used antibodies that specifically recognize ERK1/2 phosphorylated on both Thr202 and Tyr204. As positive controls, macrophages were stimulated with 100 ng/ml LPS. As shown in Figure 4, LPS induced a rapid and transient phosphorylation of ERK1 and ERK2 in both normal (Figure 4A) and DN PKC-α-overexpressing macrophages (Figure 4B). In contrast, IgG-SRBC-induced ERK1/2 phosphorylation was detected in normal macrophages, but not in DN PKC-α-overexpressing macrophages (Figure 4A and 4B). These results indicate that PKC-α is involved in IgG-SRBC- but not LPS-induced ERK1/2 activation.



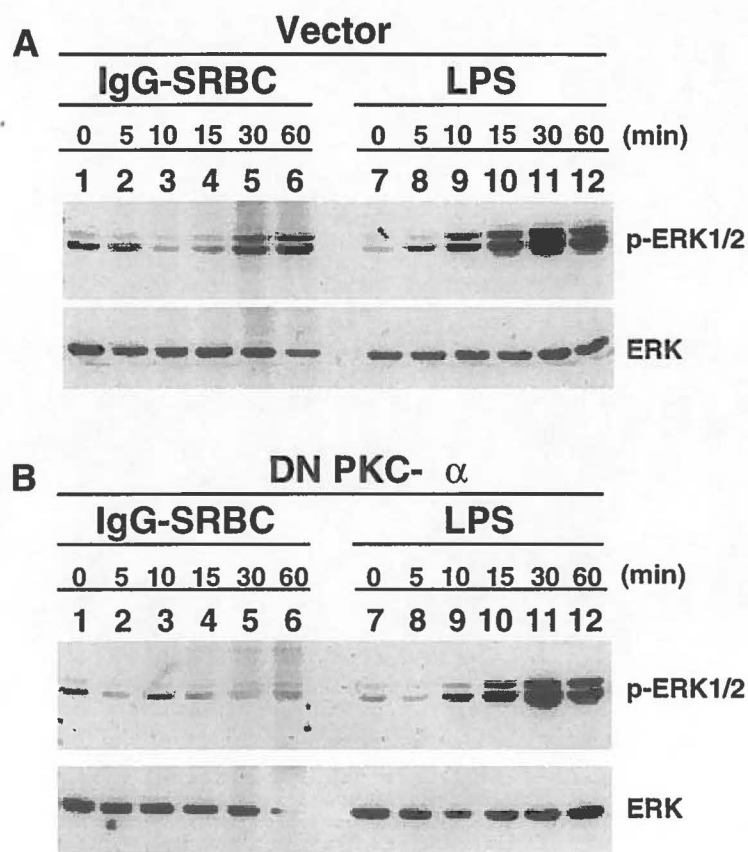
**FIG. 1.** Quantification of Fc $\gamma$ R expression by flow cytometry. Control (transfected with empty vector) (lanes 2 and 4) and DN PKC- $\alpha$ -overexpressing (lanes 1 and 3) macrophages were labeled with either an isotype-matched rat FITC-conjugated antibody (lanes 1 and 2) or the rat 2.4G2-FITC antibody (lanes 3 and 4), and analyzed by flow cytometry as described in the *Materials and Methods* section. Y-axis, cell counts; X-axis, FITC fluorescence intensities (scale: 4 order logarithmic intensity).



**FIG. 2.** Effect of DN PKC- $\alpha$  overexpression on the attachment and phagocytosis of IgG-opsonized SRBC by RAW 264.7 macrophages. Normal (transfected with empty vector) (open bars) and DN PKC- $\alpha$ -overexpressing (hatched bars) macrophages were incubated with either unopsonized SRBC or IgG-SRBC, and the attachment (A) and phagocytosis (B) were determined as described in the *Materials and Methods* section. Each experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in four separate experiments. \* $p = 0.005$  as compared with normal cells.



**FIG. 3.** Overexpression of DN PKC- $\alpha$  has no effect on Fc $\gamma$ R-mediated tyrosine phosphorylation of Syk. Normal (transfected with empty vector) and DN PKC- $\alpha$  overexpressing macrophages were incubated in the absence or the presence of IgG-SRBC for the indicated time points. Total cell lysates were immunoprecipitated with anti-Syk antibodies and immunoblotted with either the antiphosphotyrosine monoclonal antibody 4G10 (top panel) or the anti-Syk antibodies (bottom panel) to ensure that equivalent amounts of Syk were present in the immunoprecipitates. Similar results were obtained in three separate experiments.



**FIG. 4.** Overexpression of DN PKC- $\alpha$  inhibits Fc $\gamma$ R- but not LPS-mediated phosphorylation of ERK1/2. Normal (transfected with empty vector) (A) and DN PKC- $\alpha$ -overexpressing (B) macrophages were incubated in the absence or the presence of either IgG-SRBC or 100 ng/ml LPS for the indicated time points. Cell extracts were prepared and the levels of phosphorylated (top panel) and total (bottom panel) ERK1/2 were determined by Western blot. Similar results were obtained in three experiments.

## DISCUSSION

Whereas several studies provided evidence that the PKC superfamily of serine/threonine protein kinases plays a role in the regulation of Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis, few addressed the identity of the PKC isoenzyme(s) involved. A role for PKC- $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\epsilon$  in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis has been proposed based on the observation that cross-linking of Fc $\gamma$ R causes a transient association of these isoenzymes with the membranes of monocytes (18). The rapid recruitment of PKC- $\alpha$  and several cytoskeletal proteins to the nascent phagosome in mouse macrophages provided additional indication for the involvement of PKC- $\alpha$  in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis (19). In the present study, we used clones of the mouse macrophage cell line RAW 264.7 overexpressing a dominant-negative mutant of PKC- $\alpha$  to investigate the role of this isoenzyme in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis and signaling. Our main finding is that overexpression of DN PKC- $\alpha$  inhibited Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis and ERK1/2 activation, suggesting that PKC- $\alpha$  plays a role in the modulation of these processes in macrophages. The fact that DN PKC- $\alpha$  overexpression has no effect on the attachment of IgG-SRBC and the subsequent tyrosine phosphorylation of Syk strongly suggests that PKC- $\alpha$  is part of a pathway(s) downstream the initial steps of Fc $\gamma$ R activation.

Allen and Aderem have previously proposed that PKC- $\alpha$  may regulate phagocytosis (19, 20). This proposal was based on their observation that PKC- $\alpha$  and its major substrate, MARCKS, are rapidly recruited to the nascent phagosome. The ability of MARCKS to cross-link F-actin and to associate with membranes, which is modulated by PKC-dependent phosphorylation, is believed to play an important role in the regulation of actin structure during phagocytosis (1). Thus, the possibility exists that the inhibition of Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis observed in DN PKC- $\alpha$ -overexpressing macrophages is the consequence of an impaired MARCKS phosphorylation and actin rearrangement. However, the demonstration that phagocytosis is normal in macrophages deficient in MacMARCKS, a member of the MARCKS family (25), suggests another



mechanism. PKC activity modulates the function of several other molecules required for Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis. For instance, Aderem and colleagues identified amphiphysin II $\alpha$  as a novel protein recruited to early phagosomes (26). Amphiphysin II $\alpha$  in turn recruits the GTPase dynamin 2 to the phagosomes. Both amphiphysin II $\alpha$  and dynamin 2 are essential for phagocytosis, as they are believed to regulate membrane extension around the particle and its subsequent internalization (27, 28), and both are PKC substrates (29, 30). Similarly, ARF6 is required for phagocytosis and its activity is regulated by ARNO in a PKC-dependent manner (13, 31, 32). Whether the inhibition of Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in DN PKC- $\alpha$ -overexpressing macrophages is related to an impaired recruitment or function of one of those molecules is a possibility that will deserve further investigation.

