

Université du Québec

INRS-Institut Armand-Frappier

**Rôle de PKC- α dans la maturation du phagosome
chez le macrophage**

Par

John Derek Ng Yan Hing

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

Jury d'évaluation

Président du jury

Mathieu Cellier

Examineur externe

Sylvain Bourgoin

Directeur de recherche

Albert Descoteaux

Sommaire

Les macrophages sont des phagocytes professionnels qui jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire. Par le processus de phagocytose, le macrophage internalise et élimine la majorité des microorganismes et des pathogènes. La phagocytose est initiée suite à l'interaction entre un ligand présent à la surface du microbe et un récepteur exprimé par le macrophage. L'activation d'un récepteur de phagocytose induit plusieurs cascades de signalisation intracellulaires nécessaires à l'internalisation du microbe. Suite à sa formation, le phagosome entreprend un processus de maturation où, grâce à une série d'interactions avec le système endocyttaire, il acquiert des hydrolases et s'acidifie devenant ainsi un phagolysosome. Il a été suggéré que la protéine kinase C- α (PKC- α) joue un rôle dans la régulation de la maturation du phagosome. De plus, l'utilisation de lignées de macrophages exprimant un mutant dominant-négatif de la PKC- α nous a permis de démontrer que cette kinase influence la survie de pathogènes intracellulaires tels *Leishmania* et *Legionella*, possiblement en modulant la maturation des phagosomes.

Afin d'étudier le rôle de PKC- α dans la maturation des phagosomes, nous avons utilisé une approche protéomique par gel électrophorèse à 2 dimensions permettant la comparaison du patron protéique des phagosomes isolés de macrophages de type sauvage et de macrophages surexprimant le mutant DN PKC- α . Nous avons observé que la surexpression du mutant DN PKC- α cause une diminution du recrutement aux phagosomes des marqueurs de maturation LAMP-1, flotilline et Rab 7. De plus, PKC- α semble réguler l'acquisition des cathepsines D et S dans les phagosomes lors de la maturation. Ainsi, nos résultats indiquent que PKC- α joue effectivement un rôle dans la maturation du phagosome, influençant ainsi la composition du phagosome.

Table des matières

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
Revue de littérature.....	5
1. Formation du phagosome.....	6
1.1 L'actine.....	6
1.1.1 Régulation de la polymérisation de l'actine	7
1.2 Les récepteurs.....	9
1.2.1 Récepteur Fc.....	9
1.2.2 Récepteurs du complément (CR).....	11
1.2.3 Récepteur du mannose.....	12
1.2.4 Autres récepteurs de la phagocytose.....	14
1.3 Apport membranaire lors de la phagocytose.....	15
1.3.1 Exocytose.....	15
1.3.2 Exocytose des lysosomes.....	16
1.3.3 Apport de membrane par le réticulum endoplasmique.....	17

2. Maturation du phagosome.....	17
2.1 Modèle « Kiss and Run ».....	18
2.2 Régulation de la maturation du phagosome.....	19
2.2.1 Les SNARE.....	19
2.2.2 Les GTPases de la famille Rab.....	20
2.2.3 Phosphatidylinositol 3 kinase (PI 3-kinase).....	23
2.3 Hydrolases.....	25
2.3.1 Cathepsines.....	26
2.3.2 Régulation de l'activité des cathepsines par le pro-domaine.....	26
2.3.3 Régulation de l'activité des cathepsines par le pH.....	27
2.3.4 Régulation de l'activité des cathepsines par des inhibiteurs endogènes.....	27
3. Mécanismes d'évasion des parasites	28
3.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
3.2 <i>Mycobactéries</i>	30
3.3 <i>Leishmania</i>	32
3.3.1 Les promastigotes de <i>Leishmania</i>	32
3.3.2 Les amastigotes de <i>Leishmania</i>	33

4. Protéine kinase C (PKC)	34
4.1 PKC et les protéines associées.....	36
4.2 PKC dans la phagocytose.....	36
4.3 PKC dans la régulation de la maturation du phagosome.....	37
Article	39
Discussion	62
Conclusion	71
Remerciement	73
Listes des références	74

Liste des figures

Figure A : Polymérisation de l'actine	7
Figure B : Les récepteurs Fc	10
Figure C : Le récepteur Mannose.....	13
Figure D : Le cycle fonctionnel des GTPases Rab	21
Figure E : Structure des lipides phosphatidylinositol et les produits de PI 3-Kinase.....	24
Figure F : La famille de protéines kinases C	35
Figure G : Modèle du rôle de PKC - α dans la maturation du phagosome.....	68

Liste des abréviations

BMM	: Bone marrow-derived macrophages
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
CR	: Récepteur du complément
CRD	: Carbohydrate recognition domains
DAG	: Diacylglycerol
EEA	: Early endosome antigen
FcR	: Récepteur Fc
GAP	: GTPase activating proteins
GDI	: Guanine-dissociation inhibitors
GDF	: Guanine-dissociation factors
GDP	: Guanine diphosphate
GEF	: Guanine exchange factors
GM-CSF	: Granulocyte/macrophage – colony-stimulating factor
GTP	: Guanine triphosphate
ITAM	: Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
LAMP-1	: Lysosomal-associated membrane protein –1
LPG	: Lypophosphoglycan
MARCKS	: Myristoylated alanine rich c kinase substrate
MR	: Récepteur mannose
NSF	: N-ethylmaleimide-sensitive factor
PAMP	: Pathogen-associated molecular patterns
PKC	: Protéine kinase C

PI	: Phosphoinositol
PI3-Kinase	: Phosphoinositol 3-kinase
PIP	: Phosphoinositol phosphate
PMA	: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	: Patterns-recognition receptors
PS	: Phosphatidylserine
RACK	: Receptors for activated C- kinase
SNAP	: Synaptosome-associated protein
SNARE	: Soluble NSF attachment protein receptor
SR	: Récepteur scavenger
STICK	: Substrates that interact with C- Kinase
TACO	: Tryptophane aspartate-containing coat protein
TNF- α	: Tumor necrosis factor- α
VAMP	: Vesicle-associated membrane protein

Introduction

La phagocytose de microorganismes par les macrophages initie la réponse immunitaire innée, orchestrant ainsi la réponse adaptative. Afin de différencier les agents infectieux du soi, les macrophages expriment plusieurs récepteurs phagocytiques. Ces récepteurs sont classés en deux catégories comprenant les récepteurs opsonine-dépendants et les récepteurs opsonine-indépendants. Les récepteurs opsonine-dépendants les mieux caractérisés sont les récepteurs Fcγ (FcγR) reconnaissant la portion Fc des immunoglobulines IgG et les récepteurs du C3 (CR3) qui lient le C3bi (*Daeron, 1997; Aderem et Underhill, 1999; Tjelle et al., 2000*). Quant aux récepteurs opsonine-indépendants, ce sont des récepteurs aussi appelés PRR (patterns-recognition receptors) qui reconnaissent directement un patron structural de la cible surnommé PAMP (pathogen-associated molecular patterns) (*Stahl et Ezekowitz, 1998*). Suite à la liaison d'un ligand à ces récepteurs, un réarrangement de l'actine mène à l'internalisation et à la compartimentation de la particule dans un phagosome. Le phagosome nouvellement formé ne possède pas les propriétés nécessaires afin de tuer et de dégrader les agents pathogènes. Le phagosome doit entreprendre un processus de maturation menant à son acidification et à l'acquisition d'hydrolases lui permettant ainsi d'atteindre l'étape finale de la maturation, le phagolysosome.

Le processus de maturation du phagosome est caractérisé par de multiples interactions séquentielles du phagosome avec les compartiments endosomaux. Lors de chaque contact du phagosome et des compartiments endosomaux, des petits pores de fusion se forment permettant le transfert de matériel vers le phagosome (*Desjardins, 1995*). De plus, plusieurs protéines membranaires telles la famille de GTPase Rab, EEA1 et les SNARE impliqués dans le mécanisme de fusion sont échangées permettant ainsi au phagosome d'interagir successivement avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes. Parmi les hydrolases acquises par le phagosome lors de la maturation, on retrouve la grande famille de protéases cystéine/aspartate. Des études ont démontré que plusieurs membres des protéases cystéines comprenant les cathepsines B, H, L et S et des protéases aspartates comprenant les cathepsines D et E sont impliqués dans la présentation antigénique via le CHM de classe II, aussi bien dans le processus de

dégradation des antigènes que dans la dégradation de la chaîne invariante Ii (*Riese et Chapman, 2000; Turk et al., 2000*).

Plusieurs molécules de signalisation ont été impliquées dans la régulation des mécanismes de phagocytose et du processus de maturation du phagosome incluant la grande famille de protéine kinase C (PKC). Les PKC sont des protéines sérine/thréonine kinases et sont constituées de plusieurs isoenzymes dont six d'entre eux sont exprimés chez les macrophages (PKC- α , - β 1, - β 2, - ϵ , - δ et - ζ). Depuis ces dernières années, plusieurs études portant sur le rôle des différents isoenzymes ont été effectuées. Ainsi, ces récentes études ont révélé que plusieurs isoenzymes incluant PKC- α , - β , - ϵ , - δ et - ζ participent à la régulation de la phagocytose via les récepteurs Fc γ (*Zheleznyak et Brown, 1992; Breton et Descoteaux, 2000; Larsen et al., 2000; Larsen et al., 2002*). De plus, il a été démontré que PKC- α ainsi que son substrat MARCKS (myrystoylated alanine rich c kinase substrate), une protéine membranaire associée aux filaments d'actine, s'associe au phagosome et demeurent à la membrane du phagosome tout au long du processus de maturation (*Allen et Aderem, 1995a*). Pour cette raison, il a été suggéré que PKC- α régule le processus de maturation du phagosome. Toutefois, aucune étude n'a encore directement démontré l'implication de cet isoenzyme dans la maturation du phagosome.

Paradoxalement, pour certains microorganismes la phagocytose sert aussi de mécanisme d'invasion de la cellule hôte. Parmi ces microorganismes, on retrouve le protozoaire *Leishmania donovani* qui a la propriété d'infecter, de survivre et de se répliquer dans les macrophages. Afin d'échapper à l'environnement hostile du phagolysosome, la forme promastigote de *Leishmania* exprime à sa surface un glycolipide, le lipophosphoglycan (LPG), qui a la propriété d'inhiber la fusion entre les phagosomes et les lysosomes (*Desjardins et Descoteaux, 1997; Scianimanico et al., 1999; Dermine et al., 2000*). Il a été aussi démontré que le LPG avait la capacité d'inhiber l'activité *in vitro* de PKC (*Descoteaux et al., 1992*). De plus des études utilisant des inhibiteurs de PKC ont démontré que la capacité du macrophage à détruire les *Leishmania donovani* était diminuée favorisant ainsi sa survie. L'expression d'un mutant DN PKC- α dans la lignée de macrophage murine RAW264.7 a permis de démontrer que

PKC- α joue un rôle important dans le contrôle de la réplication de pathogènes intracellulaires notamment les *Leishmania donovani* et *Legionella pneumophila*, possiblement un régulant le processus de maturation du phagosome (St-Denis et al., 1999).

Afin, d'étudier le mécanisme par lequel PKC- α régule la maturation du phagosome, nous avons utilisé une approche protéomique utilisant le gel d'électrophorèse à 2 dimensions. Cette technique permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique et leur masse moléculaire offrant ainsi l'avantage de pouvoir identifier de modification post-traductionnelles. L'objectif principal de ce projet est d'étudier le rôle de PKC- α dans le processus de maturation du phagosome. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps comparé la composition protéique des phagosomes contenant des billes de latex provenant de macrophages de type sauvage et de macrophages surexprimant un mutant dominant-négatif de PKC- α . Par la suite, nous avons identifié par spectrométrie de masse les protéines dont l'association avec le phagosome est régulée de façon positive ou négative par PKC- α . Finalement, nous avons confirmé la localisation phagosomale des protéines d'intérêts.

Revue de littérature

1. Formation du phagosome

La phagocytose, par opposition à l'endocytose, consiste en l'internalisation de particules relativement grosses ($>0.5 \mu\text{m}$). Les particules internalisées se retrouvent dans une vésicule appelée phagosome. La phagocytose est une étape critique dans l'internalisation et la dégradation des agents pathogènes et joue aussi un rôle dans le mécanisme de remodelage tissulaire, l'inflammation et la réponse immunitaire. La phagocytose est initiée par la liaison d'un ligand à un récepteur générant un signal qui induit la polymérisation locale des filaments d'actine. La polymérisation de l'actine est un processus essentiel dans la phagocytose. En effet, des études ont démontré que la cytochalasine, une toxine de champignon qui provoque la dépolymérisation de l'actine, inhibe la phagocytose chez les cellules phagocytaires ainsi que chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Zigmond et Hirsch, 1972; Maniak et al., 1995). Suite à la formation du phagosome, il y a dépolymérisation de l'actine périphagosomale qui provient de la coupe phagocytique. Cependant, le phagosome ne semble pas être complètement dépourvu d'actine, car plusieurs études ont démontré la présence d'actine associée au phagosome (Desjardins et al., 1994b; Rezabek et al., 1997). Récemment, Defacque et collaborateurs ont démontré qu'il y avait une polymérisation *de novo* des filaments d'actine à la surface de phagosomes contenant des billes de latex et ce réarrangement d'actine varie de façon cyclique avec les étapes de la maturation du phagosome (Defacque et al., 2000). De plus, Defacque et collaborateurs ont démontré que ce processus requiert des phosphoinositol phosphate (PI(4)P et PI(4,5)P₂) ainsi que les protéines ezrin et moesin, deux protéines impliquées dans la régulation de l'actine (Defacque et al., 2000, 2002).

1.1 L'actine

L'actine est une protéine intracellulaire prépondérante dans la cellule eucaryote et est codée par une grande famille de gènes très conservés. L'actine se présente sous forme de monomères globulaires appelés actine G et sous forme de polymères appelés actine F, formée d'une chaîne de monomères d'actine G. La dynamique de la polymérisation de

l'actine *in vitro* passe par trois étapes successives (Figure A). La première est appelée nucléation et se caractérise par une période durant laquelle l'actine G chargée d'ATP s'agrège lentement en petits oligomères formant des noyaux. A mesure que le filament d'actine F s'allonge, la concentration d'actine G diminue jusqu'à ce qu'un équilibre s'établisse dans le système, l'état stationnaire dynamique. Une fois l'actine G-ATP incorporée à un filament, il y a hydrolyse de l'ATP pour devenir des éléments stables d'actine F chargé d'ADP (Lodish *et al.*, 1997).

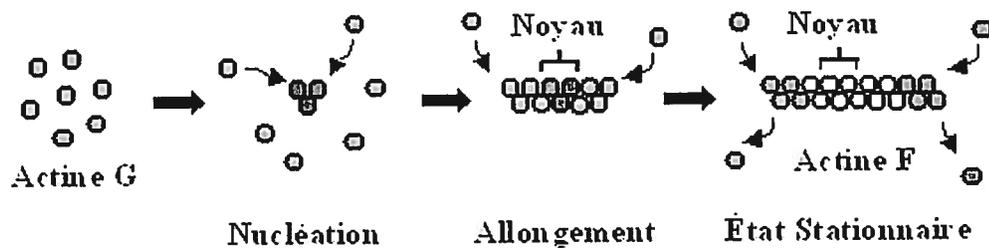


Figure A. Polymérisation de l'actine

(Lodish *et al.*, 1997)

Toutefois dans une cellule, le mécanisme et la régulation de la polymérisation de l'actine sont beaucoup plus complexes et ne sont pas encore tout à fait bien compris. Néanmoins plusieurs protéines ont été impliquées dans le processus de régulation polymérisation de l'actine. Le remodelage des filaments d'actine induit par divers stimuli fait intervenir plusieurs mécanismes notamment la nucléation, le démantèlement et la dépolymérisation des filaments d'actine (Pollard *et al.*, 2000).

1.1.1 Régulation de la polymérisation de l'actine

La nucléation est une façon d'augmenter et de former de nouveaux filaments d'actine. La nucléation des filaments d'actine est régulée par le complexe Arp 2/3, un complexe qui comprend sept protéines (Welch *et al.*, 1997; Machesky *et Gould*, 1999). Il a été démontré que le complexe Arp2/3 (actin-related protein) était recruté à la coupe phagocytaire et co-localisait avec l'actine durant la phagocytose médiée par le récepteur Fc ainsi que le récepteur CR3 (May *et al.*, 2000). Le complexe Arp 2/3 est stimulé par les

molécules de phosphoinosides (PI(4,5)P₂) et les GTPases Cdc42 et Rac. La liaison de Cdc42 et PI(4,5)P₂ à WASP/N-WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) induit un changement de conformation qui active WASP/N-WASP, permettant à cette dernière de lier le complexe Arp 2/3 et ainsi stimuler la nucléation de l'actine (*Takenawa et Miki, 2001*). De plus, la réorganisation de l'actine régulée par Rac et Cdc42 requiert aussi la participation de WAVE/Scar1, un membre de la famille WASP, qui interagit avec la sous-unité p21 du complexe Arp2/3 (*Machesky et Insall, 1998*). En plus de Rac et Cdc42, des études ont montré l'implication de la famille ARF dans la régulation de l'actine. Il a été suggéré que ARF6 agissait en aval de la voie de signalisation de Rac1 (*Greenberg, 1999*).

Le démantèlement du réseau de filament d'actine et la dépolymérisation de l'actine constituent aussi des mécanismes de régulation de l'actine. Parmi les protéines connues pour la séparation et la dépolymérisation des filaments l'actine, on retrouve, entre autres, la protéine gelsoline et la cofiline. Toutefois, le rôle de la gelsoline dans la phagocytose n'est pas encore bien compris. La gelsoline peut séparer ou coiffer les filaments d'actine et son activité est contrôlée par le niveau de Ca²⁺ et de PIP₂. Suite à l'activation par le Ca²⁺, la gelsoline fragmente et coiffe l'extrémité positive des filaments d'actine. La dissociation de la gelsoline à l'extrémité positive des filaments d'actine favorise la polymérisation de l'actine. Cette dissociation est contrôlée par les PIP₂ (*Hartwig et al., 1995*). Chez les neutrophiles déficients en gelsoline, la phagocytose via le récepteur Fc est fortement inhibée, tandis que l'inhibition est moins importante au niveau de la phagocytose via le récepteur du complément. Cependant, la réorganisation de l'actine autour du phagosome est normale chez ces neutrophiles suggérant un mécanisme plus complexe de la gelsoline dans ces cellules (*Serrander et al., 2000*).

La cofiline est une autre protéine qui sépare et dépolymérise les filaments d'actine. La micro-injection d'un anticorps anti-cofiline dans les macrophages diminue la phagocytose. La cofiline est régulée par la voie de signalisation de la LIM kinase (LIMK) et son activité est bloquée par la phosphorylation. Cdc42 et Rac1 ainsi que RhoK activent respectivement LIMK2 et LIMK1 induisant la phosphorylation de la cofiline et du même coup son inhibition (*Arber et al., 1998; Sumi et al., 1999*).

1.2 Récepteurs

1.2.1 Récepteur Fc

Tous les types de récepteurs impliqués dans la phagocytose nécessitent la polymérisation de l'actine. Cependant plusieurs évidences indiquent que ces récepteurs induisent des voies de signalisation distinctes mais convergeant toutes vers la polymérisation de l'actine (*Aderem et Underhill, 1999*).

Les récepteurs Fc γ sont les récepteurs les mieux caractérisés chez les cellules phagocytaires. Le récepteur Fc γ reconnaît la portion Fc des immunoglobulines IgG. Il existe trois classes de récepteurs Fc γ chez l'humain, Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII, faisant partie des membres de la superfamille des immunoglobulines (*Aderem et Underhill, 1999; Cox et Greenberg, 2001*). Ces récepteurs transmettent leur signal à l'aide du motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Ces motifs sont situés soit dans le domaine cytoplasmique du récepteur (Fc γ RIIA) soit dans les sous-unités γ (Fc γ RI et Fc γ RIIIA) et ζ (Fc γ RIIIA). L'association de Fc γ RI et Fc γ RIIIA avec la sous-unité γ est essentielle à leur expression à la surface et aux fonctions phagocytiques. La phosphorylation des ITAMs est initiée par des membres de la famille Src de protéine tyrosine kinase. Suite à la phosphorylation d'ITAMs, la tyrosine kinase p72Syk est recrutée et activée au domaine d'ITAM induisant plusieurs voies de signalisation conduisant à l'activation de la transcription, au réarrangement du cytosquelette et à la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires (figure B).

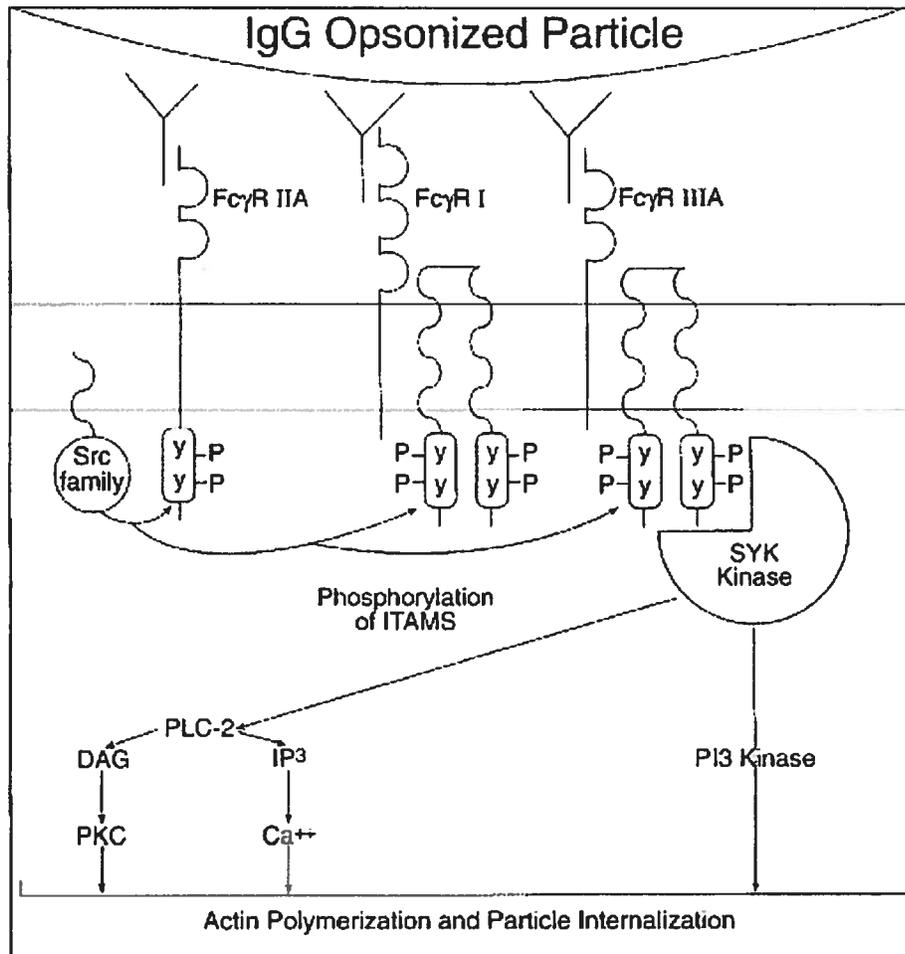


Figure B. Les récepteurs Fc
(Aderem et Underhill, 1999)

L'internalisation médiée par le récepteur Fc γ est un processus appelé « Zipper Mechanism » où il y a une extension de la membrane plasmique du macrophage autour de la particule (Kaplan, 1977). Les récepteurs le long de la membrane plasmique en extension interagissent séquentiellement avec les IgG distribuées autour de la particule à ingérer. La stimulation des récepteurs Fc induit une réorganisation de l'actine du cytosquelette en activant notamment des GTPases de la famille Rho. Chez les macrophages trois membres de cette famille de GTPases, soient Rho A, Cdc42 et Rac1,

contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine et sont impliqués dans le mouvement des cellules dans la chemotaxie (Allen *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1998). La surexpression d'un mutant dominant-négatif de Cdc42 et de Rac dans les cellules phagocytaires inhibe la phagocytose via les récepteurs Fc et il y a une diminution de la concentration de l'actine F aux sites d'attachements des particules (Cox *et al.*, 1997). Au contraire, l'inhibition de Rho A n'affecte ni la phagocytose ni la polymérisation de l'actine médiées par le FcR (Caron *et Hall*, 1998; May *et al.*, 2000). De plus, comme mentionné précédemment, plusieurs études démontrent que Cdc42 et Rac contrôlent la polymérisation de l'actine à travers la protéine de la famille WASP qui a la capacité de lier et de stimuler l'activité de nucléation du complexe Arp2/3. Ainsi, Cdc42 et Rac semblent être impliqués exclusivement dans la régulation de l'actine médié par le FcR.

1.2.2 Récepteurs du complément (CR)

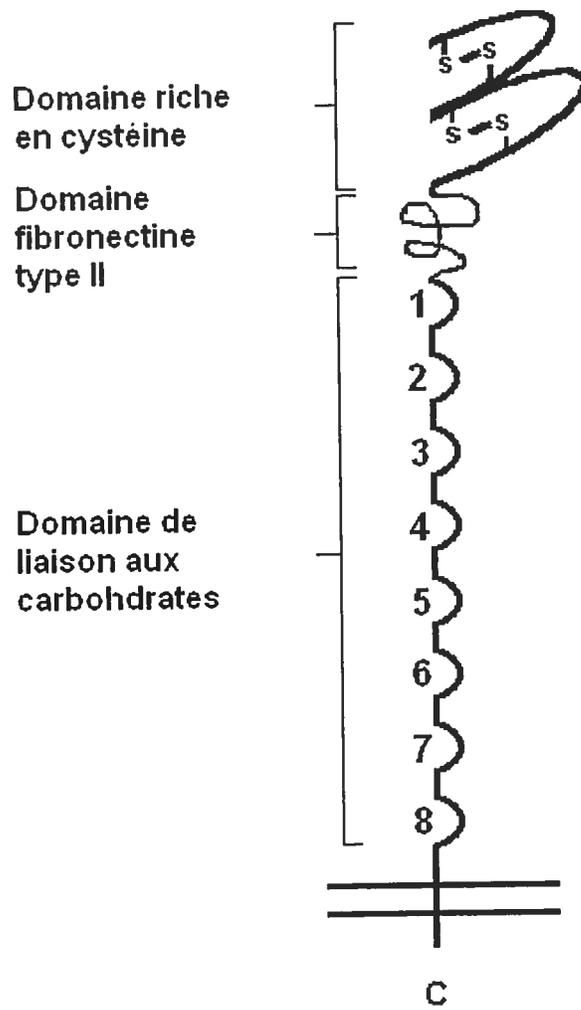
Comparativement aux récepteurs Fc γ , la phagocytose régulée par les récepteurs du complément (CR) est morphologiquement différente. Les particules opsonisées par le complément sont englouties par la membrane plasmique du macrophage. Cette internalisation n'implique pas d'extension de la membrane plasmique autour de la membrane opsonisée (Kaplan, 1977). Les macrophages expriment plusieurs récepteurs du complément impliqués dans la phagocytose incluant CR1, CR3 et CR4. Simple chaîne trans-membranaire, CR1 est une protéine constituée d'un grand domaine extracellulaire de liaison du complément (lectin-like) et d'un petit domaine cytoplasmique. Le rôle principal de CR1 est la liaison des particules opsonisées par le complément. Les récepteurs CR3 et CR4 sont des hétérodimères de la famille des intégrines et partagent la même sous-unité β_2 (Aderem *et Underhill*, 1999). Ces deux récepteurs lient spécifiquement C3bi et sont responsables de l'internalisation des particules.

Contrairement aux récepteurs Fc qui sont constitutivement actifs lors de la phagocytose, l'internalisation via le récepteur du complément nécessite des stimuli additionnels comme le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), des chemokines, le TNF- α (tumor necrosis factor- α), le GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating

factor) ou l'attachement à des surfaces composées de fibronectine (Aderem et Underhill, 1999; Chimini et Chavrier, 2000). De plus l'internalisation via le récepteur du complément n'induit ni de réponse inflammatoire et ni de flambée oxydative (Aderem et Underhill, 1999). La capacité à lier des ligands réside dans l'agrégation ligand-indépendant des CR3 (Detmers et al., 1987). De plus, cette agrégation semble être stimulée par la phosphorylation des résidus sérine des CR3 suite à un traitement au PMA (phorbol myristate acetate) suggérant l'implication des protéine kinase C (PKC) (Chatila et al., 1989). Caron et Hall ont démontré que l'inhibition de RhoA par la toxine C3 transférase bloquait la phagocytose des particules opsonisées par le complément (Caron et Hall, 1998). De plus, il y avait une diminution du recrutement du complexe Arp2/3 au site de la phagocytose suggérant aussi l'implication du complexe Arp2/3, mais le mécanisme par lequel RhoA stimule l'activité de Arp2/3 et la polymérisation de l'actine n'est pas connu (May et al., 2000). En comparaison, la surexpression d'un dominant négatif de Cdc42 ou de Rac1 n'avait pas d'effet ni sur la phagocytose via le récepteur du complément et ni sur le recrutement du complexe Arp2/3 sur le phagosome (Caron et Hall, 1998; May et al., 2000). En somme, l'internalisation via le complément requiert l'activité de RhoA contrairement aux récepteurs Fc où l'extension de pseudopode est coordonnée par Cdc42 et Rac1.