Activation of the MAPK ERK1/2 (p42/p44) is one of the Fc $\gamma$ R-induced downstream event in macrophages (11, 33). In a study aimed at investigating the regulation and the role of ERK in IgG-mediated phagocytosis in human monocytes, Karimi and Lennartz showed that ERK activation is PKC-dependent (24). In addition, they showed that ERK activation was not required for target ingestion. Thus, their data support the existence of parallel pathways induced during Fc $\gamma$ R cross-linking and in which PKC activation is required. Our data provide evidence that PKC- $\alpha$  is involved in the Fc $\gamma$ R-induced pathway leading to ERK 1/2 phosphorylation. Interestingly, DN PKC- $\alpha$  overexpression had no effect on LPS-induced ERK1/2 phosphorylation, indicating that in RAW 264.7 macrophages distinct signaling cascades regulate the ERK1/2 pathway.

In a previous study, we showed that overexpression of DN PKC- $\alpha$  had no effect on the phagocytosis (uptake) of *Leishmania donovani*, *Legionella pneumophila*, and *Pseudomonas aeruginosa* (21). This suggests that PKC- $\alpha$  regulates Fc $\gamma$ R-specific phagocytic events. Future studies will be aimed at elucidating the signaling cascades by which PKC- $\alpha$  modulates Fc $\gamma$ R-mediated events.

**Acknowledgments.** We are grateful to S. Lemieux and A. Veillette for kindly providing the FITC-coupled 2.4G2 and the rabbit anti-Syk antiserum, respectively. We also thank M. Desrosiers for his help with flow cytometry analyses. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MRC) (MT-12933). A. B. was the recipient of a MRC studentship. A.D. is a MRC Scholar.

## REFERENCES

1. Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593-623.
2. Greenberg, S., Chang, P., and Silverstein, S. C. (1994) Tyrosine phosphorylation of the gamma subunit of Fc gamma receptors, p72syk, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* **269**, 3897-3902.
3. Greenberg, S., Chang, P., Wang, D. C., Xavier, R., and Seed, B. (1996) Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 1103-1107.
4. Cox, D., Chang, P., Kurosaki, T., and Greenberg, S. (1996) Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J. Biol. Chem.* **271**, 16597-16602.
5. Crowley, M. T., Costello, P. S., Fitzer-Attas, C. J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V. L., and DeFranco, A. L. (1997) A critical role for syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **186**, 1027-1039.
6. Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S., and Pawson, T. (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4209-4220.
7. Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O., and Ui, M. (1994) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **269**, 22732-22737.
8. Araki, N., Johnson, M. T., and Swanson, J. A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell. Biol.* **135**, 1249-1260.

9. Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P. G., Bokoch, G. M., and Greenberg, S. (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J. Exp. Med.* **186**, 1487-1494.
10. Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Schreiber, A., Zhang, W. j., and Grinstein, S. (1997) Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fc $\gamma$  receptors in macrophages. *J. Exp. Med.* **186**, 955-966.
11. Rose, D. M., Winston, B. W., Chan, E. D., Riches, D. W., Gerwins, P., Johnson, G. L., and Henson, P. M. (1997) Fc gamma receptor cross-linking activates p42, p38, and JNK/SAPK mitogen-activated protein kinases in murine macrophages: role for p42MAPK in Fc gamma receptor-stimulated TNF-alpha synthesis. *J. Immunol.* **158**, 3433-3438.
12. Caron, E., and Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**, 1717-1721.
13. Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C. C., Donaldson, J. G., and Greenberg, S. (1998) A requirement for ARF6 in Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**, 19977-19981.
14. Cox, D., Tseng, C. C., Bjekic, G., and Greenberg, S. (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* **274**, 1240-1247.
15. Newman, S. L., Mikus, L. K., and Tucci, M. A. (1991) Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Immunol.* **146**, 967-974.
16. Zheleznyak, A., and Brown, E. J. (1992) Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. *J. Biol. Chem.* **267**, 12042-12048.
17. Karimi, K., and Lennartz, M. R. (1995) Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J. Immunol.* **155**, 5786-5794.

18. Zheng, L., Zomerdijk, T. P., Aarnoudse, C., van Furth, R., and Nibbering, P. H. (1995) Role of protein kinase C isozymes in Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *J. Immunol.* **155**, 776-784.
19. Allen, L. A., and Aderem, A. (1996) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* **184**, 627-637.
20. Allen, L. H., and Aderem, A. (1995) A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* **182**, 829-840.
21. St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F., and Descoteaux, A. (1999) A role for PKC- $\alpha$  in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J. Immunol.* **163**, 5505-5511.
22. St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y., and Descoteaux, A. (1998) Protein kinase C- $\alpha$  modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **273**, 32787-32792.
23. Kaplan, G. (1977) Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand. J. Immunol.* **6**, 797-807.
24. Karimi, K., and Lennartz, M. R. (1998) Mitogen-activated protein kinase is activated during IgG-mediated phagocytosis, but is not required for target ingestion. *Inflammation* **22**, 67-82.
25. Underhill, D. M., Chen, J., Allen, L. A., and Aderem, A. (1998) MacMARCKS is not essential for phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**, 33619-33623.
26. Morrissette, N. S., Gold, E. S., Guo, J., Hamerman, J. A., Ozinsky, A., Bedian, V., and Aderem, A. A. (1999) Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against novel components of macrophage phagosomes. *J. Cell. Sci.* **112**, 4705-4713.
27. Gold, E. S., Underhill, D. M., Morrissette, N. S., Guo, J., McNiven, M. A., and Aderem, A. (1999) Dynamin 2 Is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* **190**, 1849-1856.
28. Gold, E. S., Morrissette, N. S., Underhill, D. M., Guo, J., Bassetti, M., and Aderem, A. (2000) Amphiphysin II $\mu$ , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* **12**, 285-292.

29. Wigge, P., Kohler, K., Vallis, Y., Doyle, C. A., Owen, D., Hunt, S. P., and McMahon, H. T. (1997) Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2003-2015.
30. Robinson, P. J., Sontag, J. M., Liu, J. P., Fykse, E. M., Slaughter, C., McMahon, H., and Sudhof, T. C. (1993) Dynamin GTPase regulated by protein kinase C phosphorylation in nerve terminals. *Nature* **365**, 163-166.
31. Frank, S. R., Hatfield, J. C., and Casanova, J. E. (1998) Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3133-3146.
32. Santy, L. C., Frank, S. R., Hatfield, J. C., and Casanova, J. E. (1999) Regulation of ARNO nucleotide exchange by a PH domain electrostatic switch. *Curr. Biol.* **9**, 1173-1176.
33. Sanchez-Mejorada, G., and Rosales, C. (1998) Fcγ receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* **273**, 27610-27619.

## **Discussion**

Le macrophage est une cellule importante du système immunitaire et essentielle à la défense de l'organisme contre certains pathogènes étrangers et microorganismes invasifs. Il est important de bien comprendre son fonctionnement et de connaître toutes les molécules impliquées dans son activation pour pouvoir éventuellement développer de nouvelles approches pharmacologiques et thérapeutiques. Puisque l'on retrouve plusieurs récepteurs de phagocytose à la surface du macrophage, ceci suggère que le macrophage peut être activé de plusieurs façons. Tant au niveau de la phagocytose que dans les cascades de signalisation il y a des différences d'un récepteur à l'autre. Tel que mentionné précédemment, la réorganisation de l'actine peut varier dépendamment du récepteur engagé (mécanisme « zipper » pour les FcR versus le mécanisme « trigger » pour les CR) et c'est également le cas pour la phosphorylation des protéines.

Plusieurs protéines jouent un rôle dans le processus phagocytaire et sont considérées comme essentielles. Certaines ont été mentionnées précédemment, telles Syk, PI 3-Kinase et PKC. Cependant aucune protéine ne peut à elle seule assurer le bon fonctionnement de ce processus sans interagir avec d'autres molécules dans son entourage. Il y a de plus en plus de protéines impliquées qui sont découvertes et étudiées. Il sera ainsi plus facile de formuler une hypothèse quant au mécanisme engendré lorsqu'il y a liaison du récepteur phagocytaire.



Nous nous sommes tout d'abord intéressé aux FcR présents à la surface du macrophage. Ces récepteurs permettent la phagocytose de particules opsonisées par des immunoglobulines. Nous voulions comprendre plus en détails ce qu'il advenait suite à l'engagement de ces récepteurs, mais surtout le rôle de PKC- $\alpha$  dans ce processus.

D'après plusieurs études, l'implication de PKC dans certaines fonctions du macrophage était certaine (Allen et al., 1995; Zheleznyak et al., 1992; Kolch et al., 1993; St-Denis et al., 1998). L'implication de PKC dans la phagocytose fut démontrée à plusieurs reprises avec l'aide d'inhibiteurs (Blobe et al., 1996). Puisqu'il existe plusieurs isoenzymes de la PKC et que le rôle de chacun de ces isoenzymes demeure encore obscur, l'utilisation des inhibiteurs s'avérait une méthode non appropriée puisqu'elle ne permet pas de distinguer entre les différents isoenzymes. Suite à l'identification de l'isoenzyme  $\alpha$  à la surface des phagosomes contenant des particules de zymosan, Allen et Aderem 1996, ont suggéré un rôle pour l'isoenzyme  $\alpha$  lors de la phagocytose. Cependant, la détection d'une protéine lors du processus phagocytaire et son implication sont deux choses bien distinctes. C'est pourquoi nous avons cru qu'en surexprimant un dominant-négatif de cette protéine nous pourrions mieux évaluer son rôle. Nous avons cru que la surexpression d'un mutant DN s'avérait la méthode la plus appropriée pour démontrer le rôle réel de l'isoenzyme  $\alpha$  dans la phagocytose via les FcR. Mentionnons que nous avons utilisés deux clones DN PKC- $\alpha$ .

Le principe du mutant DN consiste à introduire une mutation dans le site d'attachement de l'ATP par mutagenèse dirigée, rendant ainsi la kinase inactive. Ce gène muté est introduit dans un vecteur d'expression et les cellules d'intérêt. Il y a surexpression de la forme mutante compétitionnant ainsi avec la forme endogène normale de la même isoenzyme à l'intérieur de la cellule. A l'aide de cette construction, nous avons pu vérifier l'effet de PKC- $\alpha$  sur l'attachement des particules opsonisées et également l'internalisation de ces particules au moyen des FcR. La phagocytose via les FcR ou tout autres récepteurs, requiert le contact entre le ligand avec le récepteur. Pour se faire, nous avons utilisé des érythrocytes de mouton opsonisés avec des IgG (IgG2a).

Nous avons donc observé que l'attachement des IgG-SRBC était similaire pour les deux types de cellules, soit les macrophages de type sauvage et des clones surexprimant le mutant DN PKC- $\alpha$ . Cependant, l'internalisation des particules opsonisées était de beaucoup diminuée, soit d'environ 50%, chez les macrophages surexprimant le mutant DN de PKC- $\alpha$  en comparaison aux macrophages contrôles. Ceci suggère donc un rôle pour PKC- $\alpha$  dans la phagocytose via les récepteurs Fc. Mentionnons que nous avons préalablement vérifié l'expression des FcR à la surface de la cellule pour être sûr que l'effet observé était réellement dû à la surexpression du mutant DN et non à une déficience dans l'expression de ces récepteurs à la surface des clones étudiés.

Ayant établi que PKC- $\alpha$  est requise pour la phagocytose médiée par les FcR, nous avons voulu vérifier les répercussions dans la signalisation intracellulaire suite à l'engagement de ces FcR. Nous avons constaté que PKC- $\alpha$  semblait impliquée dans l'activation des MAPK (ERK 1/2) par les FcR et que cette activation de ERK est distincte de celle obtenue par le LPS. Ceci suggère donc deux voies de signalisation distinctes pour FcR et LPS quant à l'activation de ERK. Pour ce qui est des deux autres MAP kinases, JNK et p38, leur phosphorylation est absente lors de la stimulation par les IgG-SRBC, contrairement à la stimulation contrôle par le LPS (**Figures E et F** respectivement).

Pour vérifier l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, nous avons mesuré la dégradation de I $\kappa$ B. Le complexe formé par NF- $\kappa$ B/ I $\kappa$ B est inactif jusqu'à ce que I $\kappa$ B soit phosphorylé par la I $\kappa$ B kinase. A ce moment, il y a dissociation permettant l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, et la dégradation de I $\kappa$ B (*Ghosh et al., 1998*). La dégradation de I $\kappa$ B suite à une stimulation par le LPS (contrôle) est rapidement induite dans les macrophages RAW 264.7 et n'est pas affectée par la surexpression du mutant DN PKC- $\alpha$  (**Figure G**). Cette dégradation est absente lors d'une stimulation par les IgG-SRBC autant dans les macrophages RAW 264.7 contrôles que dans les clones mutant DN de PKC- $\alpha$ . Finalement, nous avons mesuré l'effet de la surexpression de DN PKC- $\alpha$  sur la phosphorylation de trois protéines importantes dans la cascade de signalisation, exprimées lors de la stimulation par des IgG-SRBC, soit; Vav,

Syk et PI 3-K. Seule la phosphorylation de Vav semble être affectée par la mutation DN PKC- $\alpha$ , puisqu'aucune modification de phosphorylation est observée pour les deux autres kinases. L'induction de l'activité de Vav est observée dans les macrophages contrôles mais non dans les clones mutant DN de PKC- $\alpha$  (**Figure H**).

Les mêmes expériences furent répétées suite à une stimulation préalable des macrophages avec de l'IFN- $\gamma$ , et la phosphorylation des MAPK et la dégradation de I $\kappa$ B furent vérifiées. Tel que mentionné précédemment, l'IFN- $\gamma$  modifie certaines réponses du macrophage. L'expression des FcR à la surface et l'expression de la sous-unité  $\gamma$  servant à la transduction des signaux sont augmentées, entraînant ainsi une augmentation de l'attachement et la phagocytose via les FcR (*Sivo et al., 1993*). Les résultats de cette étude corrént parfaitement avec les résultats obtenus lors de notre expérience sur l'attachement et la phagocytose des RAW 264.7 stimulées à l'IFN- $\gamma$ . L'attachement des IgG-SRBC dans nos deux lignées, soit les macrophages de type sauvage et les clones surexprimant le mutant DN de PKC- $\alpha$ , ainsi que la phagocytose sont augmentés de façon significative. Nous avons également étudié l'effet de la PKC- $\alpha$  sur les MAPK suite à une stimulation à l'IFN- $\gamma$ . La phosphorylation de ERK était absente dans les macrophages surexprimant le mutant DN de PKC- $\alpha$  lors de la stimulation par les FcR et demeure absente même après stimulation avec l'IFN- $\gamma$ . Quant à la phosphorylation de JNK et de p38 suite à une stimulation par les IgG-SRBC, une activité est observée autant dans les macrophages RAW 264.7

contrôles que dans les clones surexprimant le mutant DN de PKC- $\alpha$ . Cette modulation de l'activité pourrait être due à une augmentation de la sensibilité des macrophages à la stimulation ultérieure, soit une stimulation par les érythrocytes opsonisés et phagocytés par les FcR. De plus, ceci pourrait être dû au fait que les macrophages expriment en plus grande quantité les FcR à leur surface mais également qu'ils expriment en plus grande quantité la sous-unité  $\gamma$  responsable de la transduction des signaux.