1.2.3 Récepteurs du Mannose (CR)

Les phagocytes professionnels tels les macrophages et les cellules dendritiques, possèdent des récepteurs opsonine-indépendants, aussi appelés PRR (patterns-recognition receptors) qui reconnaissent directement un patron structural à la surface des microorganismes (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) (Stahl et Ezekowitz, 1998). Parmi ces récepteurs, on trouve un membre de la famille des récepteurs multilectines, le récepteur mannose (MR). Le MR reconnaît les résidus mannose et les résidus fucose à la surface des pathogènes et induit la phagocytose de ces microorganismes. Le MR est une protéine trans-membranaire de 180 kDa possédant cinq domaines (figure C).



**Récepteur
Mannose**

Figure C. Le récepteur Mannose
(Stahl et Ezekowitz, 1998)

La région amino-terminale est une région riche en résidus cystéine. Il y a un domaine contenant des fibronectines de type II et un domaine qui reconnaît les carbohydrates (CRD, carbohydrate recognition domains), constitué d'une séquence répétée de « lectin-like » en tandem et un domaine trans-membranaire et un domaine carboxy-terminal cytoplasmique. Le CRD a pour fonction de lier les sucres comme le mannose, le fucose et

N-acetylglucosamine (*Fraser et al., 1998; Apostolopoulos et McKenzie, 2001*). Chaque CRD a une contribution différente dans la liaison d'un ligand. Les trois premiers CRD ont une faible affinité pour les ligands saccharidiques. Ensemble, les CRD 4,-5, et -7 sont nécessaires pour avoir une plus grande affinité de liaison à des glycoconjugués (*Zamze et al., 2002*). Le CRD4 est le seul à pouvoir lier les monosaccharides (*Taylor et al., 1992*). Durant la phagocytose de zymosan, plusieurs protéines comme actine F, talin, PKC- α , MARKCS et Myosin I sont recrutées au site de la phagocytose.

Contrairement à la phagocytose régulée par les FcR et CR, les protéines vinculines et paxillines ne sont pas recrutées aux phagosomes ce qui suggère que chacun des récepteurs de phagocytose régulent par des voies de signalisation différentes la polymérisation de l'actine (*Aderem et Underhill, 1999*). Cependant, la voie de signalisation du récepteur mannose menant au réarrangement de l'actine n'a pas été encore élucidée. Tout comme les récepteurs Fc, la phagocytose via les MR est accompagnée d'une réponse pro-inflammatoire.

1.2.4 Autres récepteurs de phagocytose

En plus de protéger l'hôte contre des infections des agents pathogènes, les macrophages jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules apoptotiques. Pour ce faire, les macrophages expriment plusieurs autres récepteurs impliqués dans la phagocytose, notamment les récepteurs scavengers (SR-A et SR-B) (*Savill et al., 1990; Savill et al., 1992; Platt et al., 1996; Palecanda et Kobzik, 2001*), CD14 (*Devitt et al., 1998*), et le récepteur de la vitronectine (*Savill et al., 1990*) qui sont impliqués entre autres dans la phagocytose de cellules apoptotiques. Il y a aussi Dectin-1, récepteur majeur des β -glucans, qui reconnaît et induit l'internalisation des particules de zymosan riches en β -glucans (*Brown et al., 2002*). Tout comme pour les récepteurs Fc, CR et MR, ces récepteurs induisent aussi le processus de phagocytose par des voies de signalisation différentes qui convergent néanmoins vers la polymérisation de l'actine. Toutefois, les détails de ces diverses voies de signalisation ne sont pas encore élucidés.

1.3 Apport membranaire lors de la phagocytose

Lors de la phagocytose, les macrophages peuvent internaliser plus de 50% de leur surface membranaire. Griffin a démontré en 1975 que les macrophages pouvaient internaliser en moyenne 7 à 16 érythrocytes opsonisés par les IgG par cellule (*Griffin et al., 1975*). La surface totale des phagocytes devrait donc diminuer lors de l'extension de la membrane plasmique et de l'internalisation de membrane en phagosome limitant ainsi la taille et le nombre de particule à internaliser. Étonnamment, des études ont montré que la taille des macrophages ne varie presque pas lors du processus d'internalisation et de plus, ils ont la capacité d'internaliser plusieurs particules (*Hackam et al., 1998; Holeyvinsky et Nelson, 1998*). Ainsi donc, des mécanismes de compensation ont été suggérés notamment l'exocytose/recyclage des vésicules des compartiments endosomaux (*Booth et al., 2001*), l'exocytose des lysosomes (*Tardieux et al., 1992*) et tout récemment le groupe de Desjardins a proposé l'implication du réticulum endoplasmique dans la phagocytose (*Gagnon et al., 2002*).

1.3.1 Exocytose

Plusieurs observations ont suggéré que l'exocytose de vésicules soit essentielle pour une phagocytose optimale. L'utilisation de toxines ou la surexpression de mutants dominant-négatif de protéines impliquées dans la fusion des vésicules comme v-SNARE (VAMP-2) (*Hackam et al., 1998*), NSF (*Coppolino et al., 2001*) et phospholipase A2 (*Lennartz et al., 1997*) inhibe la phagocytose suggérant que la fusion des membranes est importante dans le processus de phagocytose. De plus, l'inhibition de PI3-Kinase (PI3-K) par la wortmannin ou le LY294002 inhibe l'internalisation des grosses particules $\geq 4.5 \mu\text{m}$, mais l'internalisation des petites particules inférieures 2-3 μm n'était pas affectée (*Cox et al., 1999*). Également, l'inhibition de PI3-K bloque l'extension maximale de la membrane autour des particules opsonisées par les IgG. Toutefois, l'accumulation de F-actine au site de phagocytose n'est pas affectée par l'inhibition de la PI3-K. Ainsi, il a été suggéré que l'inhibition de l'extension des pseudopodes est causée par une inhibition de l'exocytose et non par une inhibition du réarrangement du cytosquelette (*Cox et al.,*

1999). Aussi, l'expression d'un mutant constitutivement actif de Rab11, une petite GTPase de la famille des Rab impliquée dans la fusion des vésicules, augmente le niveau d'exocytose de même que la phagocytose. Enfin, l'expression d'un mutant inactif de Rab11 inhibe l'exocytose et la phagocytose. Puisque Rab11 s'associe aux endosomes de recyclage, ceci suggère que l'apport en membrane lors de la phagocytose provient des endosomes de recyclage. Ces observations suggèrent donc que le processus de phagocytose nécessite un apport en membrane intracellulaire provenant des endosomes de recyclage (Cox et al., 2000). De plus, plusieurs groupes ont observé une exocytose localisée des lysosomes durant la phagocytose chez les neutrophiles (Suzaki et al., 1997; Tapper et Grinstein, 1997; Tapper et al., 2002). L'exocytose est donc un processus nécessaire et localisé au cours de la phagocytose. Également, l'utilisation de la protéine de fusion VAMP3-GFP a permis d'observer le mouvement de la protéine v-SNARE vers la coupe phagocytaire au cours de la phagocytose. Suite à la liaison de la particule, il y a une accumulation de VAMP3-GFP au site de formation du phagosome suggérant le passage de VAMP3-GFP normalement située aux endosomes de recyclage vers le site de l'internalisation (Bajno et al., 2000). En somme, ces observations indiquent que l'exocytose est un processus de compensation localisé permettant l'extension des pseudopodes lors de la phagocytose.

1.3.2 Exocytose des lysosomes

Un processus d'exocytose différent a été observé lors de l'étude d'invasion du protozoaire *Trypanosoma cruzi*. Contrairement aux autres types de microorganismes, l'internalisation de *Trypanosoma cruzi* ne nécessite pas la polymérisation de l'actine et de plus, Tardieux a observé qu'un démantèlement des microfilaments favorisait l'entrée de *T.cruzi* (Tardieux et al., 1992). Il a été aussi observé que les lysosomes s'accumulaient graduellement au site d'attachement de *T.cruzi* et fusionnaient avec la membrane plasmique pour former une vacuole (Tardieux et al., 1992). Cette fusion des lysosomes à la membrane plasmique est stimulée par une augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire induite par le pathogène (Burleigh et Andrews, 1998; Kima et al., 2000; Burleigh et Woolsey, 2002).

1.3.3 Apport de membrane par le réticulum endoplasmique

Étonnamment, le réticulum endoplasmique (RE) connu jusqu'à présent comme un compartiment où transitent les protéines destinées à la sécrétion démontre des propriétés inattendues. Suite à une analyse compositionnelle de phagosomes contenant des billes de latex, le groupe de Desjardins a identifié plusieurs protéines du réticulum endoplasmique dont la calnexine et la calréticuline (*Garin et al., 2001*). Gagnon et collègues ont montré que la présence des éléments du RE dans le phagosome n'est pas due à une forme de contamination (*Gagnon et al., 2002*). Ensuite des analyses par microscopie électronique ont montré que la membrane du RE était en continuité avec la membrane plasmique près du site de phagocytose. De plus, le phagosome nouvellement formé contient un niveau élevé de protéines du RE et ce niveau diminue en même temps que l'augmentation du niveau des marqueurs lysosomaux lors de la maturation du phagosome. Ce processus de recrutement de la membrane du RE lors de la phagocytose s'applique aussi à la phagocytose de parasites intracellulaires tels *Leishmania donovani* et *Salmonella typhimurium*. Ces observations suggèrent donc que le RE interagit effectivement avec la membrane du phagosome en voie de formation. Cependant contrairement au macrophage, il semble que cet apport de membrane par le RE ne soit pas un mécanisme majeur lors de la phagocytose chez les neutrophiles (*Gagnon et al., 2002*). En somme, la compensation membranaire par le RE semble être essentielle pour certains types de phagocytose. Toutefois, d'autres études sont nécessaires afin d'approfondir ce modèle.

2. Maturation du phagosome

Suite à l'internalisation d'une particule, le contenu du phagosome nouvellement formé, semblable au milieu extracellulaire, n'a pas les propriétés microbicides nécessaires pour tuer et dégrader les agents pathogènes. Ainsi peu après sa formation, le phagosome entreprend un processus de maturation induisant plusieurs changements notamment dans la composition membranaire et intravésiculaire conduisant à la formation du phagolysosome.

2.1 Modèle « Kiss and Run »

Lors du processus de maturation, le phagosome interagit avec les compartiments endosomaux. Plusieurs études ont démontré que le phagosome mature en interagissant successivement avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes. Au cours de cette maturation, le phagosome acquiert séquentiellement des marqueurs précoces comme le récepteur transferrine, les protéines EEA (early endosome antigen) et les Rab5 et les marqueurs tardifs comme Rab7 et LAMP1 (*Desjardins et al., 1994a; Allen et Aderem, 1996a; Via et al., 1997; Jahraus et al., 1998; Scianimanico et al., 1999*). Suite à ces interactions, le phagosome obtient plusieurs molécules nécessaires à l'activité microbicide. Parmi ces molécules, on trouve les pompes à proton qui sont impliquées dans l'acidification du phagosome et des hydrolases impliquées dans la digestion des particules ingérées (*Claus et al., 1998; Garin et al., 2001; Lennon-Dumenil et al., 2002*). Une étude par vidéo-microscopie effectuée par Desjardins et collègues a permis de démontrer qu'il y avait des contacts transitoires rapides entre les phagosomes et les compartiments endosomaux. De plus, il a été aussi observé que la taille des particules influençait la vitesse de leur transfert entre les endosomes et les phagosomes (*Wang et Goren, 1987; Desjardins et al., 1994a; Berthiaume et al., 1995; Desjardins et Descoteaux, 1997*). En se basant sur ces évidences, Desjardins a proposé un modèle appelé « Kiss and Run » où les phagosomes interagissent transitoirement avec les compartiments endosomaux à l'aide de petits pores de fusion (*Desjardins, 1995*). Ce modèle permet de garder la spécificité de chaque organelle et d'échanger des éléments sans mélanger la composition des deux compartiments. Ce modèle vient aussi expliquer le fait que les phagosomes gardent une taille constante au cours de la maturation malgré les multiples interactions et vient du même coup exclure le modèle d'un événement de fusion unique entre le phagosome et les compartiments endosomaux. Des récentes observations sur l'acquisition séquentielle des différents types de cathepsines par le phagosome lors de la maturation semblent confirmer ce modèle d'interactions transitoires entre les organelles (*Desjardins, 1995; Garin et al., 2001; Lennon-Dumenil et al., 2002*). Ainsi ce modèle réfute le modèle de fusion complète du phagosome avec les lysosomes proposé par Rabinowitz au début des années 90 (*Rabinowitz et al., 1992*).

2.2 Régulation de la maturation du phagosome

Afin de réguler le processus d'interactions entre le phagosome et les compartiments endosomaux, plusieurs protéines et molécules gouvernent le processus de fusion du phagosome incluant les protéines de fusion SNARE, la famille Rab et les PI 3-kinases.

2.2.1 Les SNARE

SNARE (soluble NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor) est une grande famille de petites protéines de 18-42 kDa dont la plupart sont membranaires. À ce jour, plus d'une trentaine de membres de la famille SNARE ont été identifiés chez les mammifères (*Jahn et Sudhof, 1999; Hay, 2001*). Initialement, les SNARE étaient classées en t-SNARE (target-SNARE, localisée sur la membrane cible) et v-SNARE (vesicule-SNARE, localisée sur la membrane de la vésicule). Tous les membres de la famille SNARE partagent un domaine d'homologie d'environ 60 acides aminés surnommé motif SNARE (SNARE motif). Ce motif SNARE est très important dans la formation du complexe quaternaire de SNARE constitué de quatre hélices- α . Suite à des analyses cristallographiques des complexes de SNARE, deux résidus conservés, arginine et glutamine, ont été identifiés et semblent être des éléments essentiels dans le motif de SNARE. La découverte de ces deux résidus a conduit à une nouvelle classification proposée par le groupe de Jahn soit le Q-SNARE (glutamine-SNARE) et le R-SNARE (Arginine-SNARE) (*Fasshauer et al., 1998*). Ainsi, le complexe de SNARE est constitué de trois hélices Q-SNARE et d'une hélice R-SNARE. Ce complexe est très stable et est nécessaire pour la fusion membranaire notamment dans la fusion des vésicules de sécrétion neuronales, des virus à la membrane des cellules et des vésicules du système endosomal. Toutefois, la spécificité d'interaction entre les SNARE n'est présentement pas tout à fait bien comprise. Yang a démontré que la spécificité dans la fusion des membranes ne réside pas dans l'affinité entre les SNARE, car les différentes combinaisons de SNARE donnent des complexes de SNARE très stables (*Fasshauer et al., 1998; Yang et al., 1999*). Le complexe SNARE est associé avec les protéines NSF (*N*-

ethylmaleimide-sensitive factor) et SNAP (Synaptosome-associated protein) pour former un complexe de 20S essentiel à l'arrimage et à la fusion des vésicules. NSF est une protéine cytoplasmique qui se lie la membrane à l'aide de la protéine SNAP. Le rôle principal NSF et SNAP est de dissocier le complexe SNARE après la fusion des vésicules permettant le recyclage de SNARE (*Teng et al., 2001*).