Enfin, nous avons observé une dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  lors d'une stimulation via les FcR, uniquement dans les macrophages RAW 264.7 contrôles, ne contenant que le vecteur, et non dans les macrophages surexprimant le mutant DN PKC- $\alpha$ . Ceci suggère l'implication de PKC- $\alpha$  dans la dégradation de I $\kappa$ B suite à une stimulation des macrophages par l'IFN- $\gamma$ . Est-ce dû à une augmentation de la sensibilité des macrophages pour la stimulation par les IgG-SRBC ou est-ce uniquement dû à une augmentation de l'expression des FcR? Comme tous les autres résultats obtenus suite à un traitement préalable des macrophages avec l'IFN- $\gamma$ , ce qui se produit est encore obscur. Il serait intéressant d'étudier plus en profondeur cette stimulation.

Nos résultats permettent de conclure que PKC- $\alpha$  joue effectivement un rôle dans la cascade de signalisation et que ce rôle n'est pas dans la phase précoce de la réponse (au niveau de Syk et PI 3-K) mais bien un peu plus tardivement, soit au niveau de Vav. On sait que Vav possède un

site de liaison avec l'actine, soit le domaine PH. Comme PKC- $\alpha$  contrôle la phosphorylation de cette même kinase, on pourrait supposer que PKC- $\alpha$  serait également impliquée dans la réorganisation de l'actine. Il a été suggéré (*Keenan et al., 1998*) que PKC est un important régulateur des fonctions du cytosquelette. L'activation de PKC dans plusieurs lignées cellulaires entraîne un changement dans la conformation du cytosquelette, incluant la polymérisation de l'actine. Si PKC- $\alpha$  joue un rôle dans le réarrangement de l'actine, ceci pourrait expliquer la déficience d'internalisation des particules opsonisées dans les clones mutant DN PKC- $\alpha$ . De plus, PKC- $\alpha$  n'est pas impliquée dans l'activation de certains membres de la voie de signalisation de Rac-1 (JNK et p38) mais plutôt dans l'activation de certains événements faisant partis de la voie de Ras (ERK). On sait également que l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B est indépendante de PKC- $\alpha$  lorsqu'il n'y a pas eu de stimulation préalable à l'IFN- $\gamma$ .

Il serait donc intéressant de vérifier dans des études ultérieures, le rôle de PKC- $\alpha$  dans le réarrangement du cytosquelette et la modulation de l'actine. Il serait également intéressant de vérifier le rôle de d'autres isoenzymes de PKC dans la phagocytose via les FcR ainsi que le mécanisme d'action par lequel l'IFN- $\gamma$  modifie la réponse des macrophages aux érythrocytes opsonisés. Également, on sait que dans certains cas, l'activité des MAPK peut être un phénomène qui ne passe pas nécessairement par Ras (*Kolch et al., 1993; Cai et al., 1997*). Tel

que discuté précédemment, certaines activations peuvent avoir lieu de façon non-conventionnelle, telle l'activation de NF- $\kappa$ B par MAPK, sans avoir recours à Ras. Il serait donc intéressant de vérifier si PKC- $\alpha$  doit emprunter la voie menant à l'activation de Ras pour pouvoir moduler la réponse des MAPK via les FcR.

## Remerciements

Je tiens à remercier tout spécialement mon directeur de recherche, Albert Descoteaux, pour m'avoir donné la chance de faire une maîtrise dans son laboratoire, pour son encouragement et pour m'avoir permis de développer mon autonomie, tant au niveau de la pensée que de la technique.

Il serait impossible de terminer ma maîtrise sans remercier mes parents. Leur soutien, leur bon jugement, leurs conseils et l'amour qu'ils me porte, m'ont été plus que précieux depuis toutes ces années. Je tiens également à remercier une autre personne très chère à mes yeux, ayant toujours le bon mot pour m'encourager, présente à tous moments, mon amie Véronique. Nous avons partagé bien des hauts et des bas pour s'en sortir indemnes et toujours plus fortes...Merci!

Je voudrais aussi remercier Mélanie Giroux qui m'a supporté tout au long de ce parcours et sur qui j'ai pu compter, dans les bons comme les mauvais moments.

Finalement, je tiens à remercier le Conseil de Recherches Médicales (CRM) pour m'avoir financé tout au long de ma maîtrise.



## **Liste des références**

1. Adams, D., Hamilton, T. (1984) The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 283-318
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1990) Biologie moléculaire de la cellule. Ed. Flammarion, 2<sup>e</sup> édition, Paris, pp.461-463
3. Allen, L.-A., Aderem, A. (1995a) A role for MARCKS, the  $\alpha$  isoenzyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J. Exp.Med.* **182**, 829-840
4. Allen, L.-A., Aderem, A. (1995b) Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts. **14** (6), 1109-1121
5. Allen, L.-A., Aderem, A. (1996a) Mechanism of phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 36-40
6. Allen, L.-A., Aderem, A. (1996b) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp.Med.* **184** (2), 627-637
7. Antoine, J.C., Prina, E., Jouanne, C., Bongrand, P., (1990) parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic PH. *Infect Immun.* **58** (3): 797-87
8. Auger, M.J., Ross, J.A. (1992) The biology of macrophages. Oxford university press, Edited by E. Lewis and McGee, J. 3-27
9. Blackshear, P. (1993) The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.* **268** (3), 1501-1504

10. Blobel, G., Stribling, S., Obeid, L., Hannun, Y. (1996) Protein kinase C isoenzymes : regulation and function. *Cancer surveys*, **27**, 213-248
11. Blumer, K., Johnson, G. (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Tibs* **19**, juin 1994, 236-240
12. Boxer, L., Hedley-Whyte, T., Stossel, T.P. (1974) Neutrophil actin dysfunction and abnormal neutrophil behavior. *N. Engl. J. Med.* **291**, 1093-1099
13. Bustelo, X. (1996) The Vav family of signal transduction molecules. *Crit. Rev. In Oncogenesis*. **7**(1&2): 65-88
14. Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M., Moscat, J., Rapp, U. (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotype in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* Feb., 732-741
15. Caron, E., Hall, A., (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, **282** (5394): 1717-21
16. Clemens, D., Horwitz, M. (1996) The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J. Exp. Med.* **184**, 1349-1355
17. Clerc, P., Ryter, A., Mounier, J., Sansonetti, P.J. (1987) Plasmid-mediated early killing of eucaryotic cells by *Shigella Flexneri* as studied by infection of J774 macrophages. *Infect. Immun.* **55**. 3 : 521-527

18. Clynes, R., Maizes, J., Guinamard, R., Ono, M., Takai, T., Ravetch, J. (1999) Modulation of immune complex-induced inflammation *in vivo* by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J. Exp. Med.* **189** (1) 179-185
19. Collins, H., Shaible, U., Ernst, J., Russell, D. (1997) Transfert of phagocytosed particles to the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana* is a transient phenomenon preceding the acquisition of annexin I by the phagosome. *J. Cell. Sci.* **110**, 191-200
20. Costello, P., Walters, A., Mee, P.J., Turner, M., Reynolds, L.F., Prisco, A., Sarner, N., Zamoyska, R., Tybulewicz, V. (1997) The rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF- $\kappa$ B pathways. *Proc. Natl. Acad.* **96**, 3035-3040
21. Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P.G., Bokoch, G.M., Greenberg, S., 1997. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J. Exp. Med.* **186** (9), 1487-1494
22. Crowley, M., Costello, P., Fitzer-Attas, C., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V., Defranco, A. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc $\gamma$  receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **186** (7), 1027-1039
23. Daëron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* **15** : 203-234
24. Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S.J., Beverley, S.M. (1995) A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science*, **269**, 1869-1871