Plusieurs membres de la famille SNARE ont été localisés sur les phagosomes incluant les Q-SNARE (syntaxines 2, 3, 4, 7, 8 et 13) et les R-SNARE (VAMP-2 et 3 (vesicle-associated membrane protein)) (*Hackam et al., 1996; Bajno et al., 2000; Garin et al., 2001; Teng et al., 2001; Collins et al., 2002*). Toutefois, le rôle de ces SNARE dans la maturation du phagosome n'est pas encore connu. Collins a démontré que l'accumulation des syntaxines 13 et 7 sur les phagosomes était séquentielle suggérant que ces SNARE soient nécessaires à différentes étapes de la maturation. La surexpression d'un mutant dominant-négatif des syntaxines 13 et 7 n'affecte pas la phagocytose, mais inhibe la maturation du phagosome (*Collins et al., 2002*). De plus, l'utilisation d'anticorps contre la protéine NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor) et de *N*-ethylmaleimide inhibe la fusion entre le phagosome et les endosomes (*Alvarez-Dominguez et al., 1996*). Puisque la protéine NSF est un élément essentiel du complexe 20S, cela suggère donc l'implication des SNARE dans la fusion des vésicules lors de la maturation du phagosomes.

2.2.2 Les GTPases de la famille Rab

La famille des petites GTPases Rab joue aussi un rôle très important dans la régulation de la fusion des vésicules notamment dans la fusion des compartiments endosomaux et dans le processus de maturation du phagosome. Les protéines Rab ont une distribution ubiquitaire dans les cellules. Jusqu'à présent, environ 40 protéines Rab distinctes ont été identifiées et elles semblent être associées spécifiquement à des organelles ou des voies particulières. Toutefois, leurs fonctions sont très peu connues. Les protéines Rab alternent entre la membrane et le cytosol dépendamment de leur état d'activation. La forme active, Rab-GTP, est membranaire et la forme inactive, Rab-GDP, est cytoplasmique (Figure D). L'échange de nucléotides se fait suivant la liaison de Rab à

la membrane et est régulé par les facteurs d'échange de guanine (GEF; Guanine exchange factors) (Horiuchi et al., 1997). Après la fusion des membranes, les facteurs d'activation de GTPase (GAP, GTPase activating factors) stimulent l'hydrolyse du GTP, inactivant ainsi la protéine Rab. La forme inactivée de Rab se dissocie de la membrane grâce à sa reconnaissance et sa liaison par le facteur GDI (guanine dissociation inhibitors) qui favorise sa dissociation. Ensuite, le recyclage des Rab-GDP cytoplasmiques vers une nouvelle vésicule se fait par la dissociation de GDI du complexe Rab-GDP-GDI par le facteur GDF (guanine dissociation factors) (Pfeffer et al., 1995; Wu et al., 1996; Gonzalez et Scheller, 1999).

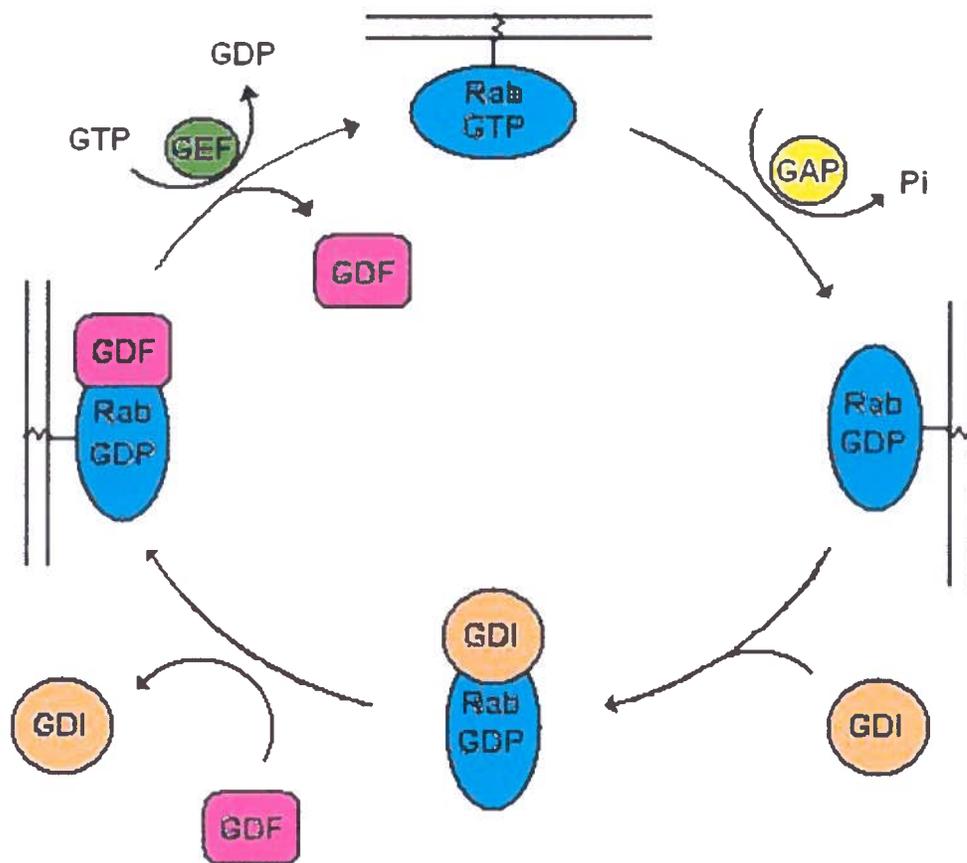


Figure D. Le cycle fonctionnel des GTPases Rab

Plusieurs études ont suggéré que les GTPases de la famille Rab jouent un rôle important dans le recrutement des facteurs permettant l'arrimage des membranes précédant le processus de fusion (Pfeffer, 1999). Plusieurs protéines Rab sont localisées aux endosomes précoces et aux compartiments de recyclage incluant Rab4a, Rab5a, Rab5b, Rab5c et Rab11, Rab18, Rab22 et Rab25 (Van Der Sluijs et al., 1991; Lutcke et al., 1994; Bucci et al., 1995; Ullrich et al., 1996; Green et al., 1997; Casanova et al., 1999). Rab7 est localisée principalement aux endosomes tardifs, mais il a été démontré que Rab7 s'associait également aux lysosomes (Meresse et al., 1995; Bucci et al., 2000). Il est bien établi que Rab4 et Rab 11 sont impliqués dans la régulation du recyclage vers la membrane plasmique alors que Rab5 contrôle le transport des vésicules vers les endosomes précoces et les fusions homotypiques des endosomes précoces (Barbieri et al., 1994; Bucci et al., 1995). L'utilisation d'un mutant constitutivement actif de Rab5 induit la formation d'endosomes précoces géants, suggérant une stimulation de la fusion entre les endosomes précoces (Stenmark et al., 1994; Duclos et al., 2000; Roberts et al., 2000). Des études ont montré que Rab7 régulaient la transition entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs (Feng et al., 1995; Vitelli et al., 1997; Press et al., 1998). De plus, la surexpression d'un mutant dominant-négatif de Rab7 mène à une dispersion des lysosomes dans les cellules Hela, ce qui suggère que Rab7 régule aussi les interactions entre les endosomes tardifs et les lysosomes (Bucci et al., 2000).

Plusieurs Rabs sont aussi associées aux phagosomes incluant Rab3, Rab4, Rab5, Rab7, Rab9, Rab10, Rab11 et Rab14 (Roberts et al., 2000; Garin et al., 2001). Cependant, leurs fonctions dans les phagosomes sont très peu connues. Par analogie avec le système endosomal, Rab5 et Rab7 pourraient jouer un rôle dans les interactions entre les phagosomes et les compartiments endosomaux. Ainsi, Jahraus a montré que l'addition de Rab5 exogène dans les macrophages J774 augmente la fusion entre les phagosomes et les endosomes précoces (Jahraus et al., 1998). Le rôle de Rab7 dans les phagosomes des cellules de mammifères n'est pas encore bien défini, mais une étude effectuée par Rupper, surexprimant un mutant dominant-négatif de Rab7 dans *Dictyostelium*, montre une altération dans le processus de maturation du phagosome (Rupper et al., 2001). Malgré les importants progrès effectués au cours des dernières années dans l'élucidation

des rôles des Rab dans les processus de fusion entre divers compartiments, le mécanisme d'action des Rab face aux autres éléments impliqués dans la fusion des membranes, notamment les SNARE, reste à être élucidé.

2.2.3 Phosphatidylinositol 3 kinase (PI 3-kinase)

Les produits des PI 3-kinases jouent un rôle important dans le trafic membranaire, la voie endocytaire et la maturation du phagosome. La PI 3-kinase est une enzyme qui phosphoryle le groupement hydroxy D-3 des phosphoinositides (Figure E.A). Chez les mammifères, il y a trois classes de PI 3-kinases; classe I, classe II et classe III. Toutes les classes de PI 3-kinase sont constituées d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité adaptatrice. *In vitro*, la PI 3-kinase de classe I peut phosphoryler les lipides phosphoinositol (PI), PI(4)P et PI(4,5)P₂. Toutefois dans la cellule, la PI 3-kinase de classe I produit principalement du PI(3,4,5)P₃. La PI 3-kinase de classe II utilise les mêmes substrats que la PI 3-kinase de classe I *in vitro*, mais dans la cellule, leurs substrats n'ont pas été déterminés. La PI 3-kinase de classe III est homologue aux protéines Vps34p (vesicular protein-sorting protein) des levures. La PI 3-kinase de classe III phosphoryle seulement les phosphoinositols *in vitro* et produit principalement du PI(3)P dans la cellule (Figure E.B) (Vanhaesebroeck et Waterfield, 1999). Ces lipides sont des signaux membranaires permettant la régulation du trafic membranaire intracellulaire et du cytosquelette d'actine. Ainsi, ils servent à recruter et activer diverses protéines effectrices possédant notamment le domaine PH (pleckstrin homology) ou la séquence consensus FYVE (Coppolino et al., 2002; Gillooly et al., 2001; Martin, 2001)

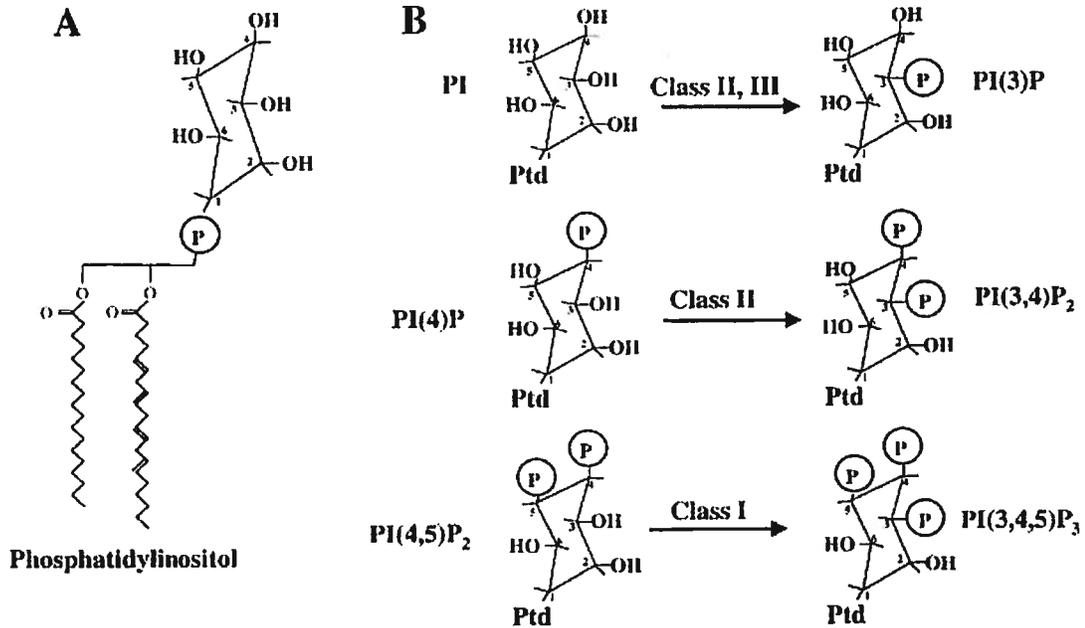


Figure E. Structure des lipides phosphatidylinositol et les produits de PI 3-kinase
(Backer J., 2000)

Les PI 3-kinases de classes I et III ont été impliquées dans le processus de phagocytose ainsi que dans la maturation du phagosome (Araki *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2001). Jusqu'à présent, il n'y a pas de preuve concernant l'implication de la PI 3-kinase de classe II dans le processus de formation et de maturation du phagosome. A l'aide des deux inhibiteurs de PI 3-kinase (wortmannin et LY294002), plusieurs groupes ont montré que l'activité de la PI 3-kinase est importante pour la phagocytose, au niveau de la fermeture des pseudopodes autour des particules (Araki *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1999). Cependant, ces inhibiteurs ne permettent pas de déterminer quelles isoenzymes sont impliquées dans le processus de phagocytose. Ainsi l'utilisation de cellules dépourvues de la sous-unité p85 de la PI 3-kinase de classe I a permis à Vieira et collègues de démontrer que la phagocytose de grosses particules était dépendante de l'activité de la PI 3-kinase de classe I (Vieira *et al.*, 2001). De plus, la microinjection d'un anticorps contre la PI 3-kinase de classe III dans des phagocytes par deux équipes (Fratti *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2001) a permis de démontrer l'implication de cette kinase dans le processus de maturation du phagosome. L'inhibition spécifique de PI 3-kinase de classe III affecte le recrutement du marqueur LAMP-1 au phagosome suggérant une

inhibition de la maturation. Cette inhibition n'avait aucun effet sur la phagocytose (*Fratti et al., 2001; Vieira et al., 2001*). Donc, la PI 3-kinase classe I, en occurrence son produit PI(3,4,5)P₃, est impliquée dans la phagocytose et la PI 3-kinase de classe III, en l'occurrence PI(3)P, est impliquée dans la maturation des phagosomes. De plus, Vieira a observé une augmentation du niveau de PI(3)P dans les phagosomes, suggérant que le recrutement de VPS34 aux phagosomes stimule la production de PI(3)P (*Vieira et al., 2001*).

PI(3)P est une molécule très importante dans les voies des endosomes précoces principalement pour recruter efficacement la protéine EEA1 (early endosome antigen 1). La protéine EEA1, effecteur majeur de la GTPase Rab5, interagit avec la SNARE Syntaxine 13, les facteurs NSF et α -SNAP pour former le complexe de fusion permettant l'arrimage et la fusion des membranes (*McBride et al., 1999*). EEA1 est recruté aux endosomes en interagissant avec Rab5 et en liant la molécule PI(3)P sur les endosomes grâce à son domaine FYVE (*Patki et al., 1997*). Étant donné que la production de PI(3)P est nécessaire pour l'association de EEA1 à la membrane, Fratti a démontré que le traitement des cellules après internalisation des billes de latex avec les inhibiteurs wortmannin et LY294002, diminue significativement le recrutement de EEA1 dans les phagosomes. De plus, l'inhibition de l'activité de la PI 3-kinase interfère avec l'acidification du phagosome. Ainsi, l'inhibition de la PI 3-kinase et l'exclusion de EEA1 corrélient avec l'inhibition de la maturation (*Fratti et al., 2001*).