- 25.Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes : The « kiss and run » hypothesis, *Trends Cell Biol.* **5**, 183-186
- 26.Diaz-Meco, M., Berra, E., Municio, M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-golpe, V., Lain de Lera, M., Alcami, J., Paya, C.V., Arenzaza-seisdedos, F., Virelizier, J-L., Moscat, J. (1993) A dominant negative protein kinase C  $\zeta$  subspecies blocks NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell. Biol.* Aug. 4770-4775.
- 27.Diaz-Meco, M., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M., Berra, E., Hay, R., Sturgill, T., Moscat, J. (1994)  $\zeta$ PKC induces phosphorylation and inactivation of I $\kappa$ B- $\alpha$  in vitro. *EMBO.* **13** (12), 2842-2848.
- 28.Durden, D., Rosen, H., Cooper, J. (1994) Serine/threonine phosphorylation of the  $\gamma$ -subunit after activation of the high-affinity Fc receptor for immunoglobulin G. *Biochem. J.*, **299**, 569-577
- 29.Duronio, V., Scheid, M.P., Ettinger, S. (1998) Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal.* **10**; 4 : 233-239
- 30.Erbe, D., Pfefferkorn, E.R., Fanger, M.W. (1991) Functions of the various human IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **146** (9); 3145-3151
- 31.Frehel, C., Rastog, N. (1987) *Mycobacterium leprea* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infec. Immun.* Dec. 2916-2921
- 32.Finlay, B., Cossart, P. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**, 718-725

- 33.Frehel, C., Rastogi, N. (1987) Mycobacterium leprea surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infec. and Immun.*, Dec. 2916-2921
- 34.Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E. (1998) Nf- $\kappa$ B and REL protein : evolutionnary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260
- 35.Gordon, S. (1998) The role of the macrophage in immune regulation. *Res. Immunol.* **149**, 685-688
- 36.Goren, M., Hart, P., Young, M.R., Armstrong, J.A. (1976) Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Nat.Acad. Sci.* **73** (7), 2510-2514
- 37.Greenberg, S., Burrige, K., Silverstein, C. (1990) Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp.Med.* **172**, 1853-1856
- 38.Greenberg, S. Silverstein, S.C. (1993a) Phagocytosis. *Fund. Immunol.*, third Edition, Raven Press, NY
- 39.Greenberg, S., Chang, P., Silverstein, S. (1993b) Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp. Med.* **177**, 529-534
- 40.Griffin, F., Griffin, J., Leider, J., Silverstein, S.(1975) Studies on the mechanism of phagocytosis. *J. Exp. Med.* **142**, 1263-1282
- 41.Gupta, S., Weiss, A., Kumar, G., Wang, S., Nel, A. (1994) The T-cell antigen receptor utilizes Lck, Raf-1, and MEK-1 for activating mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **269** (25), 17349-17357

42. Hackman, D., Rotstein, O.D., Schreiber, A., Zhang, W.-J., Grinstein, S. (1997) Rho is required for the role of calcium signaling and phagocytosis by Fc $\gamma$  receptors in macrophages. *J. Exp. Med.* **186** (6), 955-966
43. Haworth, R., Platt, N., Keshav, S., Hughes, D., Darley, E., Suzuki, H., Kurithara, Y., Kodama, T., Gordon, S. (1997) The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J. Exp. Med.* **186** (9) 1431-1439
44. Hed, J., Stendahl, O. (1982) Differences in the ingestion mechanisms of IgG and C3b particles in phagocytosis by neutrophils. *Immunol.* **45**, 727-736
45. Herrera-Veliz, P., Knutson, K., Reiner, N.E. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase dependent activation of protein kinase C- $\zeta$  in bacterial lipopolysaccharides-treated human monocytes. *J. Biol. Chem.* **272** (26), 16445-16452
46. Joiner, K.A., Fuhrman, S.A., Miettinen, H.M., Mellman, K.I. (1990) *Toxoplasma gondii*: Fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Sciences* **249**, 641-646
47. Kanakaraj, P., Duckworth, A., Azzoni, L., Kamoun, M., Cantley, L.C., Perussia, B., B. (1994) Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon Fc $\gamma$ RIIIA-ligand interaction. *J. Exp. Med.* **179**, 551-558
48. Kaplan, G. (1977) Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand. J. Immunol.* **6**, 797-807

49. Karimi, K., Lennartz, M. (1995) Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J. Immun.* **155**, 5786-5794
50. Karimi, K., Lennartz, M. (1998) Mitogen-activated protein kinase is activated during IgG-mediated phagocytosis, but is not required for target ingestion. *Inflamm.* **22** (1), 67-82
51. Keenan, C., Kelleher, D. (1998) Protein kinase C and cytoskeleton. *Cell signal*, **10** (4), 225-232
52. Kiefer, F., Brumerll, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S., Pawson, T. (1998) The syk protein tyrosine kinase is essential for Fc $\gamma$  receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* **18** (7), 4209-4220
53. Kiener, P., Rankin, B., Burkhard, A., Schieven, G., Gilliland, L., Rowley, R., Bolen, J., Ledbetter, J. (1993) Cross-linking of Fc $\gamma$  receptor I (Fc $\gamma$ RI) and receptor II (Fc $\gamma$ RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **268** (32), 24442-24448
54. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., Rapp, U. (1993) Protein kinase C $\alpha$  activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, **364**, 249-252
55. Kong, Y., Fisher, K., Bachmann, M., Mariathasan, S., Kozieradzki, I., Nghiem, M.P., Bouchard, D., Bernstein, A., Ohashi, P., Penninger, J.M. (1998) Vav regulates peptide-specific apoptosis in thymocytes. *J. Exp. Med.* **188** (11), 2099-2111.



- 56.Liang, L., Huang, C. (1995) Activation of multiple protein kinase induced by cross-linking of Fc $\gamma$ RII in human neutrophils. *J. Leuko. Biol.* **57**, 326-331
- 57.Livneh, E., Fishman, D.(1997) Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur. J. Biochem.* **248** (1), 1-9
- 58.Mordue, D.G, Sibley, D. (1997) Intracellular fate of vacuole containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immunol.* **159**, 4452-4459
- 59.Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O., Ui, M.(1994) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc $\gamma$  receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **269** (36), 22732-22737
- 60.Nishizuka, Y.(1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J.* **9**, 484-496
- 61.Pearson, A.M. (1996) Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 20-28
- 62.Politis, A., Vogel, S.(1990) Pharmacologic evidence for the requirement of protein kinase in IFN-induced macrophage Fc $\gamma$  receptor and Ia antigen expression. *J. Immunol.* **145** (11), 3788-3795.
- 63.Ravetch, J., Kinet, J.-P.(1991) Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 457-492
- 64.Ravetch, J.(1997) Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 121-125

- 65.Reaven, E., Axline, S.(1973) Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting and phagocytizing cultivated macrophages. *J. Cell. Biol.* **59**,12-27
- 66.Robinson, M., Cobb, M. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 180-186
- 67.Russell, D.(1995) *Mycobacterium* and *Leishmania* : stoways in the endosomal network. *Trends Cell Biol.* **5**, 125-128
- 68.Sada, K., Minami, Y., Yamamura, H.(1997) Relocation of Syk protein-tyrosine kinase to the actin filament network and subsequent association with FAK. *Eur. J. Biochem.* **248**, 827-833
- 69.Sanchez-Mejorada, G., Rosales, C.(1996) Fc $\gamma$  receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independant of Ras. *J. Biol. Chem.* **273** (42), 27610-27619.
- 70.Sanchez-Mejorada, G., Rosales, C.(1998) Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J. Leuk. Biol.* **63**, 521-533
- 71.Schönwasser, D., Marais, R., Marshall, C.J., Parker, P.J.(1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel and atypical protein kinase isotypes. *Mol. Cell. Biol.* Feb. 790-798.
- 72.Seger, R., Krebs, E.(1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB.* **9**, 726-735
- 73.Sivo, J., Politis, D., Vogel, S.N.(1993) Differential effects of interferon- $\gamma$  and glucocorticoids on Fc $\gamma$ R gene expression in murine macrophages. *J. Leuk. Biol.* **54**,451-457

74. St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y., Descoteaux, A. (1998) Protein kinase C- $\alpha$  modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **273** (49), 32787-32792
75. Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J., Russel, D.G. (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Sciences* **263**, 678-681
76. Suchard, S., Mansfield, P., Boxer, L., Shayman, J. (1997) Mitogen-activated protein kinase activation during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils. *J. Immunol.* **158**, 4961-4967
77. Sutterwala, F., Mosser, D. (1999) The taming of IL-12 : suppressing the production of proinflammatory cytokines. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 543-551
78. Suzuki, T. (1991) Signal transduction mechanism through Fc $\gamma$  receptors on the mouse macrophage surface. *FASEB J.* **5**, 187-193
79. Turco, S., Descoteaux, A. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 65-94
80. Waskiewicz, A.J., Cooper, J.A. (1995) Mitogen and stress response pathways; MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 798-805.

81. Wolfram, M., Ilg, T., Mottram, J.C., Overath, P.(1995) Antigen presentation by *Leishmania Mexicana*-infected macrophages : activation of helper T cells specific for amastigotes cysteine proteinases requires intracellular killing of the parasites. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1094-1100
82. Zhang, C., Hirasawa, N., Beaven, M.(1998) Antigen activation of mitogen-activated protein kinase in mast cells through protein kinase C-dependent and independent pathways. *J. Immunol.*, **158**, 4968-4975
83. Zheleznyak, A., Brown, E.(1992) Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* **267** (17), 12042-12048
84. Zigmond, S., Hirsch, J.G.(1972) Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp. Cell. Res.* **73**, 383-393
85. Zychlinsky, A., Sansonetti, P.J.(1997a) Macrophages apoptosis in microbial infections. *Parasitology*, **115**, S79-S87
86. Zychlinsky, A., Sansonetti, P.(1997b) Apoptosis as a inflammatory event : what can we learn from bacteria-induced cell death? *Trends Microbiol.* **5**, 201-204

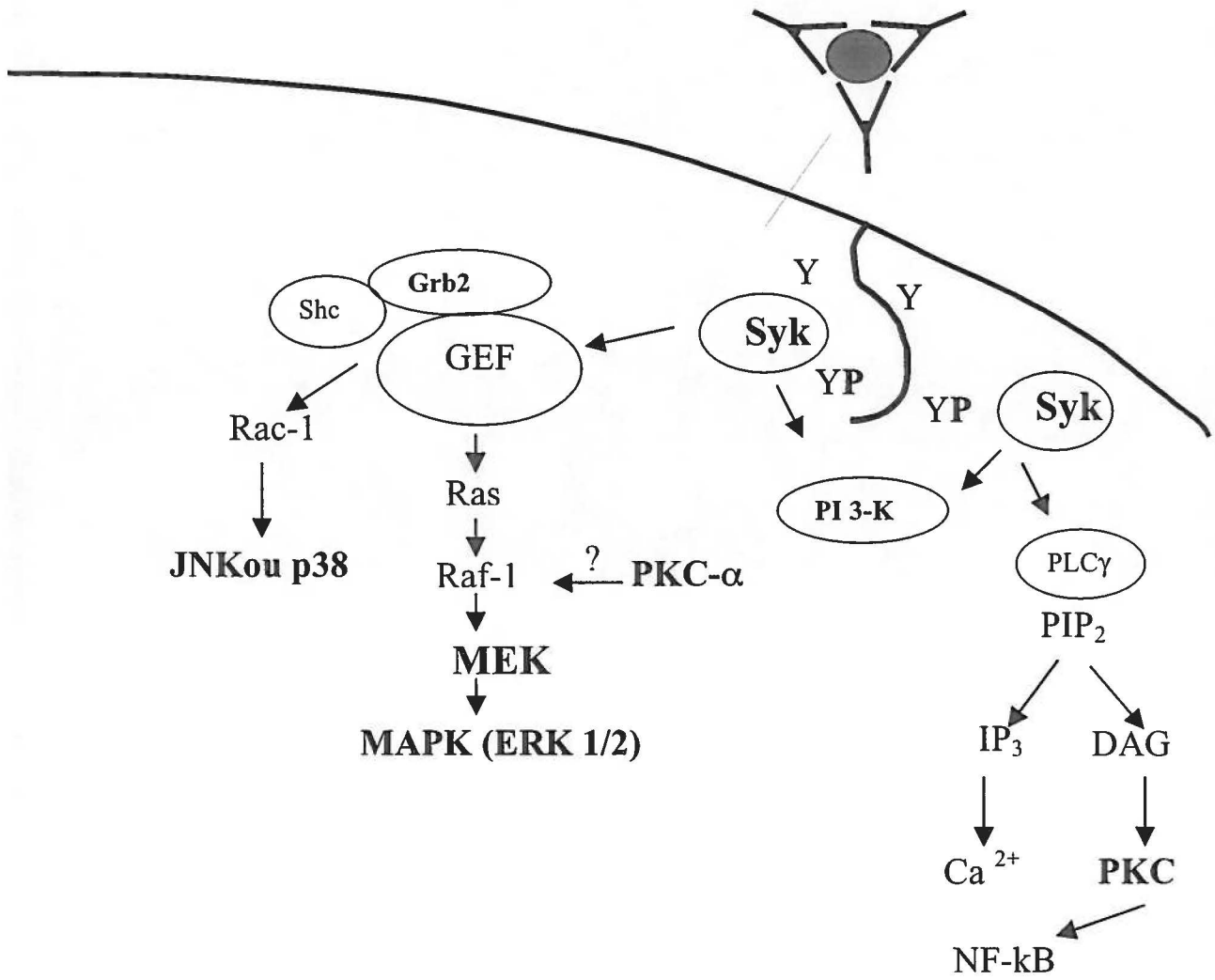
## **Annexe 1**

FcR IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
FcγRI	+	+++	+	++
FcγRII	+++	++	++	-
FcγRIII	++	++	+	-

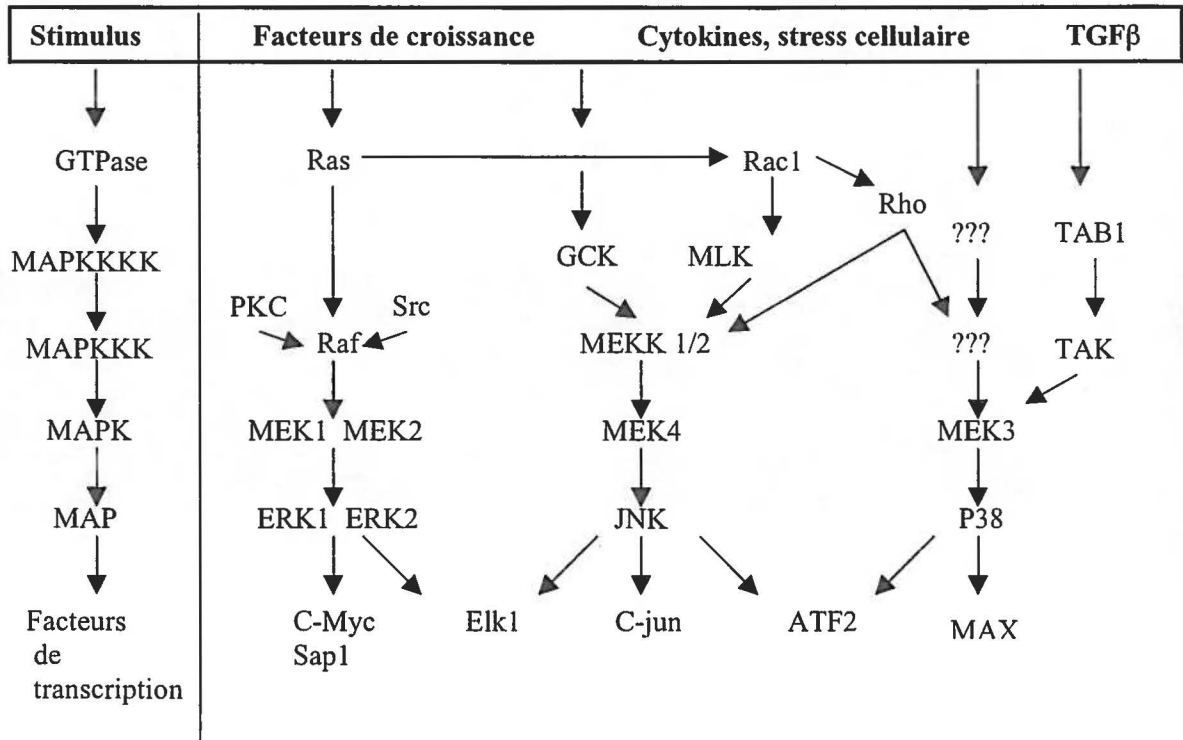
- : Ne possède aucune affinité pour ce récepteur
- + : Possède une faible affinité pour ce récepteur
- ++: Possède une affinité moyenne pour ce récepteur
- +++: Possède une très grande affinité pour ce récepteur