2.3 Hydrolases

Au cours de la maturation, le phagosome devient non seulement de plus en plus acide, mais acquiert aussi diverses hydrolases lors des multiples interactions avec les compartiments endosomaux. Parmi ces hydrolases, on retrouve entre autres plusieurs membres de la famille des cathepsines incluant des cathepsines B, D, H, L, S et Z (*Claus et al., 1998; Garin et al., 2001; Lennon-Dumenil et al., 2002*). Les cathepsines sont de loin les plus abondantes des hydrolases dans les phagosomes. Ces hydrolases jouent un rôle important notamment dans la dégradation des pathogènes et dans le traitement des

peptides antigéniques pour leur présentation par les molécules de CHM de classe II. De plus, l'accumulation et l'activation progressive de ces hydrolases permettent un contrôle de l'environnement protéolytique des phagosomes. Ainsi, l'activation temporelle et spatiale de ces hydrolases sont des événements très importants dans les phagosomes et sont essentielles pour une dégradation progressive des antigènes au lieu d'une dégradation massive permettant ainsi la génération de peptides de la bonne taille pour leur présentation à la surface des cellules par les molécules de CMH de classe II.

2.3.1 Cathepsines

Les cathepsines (Cath) sont des protéases constituées majoritairement d'endoprotéinases de la famille « cystéine/aspartate ». Tous ces membres ont des distributions distinctes dans les tissus. Chez les macrophages de souris, on compte environ sept membres (*Claus et al., 1998; Garin et al., 2001; Lennon-Dumenil et al., 2002*). De plus, il y a de la redondance parmi ces protéases endosomales ce qui vient compliquer les études de caractérisation de chaque cathepsine. Par exemple, il a été démontré que Cath S et L et possiblement Cath F, K et V jouent un rôle dans la dégradation de la chaîne invariante Ii (*Riese et Chapman, 2000*).

2.3.2 Régulation de l'activité des cathepsines par le pro-domaine

Les cathepsines sont synthétisées sous forme inactive possédant un pro-peptide localisé en N-terminal de la protéine. Ce pro-peptide est lié à leur site catalytique empêchant ainsi l'activation prématurée de l'enzyme dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Après glycosylation et phosphorylation des résidus mannose lors de leur passage dans l'appareil de Golgi, ces enzymes sont transportées vers les compartiments endosomaux grâce aux récepteurs mannose-6-phosphate (*Nakagawa et Rudensky, 1999*). Dans les endosomes, l'environnement acide favorise le clivage du pro-peptide soit par auto-digestion ou par d'autres enzymes activées pour générer des protéases matures. Ainsi, le pro-domaine constitue le premier régulateur de l'activité protéolytique des cathepsines.

2.3.3 Régulation de l'activité des cathepsines par le pH

Le pH constitue le deuxième facteur permettant le contrôle des activités de ces enzymes. Jusqu'à présent, des études ont démontré que Cath S est le seul membre à conserver une activité même après une longue période d'exposition dans un milieu neutre suggérant que Cath S est active tout au long de la voie endosomale (*Kirschke et al., 1989; Bromme et al., 1993; Driessen et al., 1999*). Bien que tolérant des pH très différents, l'activité de la Cath S n'est observée qu'aux étapes tardives de la maturation des phagosomes (*Lennon-Dumenil et al., 2002*). Cette observation corrèle bien avec l'accumulation tardive de la Cath S dans les phagosomes (*Garin et al., 2001*). Les autres protéases démontrent un pH optimum plus restreint limitant ainsi leur activité à des vésicules spécifiques de la voie endosomale. Claus et collègues ont démontré que la Cath H a une activité optimale à pH neutre, suggérant une activité au niveau des endosomes précoces (*Claus et al., 1998*). Comparativement aux Cath S et H, Cath B et L sont instables à pH neutre (*Quraishi et al., 1999; Turk et al., 1999*). La Cath D démontre, quant à elle, une activité optimale dans un milieu très acide (*Horikoshi et al., 1998*).

2.3.4 Régulation de l'activité des cathepsines par des inhibiteurs endogènes

Une fois activées, les cathepsines ont un grand potentiel hydrolytique qui permettent de réguler et d'éviter une activation inappropriée de certaines cathepsines. Deux groupes d'inhibiteurs endogènes ont été identifiés. Le premier inhibiteur est la protéine cystatine C de la famille des cystatines. La cystatine C est un inhibiteur naturel démontrant une grande spécificité envers les protéases cystéines incluant les Cath B, L et S (*Pierre et Mellman, 1998; Konduri et al., 2002; Vray et al., 2002*). La cystatine C est une protéine d'environ treize kilodaltons et agit en se liant de façon non-covalente et réversible dans le site actif des cathepsines. Pierre et Mellman ont démontré que le ratio de cystatine C et de Cath S dans les cellules dendritiques en développement régule l'expression du CHM de classe II à la surface des cellules (*Pierre et Mellman, 1998*). Le deuxième inhibiteur des cathepsines est l'isoforme p41 de la chaîne invariante Ii. L'isoforme p41 est formé par épissage alternatif de l'ARNm de Ii, générant un fragment

de 64 acides aminés. Bevec et collègues ont démontré que la p41 possède une grande spécificité d'inhibition envers la cathepsine L et peut aussi inhiber l'activité de la Cath H. Toutefois, la p41 n'a pas d'effet inhibiteur envers les Cath B, C et S. (Bevec *et al.*, 1996).

3. Mécanismes d'évasion des parasites

La phagocytose des microorganismes constitue une étape importante dans l'immunité innée et adaptative. Ce processus est très efficace dans la dégradation et dans l'exposition d'épitopes antigéniques par les cellules présentatrices d'antigènes. Cependant, au cours de l'évolution plusieurs microorganismes ont développé diverses stratégies afin d'échapper à leur destruction et de survivre dans un environnement hostile tel le phagolysosome. Ainsi, suite à leur internalisation, les pathogènes intracellulaires prennent contrôle du phagosome pour éviter leur dégradation, et le transforment en un milieu propice pour leur réplication. Au cours des dernières années, plusieurs études ont permis d'élucider et de mieux comprendre les diverses stratégies qu'utilisent certains pathogènes. Toutefois, il est difficile de décrire des modèles d'invasion car il semble y avoir autant de stratégies que de pathogènes. Ces pathogènes intracellulaires peuvent interférer à plusieurs niveaux incluant dans le contrôle de leur entrée dans les cellules, la modification, l'inhibition et l'évasion du phagosome et l'inhibition des réponses pro-inflammatoires (Meresse *et al.*, 1999; Duclos *et al.*, 2000; Sansonetti, 2001; Allen *et Allgood*, 2002; Ismail *et al.*, 2002).

3.1 *Trypanosoma cruzi*

Le protozoaire *Trypanosoma cruzi* est un pathogène intracellulaire unicellulaire qui infecte les mammifères. Chez l'humain, ce parasite cause la maladie de Chagas, (Engman *et Leon*, 2002). *T. cruzi* se présente sous quatre formes différentes au cours de son cycle de vie. Les formes épimastigotes et promastigotes sont observées chez l'insecte vecteur. Dans le sang des mammifères, il existe sous la forme trypomastigote, une forme extracellulaire flagellée mesurant environ 20 µm. Au cours de la phase chronique de la maladie, on le retrouve sous la forme amastigote, une forme non flagellée mesurant

environ 4 à 5 microns. *T. cruzi* est transmis par le contact des matières fécales des punaises du genre Triatome comme les *Triatoma infestans* avec une lésion sur la peau ou les muqueuses des yeux, du nez et de la bouche. Dans le corps, *T. cruzi* a la capacité d'infecter et de survivre dans différents types cellulaires.

Contrairement aux autres parasites, *T. cruzi* pénètre dans la cellule hôte en induisant le processus de réparation de la membrane plasmique de la cellule. Suivant l'attachement de la forme trypomastigote à la surface d'une cellule, le parasite induit un signal dépendant du calcium qui stimule la fusion des lysosomes au site d'attachement à la membrane plasmique pour former une vacuole (Tardieux et al., 1992; Rodriguez et al., 1997; Burleigh et Andrews, 1998; Reddy et al., 2001). En plus de l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, *T. cruzi* stimule une augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire, un événement qui semble être important pour l'invasion du parasite car un traitement avec des inhibiteurs de l'adénylyl cyclase diminue l'entrée des trypomastigotes (Rodriguez et al., 1999). Comparativement aux autres processus d'internalisation nécessitant la polymérisation de l'actine, Rodriguez et collègues ont démontré que la dépolymérisation des filaments d'actine favorisait l'entrée des *T. cruzi* (Rodriguez et al., 1997). L'acidification du milieu est une étape importante pour la sortie du parasite de sa vacuole, car l'augmentation du pH de la vacuole inhibe sa sortie (Ley et al., 1990). De plus, le pH acide favorise la sécrétion de la molécule TcTox (C9 cross-reactive protein) permettant la destruction de la vacuole et la sortie du parasite dans le cytoplasme (Andrews et Whitlow, 1989; Andrews et al., 1990; Ley et al., 1990). Ensuite, la différenciation des trypomastigotes en amastigotes, formes répliquatives du parasite, stimulée par le pH acide débute dans la vacuole et se termine dans le cytosol (Tomlinson et al., 1995). Éventuellement les cellules infectées sont détruites relâchant du même coup le parasite qui pourra infecter les cellules avoisinantes ou être ingéré par une punaise lors d'un repas sanguin.

Des études récentes suggèrent l'implication de plusieurs protéines de la voie endosomale notamment l'implication du domaine cytosolique de LAMP1 dans l'invasion de *T. cruzi* en favorisant la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique (Kima et

al., 2000). Récemment suite à des études utilisant des mutants dominant-négatifs des protéines dynamine, rab5 et 7, le groupe de Isola a proposé un nouveau modèle d'internalisation impliquant la voie des clathrines (*Wilkowsky et al.*, 2001 ; *Wilkowsky et al.*, 2002). Cependant, d'autres études devront être faites pour clarifier ce modèle.

3.2 Mycobactéries

Les mycobactéries sont des pathogènes intracellulaires facultatifs. Ils peuvent infecter différents types de cellules, mais ils infectent principalement les macrophages. Tout comme d'autres parasites intracellulaires, les mycobactéries ont la capacité de déjouer le système de défense de l'hôte et de survivre et de proliférer dans les macrophages. Ainsi, la survie de ces pathogènes dans les macrophages est possible grâce à divers mécanismes développés par les mycobactéries au cours de l'évolution.

Le mécanisme d'entrée des mycobactéries dans les macrophages n'est pas tout à fait clair, cependant plusieurs récepteurs du macrophage ont été impliqués incluant les récepteurs du complément CR1, CR3, et CR4, les récepteurs du mannose, les récepteurs des glucans, les récepteurs scavengers, les récepteurs Toll et les CD14 (*El-Etr et al.*, 2001). Parmi ces récepteurs, les récepteurs du complément semblent jouer un rôle important dans l'internalisation des mycobactéries. Une étude a démontré qu'une combinaison d'anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs CR1 et CR3, inhibe l'internalisation des mycobactéries à plus de 80% (*Melo et Stokes*, 2000). D'autre part, Gatfield et Pieters ont démontré que les molécules de cholestérol présentes dans la membrane plasmique étaient essentielles pour l'entrée des mycobactéries dans les macrophages, car la déplétion de la membrane plasmique en cholestérol inhibe l'internalisation des mycobactéries (*Gatfield et Pieters*, 2000).

Contrairement à *T. cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis* inhibe la fusion des phagosomes avec les lysosomes afin d'éviter que ce compartiment ne s'acidifie et n'acquière des hydrolases (*Armstrong et Hart*, 1975; *Via et al.*, 1997). Une étude effectuée par Via et collègues en 1997 (*Via et al.*, 1997) a permis de démontrer que les

phagosomes contenant des mycobactéries acquièrent et retiennent la protéine Rab5. De plus, Via et collègues ont noté que ces phagosomes ne recrutent pas Rab7, qui est impliquée dans la fusion membranaire des endosomes tardifs, comparativement aux phagosomes contenant des billes de latex. Rab5 et Rab7 sont des petites GTPases localisées respectivement aux endosomes précoces et tardifs et sont impliquées dans la régulation des fusions membranaires dans la voie endosomale (voir section 2.2.2). Ces résultats suggèrent donc que les mycobactéries interfèrent avec la régulation des éléments essentiels à la maturation du phagosome notamment les membres de la famille Rab. L'absence de Rab7 sur les phagosomes indique que les mycobactéries bloquent la maturation entre les étapes comprises entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs. Également, il a été noté que les phagosomes contenant des mycobactéries ne s'acidifient pas (*Crowle et al., 1991*). Le groupe de Russell a démontré que le pH des phagosomes contenant des mycobactéries ne descend pas plus bas que 6.3. Ce défaut d'acidification des phagosomes s'explique en partie par l'exclusion de la pompe à proton (*Sturgill-Koszycki et al., 1994*). Toutefois le mécanisme d'exclusion de la pompe à proton sur les phagosomes n'a pas encore été élucidé. De plus, l'inhibition de la maturation des phagosomes et le maintien des interactions entre les phagosomes et les endosomes précoces par les mycobactéries pourraient aussi expliquer le défaut d'acidification de ces phagosomes (*Via et al., 1997*). Récemment, l'analyse de la composition des phagosomes contenant des mycobactéries vivantes et tuées, ont permis d'identifier un membre de la famille des Coronines, (TACO; tryptophane aspartate-containing coat protein) et de démontrer son rôle important dans la survie des mycobactéries dans les macrophages (*Ferrari et al., 1999*). TACO demeure associée aux phagosomes contenant des mycobactéries vivantes plus de 12 heures comparativement à 2 heures pour les phagosomes contenant des mycobactéries tuées. Ainsi Ferrari et collègues ont proposé que la rétention de TACO aux phagosomes par les mycobactéries vivantes pourrait être un mécanisme empêchant les interactions de ces phagosomes avec les lysosomes (*Ferrari et al., 1999*).

3.3 *Leishmania*

Tout comme *T.cruzi*, les *Leishmania* sont des parasites protozoaires unicellulaires de la famille des Trypanosomatidées. *Leishmania* a la capacité de survivre et de proliférer dans les macrophages grâce à diverses stratégies qui lui permet d'éviter l'environnement hostile des phagolysosomes (Turco et Descoteaux, 1992). Les parasites du genre *Leishmania* sont transmis par les moustiques du genre *Phlebotomus* et *Lutzomyia*. Ce parasite alterne entre deux formes, le promastigote et l'amastigote, au cours de son cycle de vie. Le promastigote, que l'on retrouve dans le tractus digestif du moustique, est caractérisé par sa forme allongée et la présence d'un flagelle. L'amastigote est de forme arrondie, sans flagelle et est retrouvé dans les macrophages des mammifères infectés. Les amastigotes ont la particularité de résister et proliférer dans le milieu acide des phagolysosomes.