IgG2a: Anticorps utilisé pour opsoniser nos érythrocytes de moutons (IgG-SRBC) lors de la phagocytose via les FcR

**Figure A.** Spécificité des FcγR pour les immunoglobulines



**Figure B.** Cascade de signalisation des MAP kinases dans les cellules eucaryotiques



**Figure C.** Voies principales des MAPK



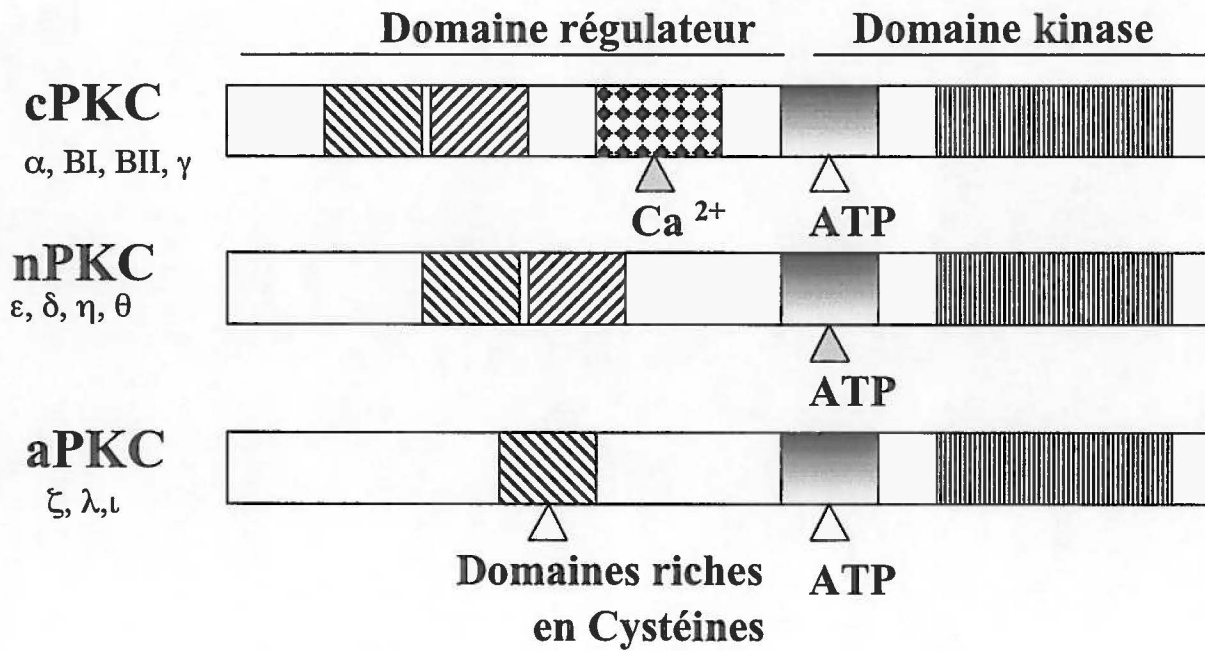


Figure D. Famille des protéines kinases C



Domaine 1: Site de liaison du diacylglycérol et des phorbol esters



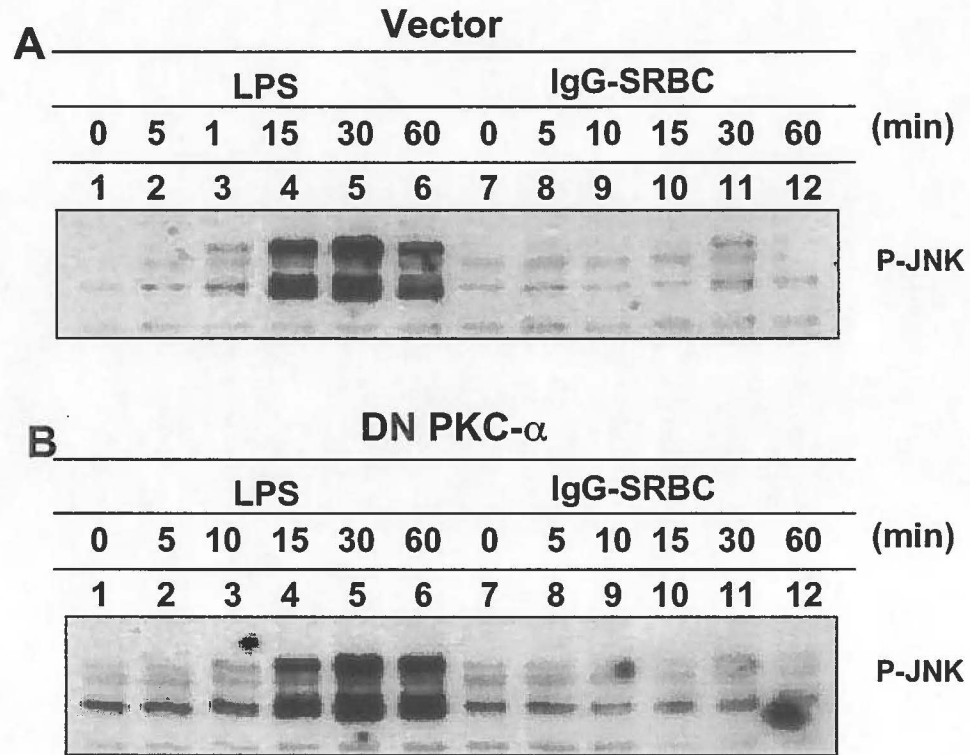
Domaine 2: Site de liaison du calcium



Domaine 3: Site d'attachement de l'ATP

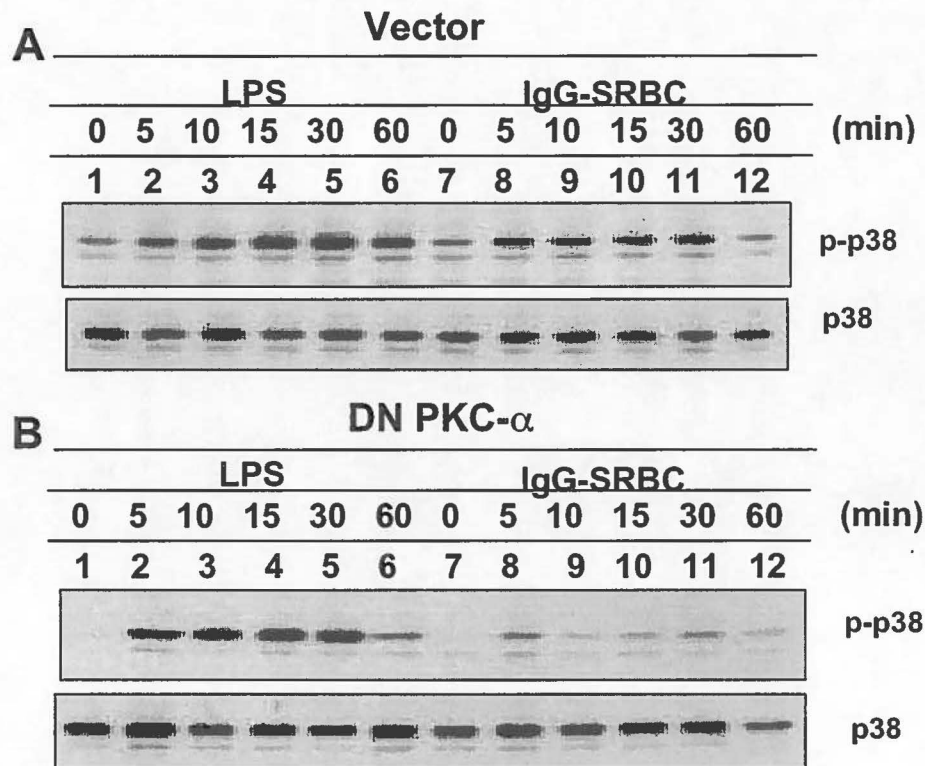
(Nishizuka, 1992)

## Effect of PKC- $\alpha$ on JNK phosphorylation mediated by Fc $\gamma$ R



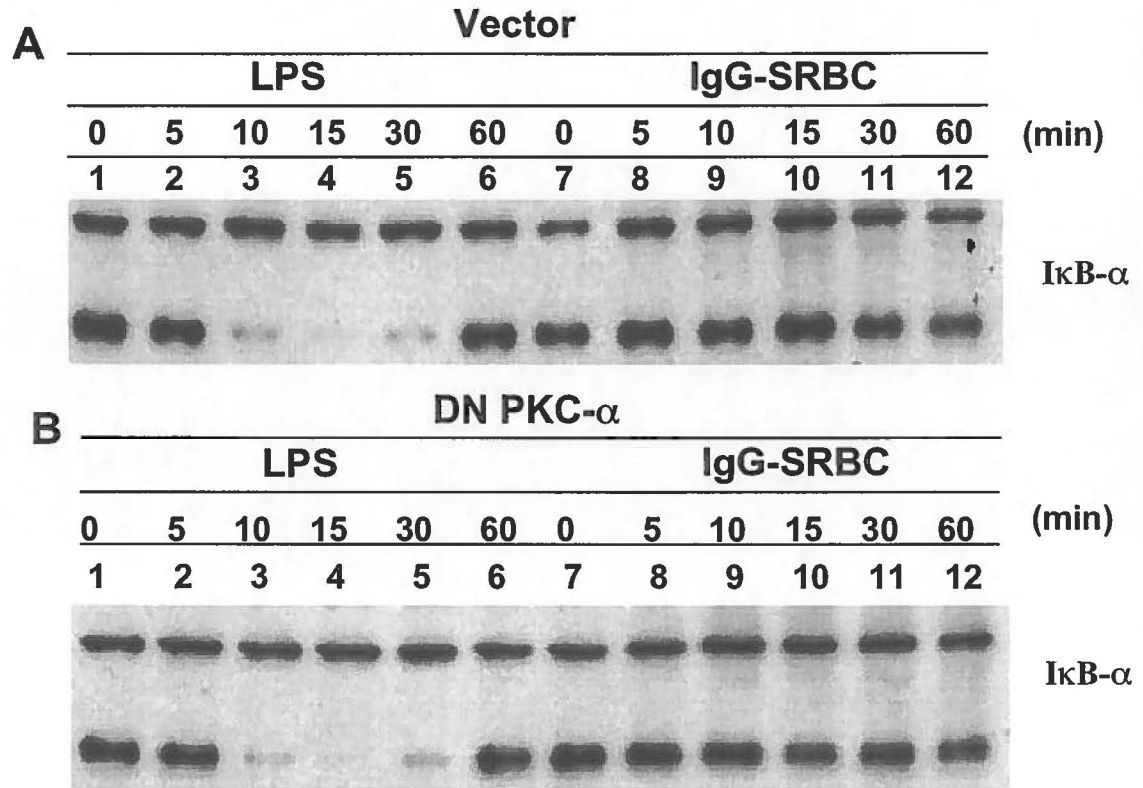
**Figure E.** Overexpression of DN PKC- $\alpha$  has no effect on Fc $\gamma$ R-mediated tyrosine phosphorylation of JNK. Normal (transfected with empty vector) (A) and DN PKC- $\alpha$  overexpressing (B) macrophages were incubated in the absence or the presence of either IgG-SRBC or 100 ng/ml LPS for the indicated time points. Cells extract were prepared and the levels of phosphorylated JNK were determined by Western blot analysis. Similar results were obtained in three experiments.

## Effect of PKC- $\alpha$ on p38 phosphorylation mediated by Fc $\gamma$ R



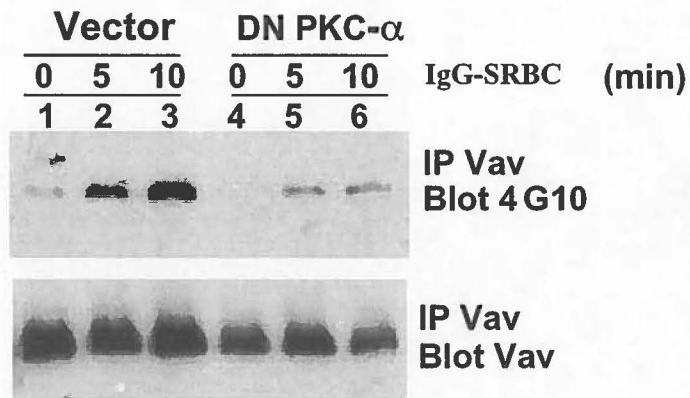
**Figure F.** Overexpression of DN PKC- $\alpha$  has no effect on Fc $\gamma$ R-mediated tyrosine phosphorylation of p38. Normal (transfected with empty vector) (A) and DN PKC- $\alpha$  overexpressing (B) macrophages were incubated in the absence or the presence of either IgG-SRBC or 100 ng/ml LPS for the indicated time points. Cells extract were prepared and the levels of phosphorylated (top panel) and total (bottom panel) p38 were determined by Western blot analysis. Similar results were obtained in three experiments.

## Effect of PKC- $\alpha$ on I $\kappa$ B- $\alpha$ degradation mediated by Fc $\gamma$ R



**Figure G.** Overexpression of DN PKC- $\alpha$  has no effect on Fc $\gamma$ R-mediated tyrosine degradation of I $\kappa$ B. Normal (transfected with empty vector) (A) and DN PKC- $\alpha$  overexpressing (B) macrophages were incubated in the absence or the presence of either IgG-SRBC or 100 ng/ml LPS for the indicated time points. Cells extract were prepared and the levels of degradation I $\kappa$ B were determined by Western blot analysis. Similar results were obtained in two experiments.

## Effect of PKC- $\alpha$ on Vav phosphorylation mediated by Fc $\gamma$ R



**Figure H.** Overexpression of DN PKC- $\alpha$  inhibits Fc $\gamma$ R-mediated tyrosine phosphorylation of Vav. Normal (transfected with empty vector) and DN PKC- $\alpha$  overexpressing macrophages were incubated in the absence or the presence of IgG-SRBC for the indicated time points. Total cell lysates were immunoprecipitated with anti-Vav antibodies and immunoblotted with either the antiphosphotyrosine monoclonal antibody 4G10 (top panel) and the anti-Vav antibodies (bottom panel) to ensure that equivalent amount of Vav were present in the immunoprecipitates. Similar results were obtained in three experiments.