3.3.1 Les promastigotes de *Leishmania*

Suite à leur inoculation dans les mammifères, les promastigotes pénètrent les macrophages de façon silencieuse grâce entre autres aux récepteurs du complément (Alexander et Russell, 1992; Mosser et al., 1992). L'entrée par les récepteurs du complément n'induit pas de réponses inflammatoires. Contrairement aux amastigotes, les promastigotes ne sont pas adaptés aux conditions du phagolysosomes, car ils sont sensibles au milieu acide et hydrolytique. Afin de survivre à la phagocytose, les promastigotes possèdent divers mécanismes incluant l'expression d'un glycolipide, le lipophosphoglycan (LPG), recouvrant entièrement sa surface. Il a été démontré que le LPG inhibe la maturation du phagosome en bloquant la fusion entre les phagosomes et les compartiments endosomaux (Desjardins et Descoteaux, 1997; Dermine et al., 2000). Cependant, le mécanisme d'action par lequel le LPG altère la maturation du phagosome n'a pas encore été complètement élucidé. Dans le phagosome, le LPG est transféré de la surface du parasite à la membrane interne du phagosome. L'insertion du LPG dans la couche interne de la membrane du phagosome altère ses propriétés biophysiques influençant ainsi sa capacité à fusionner (Tolson et al., 1990; Miao et al., 1995). De plus,

il y a une accumulation des filaments d'actine LPG-dépendante autour du phagosome qui potentiellement crée une barrière physique limitant du même coup les interactions du phagosome avec les compartiments endosomaux (Holm et al., 2001). Également, Scianimanico a démontré que les phagosomes contenant des promastigotes de *L. donovani* n'acquièrent pas la GTPase Rab7 qui est impliquée dans la fusion des phagosomes avec les endosomes tardifs (Scianimanico et al., 1999). Ainsi, il a été suggéré que cette inhibition de la maturation des phagosomes favorise l'enclenchement du processus de différenciation des promastigotes en amastigotes. Le LPG a aussi plusieurs autres propriétés incluant l'altération des voies de signalisation (Descoteaux et Turco, 2002). Descoteaux et collègues ont démontré que le LPG de *L. donovani* inhibe l'activité de la protéine kinase C (PKC), une protéine importante dans les fonctions du macrophage (Descoteaux et al., 1992). Récemment, il a été observé que la présence de LPG est associée à une exclusion de l'isoenzyme PKC- α du phagosome (Holm et al., 2001). Une étude effectuée par St-Denis et collaborateur démontre que la PKC- α joue un rôle important dans le contrôle de la réplication de pathogènes intracellulaires notamment *L. donovani* et *Legionella pneumophila* (St-Denis et al., 1999). Ceci suggère donc que l'inhibition de PKC- α pourrait être une stratégie utilisée par le parasite *Leishmania* pour échapper à la destruction lors de la phagocytose. Ainsi, le LPG présent à la surface des promastigotes joue un rôle essentiel dans l'établissement du parasite dans le macrophage.

3.3.2 Les amastigotes de *Leishmania*

La différenciation des promastigotes en amastigotes est une étape essentielle pour l'établissement de l'infection dans le macrophage. Cependant, les mécanismes impliqués dans la transformation ainsi que les mécanismes permettant la survie des amastigotes dans les phagolysosomes sont encore très peu connus. En plus de la transformation morphologique, plusieurs changements moléculaires ont été observés (Courret et al., 2001; El Fakhry et al., 2002). L'expression du LPG est fortement diminuée voire même indétectable à la surface des amastigotes (McConville et Blackwell, 1991; Turco et Sacks, 1991). Par contre, l'expression des GPIs (glycosylinositol phospholipids) n'est pas altérée. Ces glycolipides constituent ainsi les plus abondants glycoconjugués à la surface

des amastigotes. Tout comme le LPG, les GIPLs ont aussi la capacité d'inhiber l'activité de PKC. Cependant leur mécanisme d'action semble être différent (*McNeely et al., 1989*). Un des facteurs de virulence qui permet la survie intracellulaire de *Leishmania* est la protéine A2 exprimée exclusivement chez la forme amastigote (*Charest et Matlashewski, 1994; Zhang et al., 1996*). L'inhibition de l'expression de la protéine A2 diminue fortement la capacité de *Leishmania* à survivre dans les macrophages (*Zhang et Matlashewski, 1997*). Plus récemment, la protéine HSP 100 a été impliquée dans la virulence des amastigotes (*Clos et al., 2001*). D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la virulence des diverses espèces de *Leishmania*.

4. Protéine Kinase C (PKC)

Les cascades de signalisation sont des processus très importants afin d'amplifier un signal et d'induire rapidement des réponses cellulaires. Ces processus mettent en jeu plusieurs protéines de signalisation faisant souvent partie de familles composées de plusieurs isoenzymes. Parmi ces protéines de signalisation, on retrouve la protéine kinase C (PKC). PKC est une famille très conservée de protéine sérine/thréonine kinases constituée de 11 membres (Figure F). Ces membres sont divisés en trois groupes ayant en commun des besoins en activateurs et co-activateurs; les PKC classiques ou conventionnelles, (cPKC), les PKC nouvelles (nPKC) et les PKC atypiques (aPKC) (*Nishizuka, 1995*). La structure générale de PKC consiste en un domaine catalytique et un domaine régulateur situés respectivement dans la région C-terminale et la région N-terminale de la protéine. Ces domaines sont constitués de quatre régions conservées (C1-C4) et chacune de ces régions est séparée par des domaines variables (V1-V5). Le domaine C1 contient deux régions riches en résidus cystéine en tandem et constitue le site de liaison du DAG (diacylglycerol), de la phosphatidylsérine (PS) et du phorbol ester. De plus, le domaine C1 est précédé d'une séquence pseudo-substrat auto-inhibitrice liant le site catalytique au repos (*House et Kemp, 1987*). Le domaine C2 des cPKC est nécessaire pour la liaison du calcium. Les domaines C3 et C4 constituent le domaine catalytique pouvant phosphoryler les résidus sérine/thréonine. Ainsi grâce à ces domaines C1 et C2,

les cPKC sont activées par le DAG, la PS et le Ca^{2+} . Contrairement aux cPKC, les nPKC ne possèdent pas le domaine C2, rendant leur activité indépendante du Ca^{2+} . Les isoenzymes des nPKC ne nécessitent donc que le DAG pour être activés. Quant aux aPKC, elles ne possèdent pas de domaine liant le Ca^{2+} et ne contiennent qu'un seul motif riche en résidus cystéine. Ainsi, le groupe des aPKC est indépendante du Ca^{2+} et peut être activé par divers phospholipides (Nishizuka, 1992; Newton, 1995; Nishizuka, 1995; Mochly-Rosen et Kauvar, 2000).

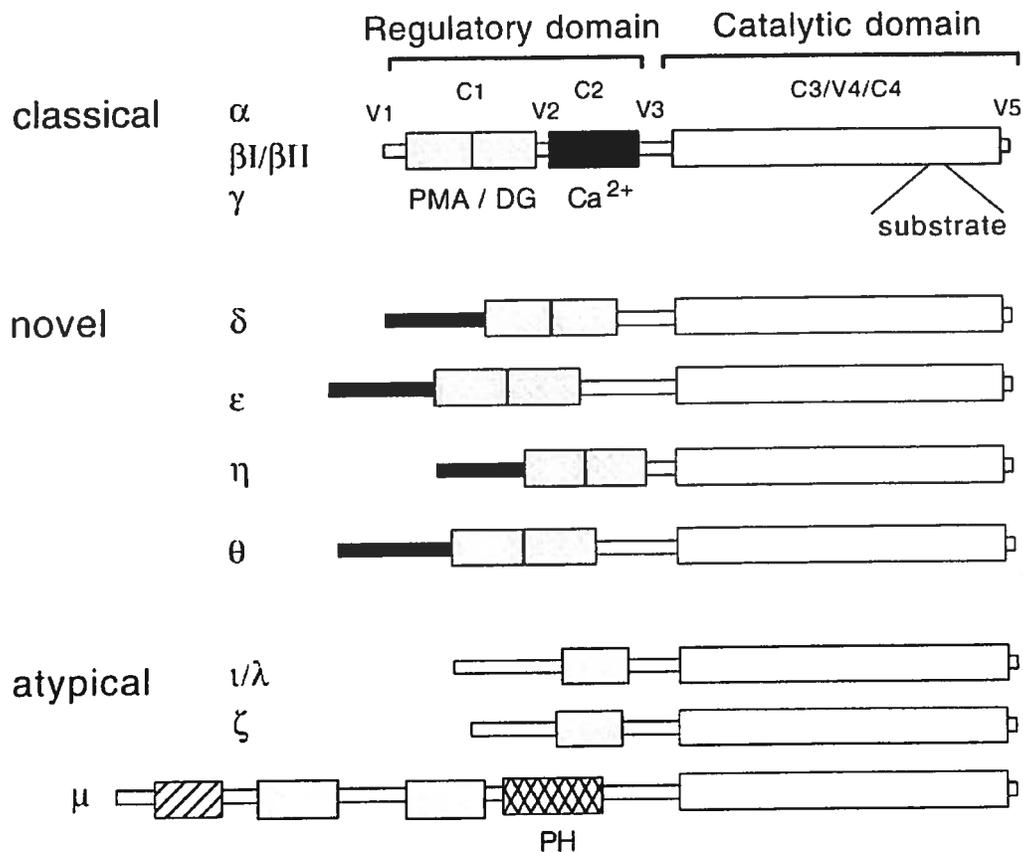


Figure F. La famille de protéines kinases C
(Mochly-Rosen et Kauvar, 2000)

4.1 PKC et les protéines associées

La protéine kinase C joue un rôle central dans la régulation de diverses réponses cellulaires. Il n'est pas surprenant de constater que la PKC est exprimée dans tous les types cellulaires (*Webb et al., 2000*). Cependant, les isoenzymes ont des distributions distinctes et des fonctions spécifiques dans les tissus. Jusqu'à présent, les informations sur les rôles de chaque isoenzyme sont encore limitées. Toutefois, la spécificité de ces isoenzymes ne semble pas résider sur la reconnaissance spécifique d'un motif peptidique (*Nishikawa et al., 1997*), mais repose plutôt sur leurs distributions distinctes. De plus, cette distribution semble impliquer plusieurs protéines adaptatrices interagissant spécifiquement avec les PKC, surnommées collectivement RACK (receptors for activated C- kinase) et STICK (Substrates that interact with C- Kinase) (*Jaken et Parker, 2000; Schechtman et Mochly-Rosen, 2001*). Ces protéines ont pour rôles notamment de diriger les différents isoenzymes de la PKC vers des localisations subcellulaires spécifiques suivant l'activation d'une voie de signalisation donnée par un récepteur donné. Ainsi, ces protéines permettent l'activation de PKC à proximité de leurs substrats et d'éviter des phosphorylations inappropriées. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et les composants faisant partie de ces groupes de protéines.

4.2 PKC dans la phagocytose

Au niveau du système immunitaire, PKC joue un rôle important notamment dans les réponses inflammatoires induites par le LPS (*Fujihara et al., 1994; Shapira et al., 1994; Chen et al., 1998; St-Denis et al., 1998; Giroux et Descoteaux, 2000; Chano et Descoteaux, 2002*) et dans les processus d'internalisation des particules chez les macrophages. Chez les macrophages, on retrouve six isoformes incluant PKC- α , - β I, - β II, - ϵ , - ζ et - δ . Plusieurs études ont rapporté l'implication de PKC dans la phagocytose déclenchée par des récepteurs de macrophages incluant les récepteurs Fc γ , les récepteurs du complément et les récepteurs mannose (*Zheleznyak et Brown, 1992; Zheng et al., 1995; Allen et Aderem, 1995b; Melendez et al., 1999; Breton et Descoteaux, 2000;*

Larsen et al., 2000; Holm et al., 2001; Larsen et al., 2002). Allen et Aderem ont observé l'accumulation de PKC ainsi qu'un de ces substrats, MARCKS (myristoylated alanine rich c kinase substrate) à la coupe phagocytaire au cours de la phagocytose induite par les récepteurs Fcγ et CR. En plus d'être recrutée au phagosome, il a été démontré que PKC-α était aussi sous sa forme activée (Allen et Aderem, 1995a). De plus, les inhibiteurs de PKC inhibent la phagocytose induite par les récepteurs du complément et les récepteurs Fc. Également, l'utilisation d'un mutant dominant-négatif de PKC-α a permis de confirmer l'implication de l'isoenzyme PKC-α dans l'internalisation médiée par les récepteurs Fc (Breton et Descoteaux, 2000). Récemment, Allen et Allgood ont démontré que les PKC atypiques étaient importantes pour l'internalisation de la bactérie *Helicobacter pylori* par les BMM (bone marrow-derived macrophages) murins. Il a été proposé qu'une nouvelle voie de phagocytose possiblement régulée par PKC -ζ soit impliquée et que cette voie serait indépendante des cPKC (Allen et Allgood, 2002). Cependant le mécanisme impliquant PKC -ζ n'est pas encore connu, mais il semble qu'un réarrangement de l'actine régulé par la PI 3-K serait impliqué dans ce processus d'internalisation de *H. pylori* (Allen et Allgood, 2002; Kwok et al., 2002).

4.3 PKC dans la régulation de la maturation du phagosome

En plus de son rôle dans la phagocytose, plusieurs résultats impliquent PKC dans la maturation du phagosome notamment dans la régulation de plusieurs protéines associées au phagosome. Il a été observé que PKC-α et MARCKS demeurent associées à la membrane des phagosomes même après la dépolymérisation des filaments d'actine suggérant leur implication dans la maturation du phagosome (Allen et Aderem, 1995a). MARCKS est une protéine membranaire associée à l'actine et sa phosphorylation par PKC induit sa translocation vers les lysosomes (Allen et Aderem, 1995b). Étant donné que MARCKS est impliqué dans le trafic membranaire associé à l'actine, il a été suggéré que MARCKS puisse jouer un rôle dans le mouvement des phagosomes et des lysosomes lors de la maturation du phagosome (Rosen et al., 1990; Allen et Aderem, 1995b). Ainsi, la régulation de MARCKS par la phosphorylation

dépendante de PKC pourrait être un événement important dans le processus de maturation. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Également, une étude effectuée récemment par Itoh et collègues a permis de démontrer que la dissociation de la protéine p57 du phagosome suite à sa phosphorylation par les isoenzymes PKC- α et - β est nécessaire pour la fusion du phagosome avec les lysosomes (Itoh *et al.*, 2002). La protéine p57, une protéine associée à l'actine, fait partie de la famille des coronines. Il a été observé que l'inhibition de PKC par l'inhibiteur chelerythrine inhibe la dissociation de p57 ainsi que la dissociation de l'actine du phagosome. De plus, l'association du marqueur lysosomal LAMP-1 au phagosome est aussi inhibée par la chelerythrine. Ainsi, ces observations suggèrent que la régulation de p57 par PKC est un événement essentiel pour la fusion des phagosomes avec les lysosomes.

-----//-----

Ainsi, les membres de la famille des PKC sont des éléments importants dans le processus de phagocytose induit notamment par les récepteurs Fc, les récepteurs du complément et les récepteurs mannoses. De plus, plusieurs observations suggèrent leur implication dans la maturation du phagosome. Cependant, malgré les progrès de ces dernières années dans la compréhension du rôle de PKC dans le processus de maturation du phagosome, l'implication de l'isoenzyme PKC- α dans ce mécanisme est encore obscure. Ainsi, l'objectif principal de ce projet est de mieux comprendre le rôle de PKC- α dans la régulation de la maturation du phagosome. Afin d'y parvenir, nous avons opté pour une approche protéomique permettant la comparaison du patron protéique des phagosomes contenant des billes de latex isolés de macrophages de type sauvage et de macrophages exprimant un mutant dominant-négatif de PKC- α . L'utilisation de billes de latex est une approche couramment utilisée notamment pour sa simplicité et sa pureté des échantillons. De plus, les phagosomes contenant des billes de latex démontrent des propriétés fonctionnelles normales. Cette approche nous permettra éventuellement d'étudier le processus de maturation du phagosome suite à la liaison via les divers récepteurs de la phagocytose notamment par l'opsonisation des billes avec des immunoglobulines ou du complément.

Article

Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C- α in phagosome maturation*

John Derek Ng Yan Hing[‡], Michel Desjardins[¶], and Albert Descoteaux^{‡§}

[‡] INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada, H7V 1B7;

[¶] Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7

§ Address correspondence to:

Albert Descoteaux
INRS- Institut Armand-Frappier
Université du Québec
531 boul. des Prairies
Laval, QC
Canada H7V 1B7
tel: 450-687-5010 ext 4465
Fax: 450-686-5301
Email: albert.descoteaux@inrs-iaf.quebec.ca

SUMMARY

Acquisition of microbicidal properties by phagosomes requires the action of molecules which regulate the interactions between the phagosomes and the endocytic organelles. Members of the protein kinase C (PKC) superfamily of serine/threonine kinases are recruited to the phagosome with various kinetics during phagolysosome biogenesis. To study the role of PKC- α in this process, we compared the composition of latex bead-containing phagosomes isolated from control and dominant-negative (DN) PKC- α -overexpressing RAW 264.7 macrophages. Western blot analysis indicated that the levels of both lysosomal-associated membrane protein-1 and flotillin-1, which are acquired through interactions with late endosomes and lysosomes, are reduced in phagosomes from DN PKC- α -overexpressing macrophages. Proteomic characterization of latex bead-containing phagosomes revealed that recruitment of the small GTPase Rab7, cathepsin D, and cathepsin S is impaired in DN PKC- α -overexpressing cells. Collectively, these data provide evidence that PKC- α plays a role in phagolysosome biogenesis, a critical process of the innate immune response against infections.

¹ The abbreviations used are: PKC, protein kinase C; DN, dominant-negative; PBS, phosphate-buffered saline; LAMP, lysosomal-associated membrane protein.

INTRODUCTION

Professional phagocytes play a key role in host defence against infection, by virtue of their ability to internalize and degrade invading microorganisms (1). Phagocytosis is initiated by the binding of a particle to specialized surface receptors, triggering a reorganization of the cytoskeleton and polymerization of actin at the site of contact. These events lead to the engulfment of the particle into a vacuole, the phagosome, which does not possess the capability to kill and degrade microorganisms. To acquire microbicidal properties, the phagosome must engage in a maturation process involving highly regulated sequential interactions with early endosomes, late endosomes, and lysosomes (2-7). These interactions are transient in nature and are characterized by the formation of small fusion pores between the two organelles, allowing the exchange of membrane and contents (2). This leads to the acidification of the phagosome and the acquisition of an array of hydrolases, culminating in the generation of a microbicidal environment.

Phagolysosome biogenesis requires the action of molecules which regulate the interactions between the phagosome and the cytoskeleton, as well as the early, late and recycling endocytic compartments. These molecules include the SNAREs and regulatory small GTPases such as Rab5, Rab7 and ARF6 (7). In addition, several signaling molecules, including members of protein kinase C (PKC¹) superfamily of protein serine/threonine kinases (8,9), are activated during phagocytosis and associate to the phagosome with various kinetics during the maturation process (10-16). Although the exact role of phagosome-associated PKC isoenzymes remains to be shown, they are believed to participate in the regulation of phagolysosome biogenesis (1,17). Recently, Itoh and colleagues reported that dissociation from the phagosomal membrane of the PKC substrate p57, a coronin family actin-binding protein, is dependent on PKC-mediated phosphorylation and is a necessary step for phagosome maturation (18).

To further investigate the contribution of PKC- α in the regulation of phagolysosome biogenesis, we took a proteomic approach (19) to compare the composition of latex bead-containing phagosomes isolated from control RAW 264.7 mouse macrophages and from clones of this cell line overexpressing a dominant-negative, kinase-dead mutant of PKC- α (20). Latex bead-containing phagosomes represent a well-established system to study phagolysosome biogenesis based on several considerations, including the ease of isolation, absence of major contaminants from other organelles, and characteristics of a microbicidal environment (such as the presence of hydrolases) (2,19,21-23). Our data provide evidence that PKC- α participates in the regulation of phagolysosome biogenesis in macrophages.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell lines. The murine macrophage cell line RAW 264.7 transfected with the expression vector pCIN-4, and the DN PKC- α -overexpressing clones A2 and C2 (20) were cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in complete medium [Dulbecco's modified Eagle's medium with glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT), 10 mM HEPES pH 7.3, and antibiotics] supplemented with 500 μ g/ml G418 (Life Technologies Inc.).

Antibodies. Rabbit anti-PKC- α polyclonal antibodies and goat anti-cathepsin S polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), rabbit anti-cathepsin D polyclonal antibodies was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Rabbit anti-flotillin-1 and anti-Rab 7 polyclonal antibodies and rat anti-LAMP1 antibodies were as previously described (19,24). Peroxidase-conjugated anti-rabbit antiserum was from Amersham Life Science (Baie D'Urfée, QC, Canada), peroxidase-conjugated anti-rat antiserum was from Sigma (St. Louis, Missouri, USA) and peroxidase-conjugated anti-goat antiserum was from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (Mississauga, ON, Canada).

Phagosomes preparation and isolation. Adherent macrophages (5×10^7 per 150 x 20 mm tissue culture dishes) were incubated with latex beads (0.8 μ m diameter, 10% suspension, blue dyed; Sigma) diluted 1:25 in 10 ml complete medium at 37° C for 90 min. Cells were then washed three times in cold PBS at 4° C, followed by a chase period of 60 min in medium without beads at 37° C. After the chase period, the cells were washed three times in cold PBS at 4° C and scraped with a rubber policeman in cold PBS. Cells were pelleted in homogenization buffer (8.5% sucrose) and homogenized on ice in a syringe with a 22G1/2 needle. Unbroken cells were pelleted in a 15 ml Falcon tube at 1200 rpm for 5 min at 4°C and the supernatant containing the phagosomes was brought to 40% sucrose by adding an equal volume of a 62% sucrose solution. This 40% sucrose supernatant was loaded on top of a 3 ml cushion of 62% sucrose, followed by the addition of 2 ml of 35% sucrose, 2 ml of 25% sucrose, and 2 ml of 10% sucrose solutions. All

sucrose solutions contained protease inhibitors. Centrifugation was done at 4°C in a swinging bucket rotor (SW41; Beckman Instruments) for 1h at 100 000 g. The phagosome band was collected from the interface of the 10% and 25% sucrose solutions and resuspended in 12 ml cold PBS containing protease inhibitors. The phagosomes were pelleted at 4°C by a 15 min centrifugation at 40 000 g in a SW41 rotor (21).

Two-dimensional gel electrophoresis. Phagosomes were resuspended and lysed in the 2-D lysis buffer/rehydration buffer (8M urea, 2M thiourea, 4% w/v CHAPS, 40 mM DTE, 20 mM Tris, 2% IPG buffer, trace of bromophenol blue) by vortexing during 1h. Two-dimensional gel electrophoresis analyses of phagosomal proteins from control and DN-PKC- α -overexpressing macrophages were performed in parallel. The proteins were first separated according to their isoelectric points on 7-cm linear immobilized pH-gradient strips (Amersham Pharmacia Biotech). After the first-dimension, the strips were equilibrated in a SDS equilibration buffer (6M Urea, 2% SDS, 30% glycerol, 0.1M Tris-HCl, pH 8.8) containing 13 mM DTE for 10 min and then in a solution containing 2.5% iodoacetamide for 5 min. The proteins were then separated according to their molecular masses in a 12% SDS-PAGE. The gels were silver-stained, scanned, and the protein patterns were analyzed with the Image Master 2D software (Amersham-Pharmacia Biotech). For mass spectrometry analyses, 24-cm linear immobilized pH gradient strips were used. The gels were silver-stained, the spots of interest were extracted from the gel and the samples were analyzed by MALDI-TOF at the McGill University Proteomic Service (Montréal, QC, Canada).

Western Blot analyses. Phagosomes were resuspended in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X100) containing protease and phosphatase inhibitors. Cells were also lysed on ice in lysis buffer. Five μ g of phagosomal proteins and 15 μ g of total cell lysates were separated on a 10% SDS-PAGE. The gels were electroblotted onto Hybond-ECL membranes (Amersham Life Science), and immunodetection was achieved by chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science).

RESULTS

DN PKC- α impairs the recruitment of lysosomal markers LAMP-1 and flotillin-1 to phagosomes. Previous immunofluorescence studies revealed that PKC- α localizes to the phagocytic cup and remains associated to the phagosome membrane throughout its maturation process, thereby raising the hypothesis that PKC- α plays a role in the regulation of phagosome maturation (17). To address this issue, we compared the composition of latex bead-containing phagosomes isolated from vector-transfected (control) RAW 264.7 mouse macrophages and from clones of this cell line overexpressing a kinase-dead (DN) mutant of PKC- α (20). In addition to their ease of isolation, latex bead-containing phagosomes are devoid of major contaminants from other organelles, and possess the characteristics of a microbicidal environment (19,23).

Western blot analysis showed that in control cells, PKC- α is present on 1 h-old latex bead-containing phagosomes (Fig. 1A) but is barely detectable on 24 h-old phagosomes (Fig. 1B). As expected, there was an increased level of immunoreactive PKC- α in phagosome preparations isolated from DN PKC- α -overexpressing macrophages (Fig. 1A and B, lanes 2-3) with respect to control macrophages (Fig. 1A and B, lane 1), and this correlates with the levels of immunoreactive PKC- α present in total cell lysates. We next determined by Western blot analysis the levels of LAMP-1 and flotillin-1 associated to latex bead-containing phagosomes isolated from control and DN PKC- α -overexpressing cells. As shown on Figure 2, a substantial decrease in the association of both LAMP-1 and flotillin-1 to phagosomes from DN PKC- α -overexpressing macrophages was observed, at both 1 h and 24 h after phagocytosis (Fig. 2A and 2B). Since these two proteins are primarily associated to lysosomes and are acquired by maturing phagolysosomes (19,24), these results suggest that PKC- α is involved in the regulation of phagosome maturation.

DN PKC- α alters the proteomic pattern of phagosomes. To further investigate the role of PKC- α in phagosome maturation, we used the proteomic approach described by Garin and colleagues (19) to compare the composition of 1 h-old latex bead-phagosomes formed in control and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 macrophages. Following phagosome isolation on sucrose gradients, proteins were first separated according to their isoelectric point on immobilized pH gradients 4-7, followed by standard SDS-PAGE (19). Protein patterns obtained with latex bead-containing phagosomes from control and DN PKC- α -overexpressing macrophages were compared using the Image Master 2D software. Remarkably, the proteomic content of both types of phagosomes were very similar (Fig. 3A and B). We identified three regions of the 2-D gels (Fig. 3A, B, C, regions 1, 2, and 3) where proteins from phagosomes isolated from DN PKC- α -overexpressing macrophages were significantly down-regulated. Importantly, the proteins from these three regions were consistently down-regulated in latex bead-containing phagosomes isolated from three independent DN PKC- α -overexpressing clones (data not shown). To identify these proteins, we first compared the protein patterns of our 2-D gels to the comprehensive phagosome protein 2-D gel map recently generated by Garin and colleagues (19). This map allowed us to determine that the spots in region 1 of Fig. 3A and B corresponded to the lysosomal aspartic protease pro-cathepsin D (19). However, we were unable to identify the proteins of interest in regions 2 and 3 based on the phagosome protein 2-D gel map. To identify these proteins, the spots were excised from the 2-D gels and analyzed by mass spectrometry. Spots from region 1 were also included in this analysis which confirmed the identity of lysosomal aspartic protease pro-cathepsin D (Table 1). Consistently, spots 29 and 31 from region 2 were identified as the mature form of cathepsin D, whereas spots 38 and 41 from region 3 were identified as the lysosomal cysteine protease cathepsin S and the small GTPase Rab 7, respectively (Table 1). These findings indicate that DN PKC- α influences phagosome composition, further supporting a role for PKC- α in the modulation of phagolysosome biogenesis.

Downregulation of cathepsin D, cathepsin S, and Rab7 in phagosome isolated from DN PKC- α -overexpressing macrophages. To confirm the mass spectrometry data, we compared by Western blot analyses the levels of cathepsin D, cathepsin S, and Rab7 on 1 h- and 24 h-old latex bead-containing phagosomes isolated from control and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 macrophages. Consistent with the data obtained by 2-D gel analysis, levels of cathepsin D, cathepsin S, and Rab7 decreased significantly in 1 h-old latex bead-containing phagosomes isolated from DN PKC- α -overexpressing macrophages (clones A2 and C2) with respect to latex bead-containing phagosomes isolated from control macrophages (Fig. 4). The decrease in the levels of cathepsins D and S was also observed in 24 h-old latex bead-containing phagosomes (Fig. 4). Of note, cathepsin S levels were also reduced in total cell lysates prepared from both DN PKC- α -overexpressing clones, thereby raising the possibility that PKC- α regulates cathepsin S levels in RAW 264.7 macrophages.

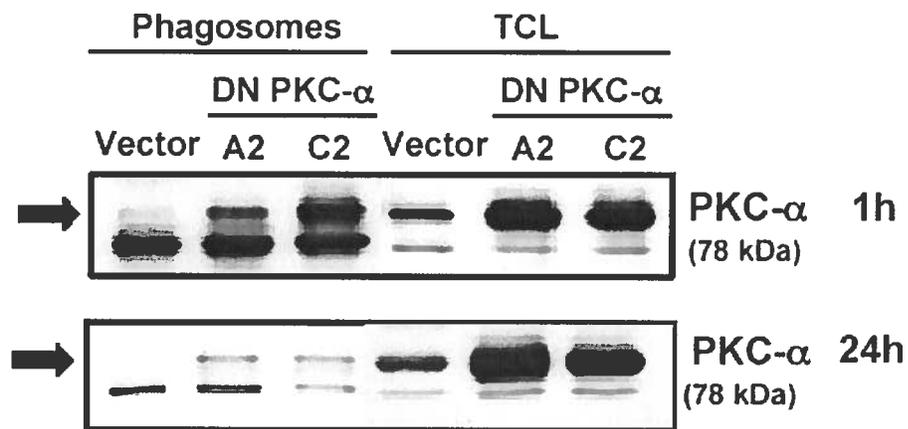


Figure 1. PKC- α associates to latex bead-containing phagosomes isolated from RAW 264.7 cells. Latex beads were internalized by control RAW 264.7 cells and DN PKC- α -overexpressing clones (A2 and C2) for 90 min, followed by either a 1 h or a 24 h chase period. After cell homogenization, phagosomes were isolated on sucrose gradients. Western blot analysis was performed on phagosomes and total cell lysate (TCL). Similar results were obtained in at least three separate experiments.

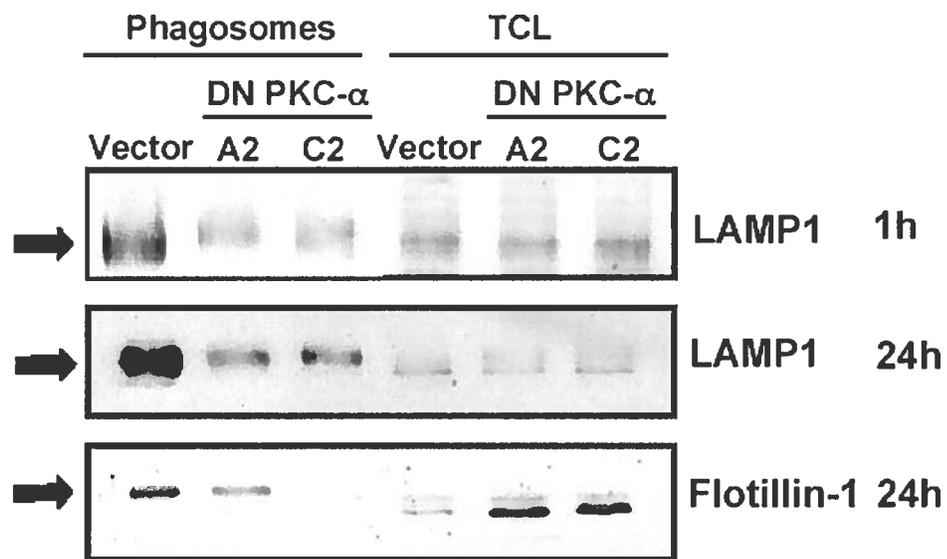


Figure 2. DN PKC- α impairs the recruitment of lysosomal proteins LAMP1 and flotillin-1 to latex bead-containing phagosomes. Latex beads were internalized by control RAW 264.7 cells and DN PKC- α -overexpressing clones (A2 and C2) for 90 min, followed by either a 1 h or a 24 h chase period. Cells were homogenized and phagosomes were isolated on a sucrose gradient. The presence of LAMP1 and flotillin-1 was determined in phagosomes and in total cell lysates (TCL) by Western blot. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

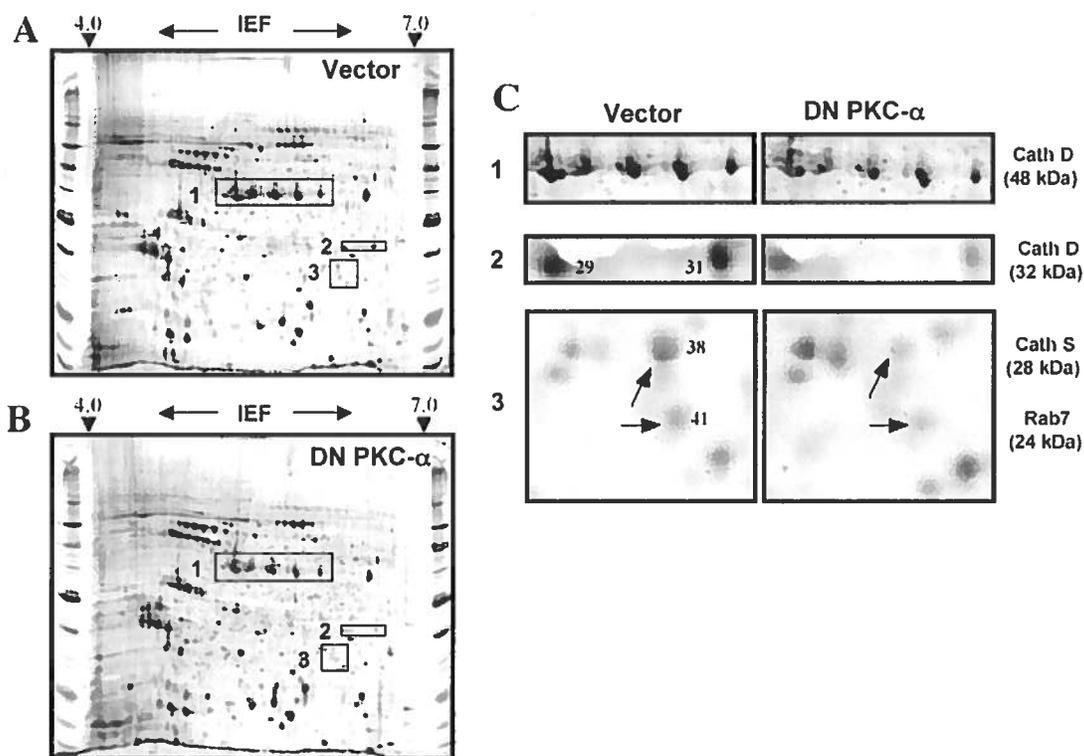


Figure 3. DN PKC- α influences the phagosome proteome in RAW 264.7 macrophages. Latex beads were internalized by control RAW 264.7 cells and DN PKC- α -overexpressing cells (clone C2) for 90 min, followed by a 1 h chase period. Phagosomes were isolated and two-dimensional gel electrophoresis was performed with immobilized pH gradients (4-7) in the first dimension and SDS-PAGE (12%) in the second dimension. Phagosome protein 2-D gels from (A) control macrophages (vector) and (B) DN PKC- α -overexpressing macrophages (clone C2) were silver-stained. (C) Proteins from boxes 1 to 3 were reproducibly down-regulated in latex bead-containing phagosomes isolated from three independent DN PKC- α -overexpressing macrophages (data obtained with clone C2 are shown here). Similar results were obtained in at least three separate experiments.

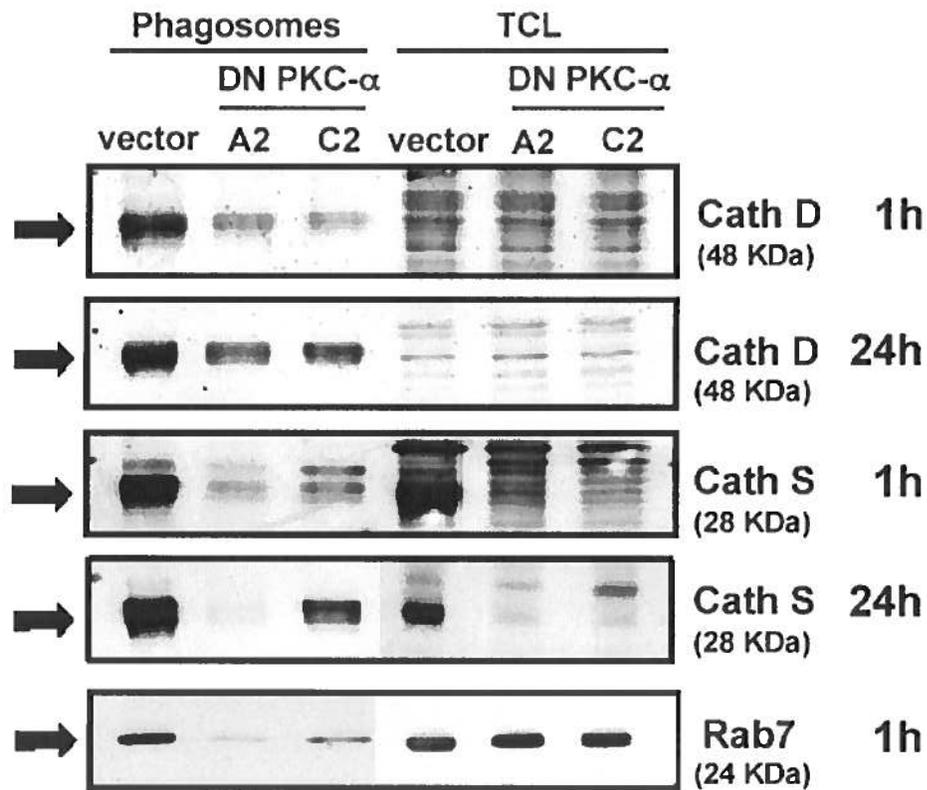


Figure 4. Impaired recruitment of cathepsin D, cathepsin S and Rab 7 in latex bead-containing phagosomes isolated from DN PKC- α -overexpressing macrophages. Latex beads were internalized by control RAW 264.7 cells and DN PKC- α -overexpressing clones (A2 and C2) for 90 min, followed by either a 1 h or a 24 h chase period. Cells were homogenized and phagosomes were isolated on a sucrose gradient. The presence of cathepsins D and S, and Rab7 was determined in phagosomes and total cell lysates (TCL) by Western blot analysis. Similar results were obtained in at least three separate experiments.

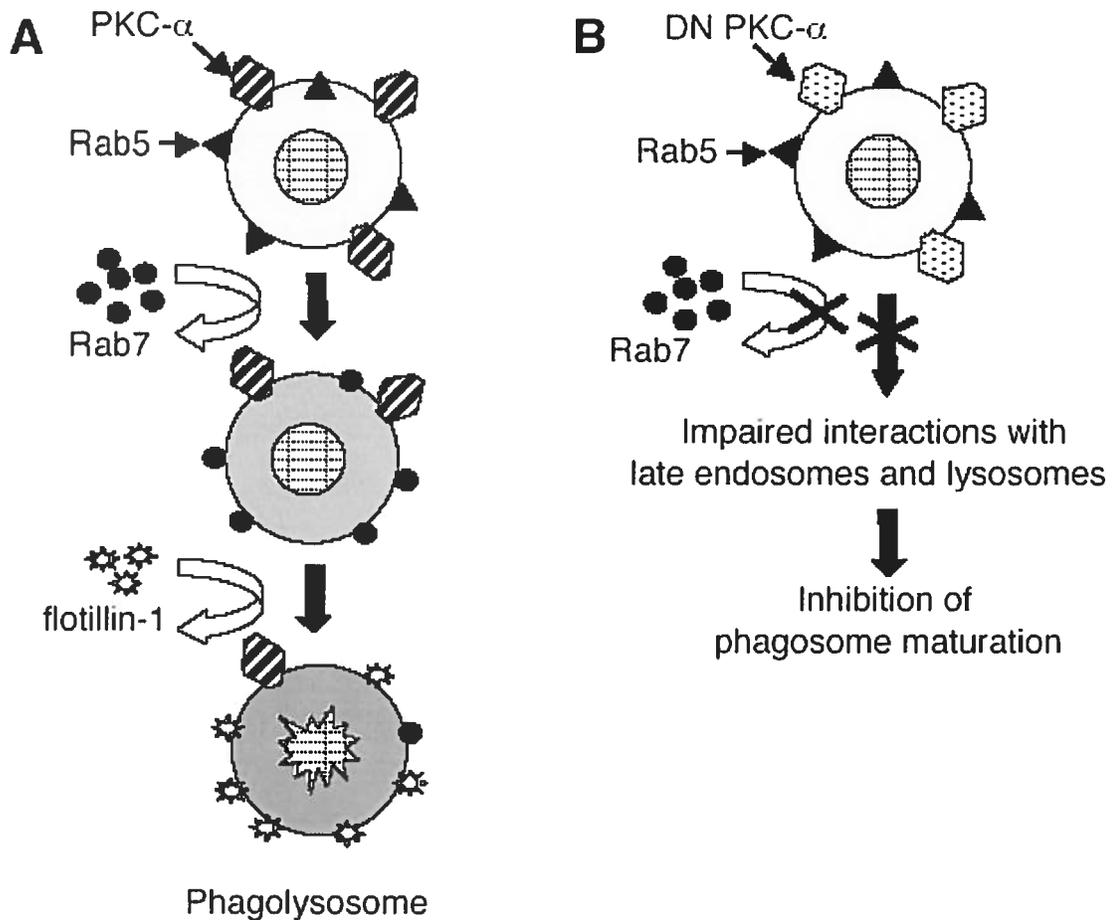


Figure 5. Proposed model for the role of PKC- α in phagosome maturation. Newly formed phagosomes mature into acidic and hydrolases-rich compartments known as phagolysosomes. During the maturation process, phagosomes interact with endocytic organelles by transient fusion and fission events and sequentially acquire key regulatory molecules such as Rab5 and Rab7, various hydrolases, and features of late endosomes and lysosomes such as LAMP1 and flotillin-1 (A). In contrast, phagosomes from DN PKC- α -overexpressing macrophages fail to acquire Rab7 and to undergo the maturation process (B).

Table 1

Spots	Accession number	Protein s	Theoretical pI	(a) Kda	Observed pI	kDa	Score (b)
A, B	P18242	Cathepsin D [Mus musculus]	MF	44,9	MF	MF	(c)
38	O70370	Cathepsin S [Mus musculus]	6,1	24,9	6,3	21,6	440
41	P51150	RAB7 [Mus musculus]	7,5	24,0	6,3	20,7	560

a) Values were obtained from SWISS-PROT

b) Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores > 33 indicate identity or

extensive homology ($p < 0.05$)

c) The minimum score is 371

MF: multiple forms. Observed pI and MW values were determined by IMAGE MASTER 2D software. Analysis was performed in Mascot search.

DISCUSSION

Six PKC isoenzymes are expressed in macrophages and their respective contribution in the regulation of phagocytosis has been investigated (10,12-16). The previous observation by immunofluorescence that PKC- α is recruited to and retained on the phagosome throughout the maturation process suggested that this isoenzyme participates in the regulation of phagosome maturation (17). To verify this hypothesis, we have undertaken a comparative proteomic analysis of latex bead-containing phagosomes isolated from control and DN PKC- α -overexpressing macrophages. Our main finding was that overexpression of DN PKC- α impaired recruitment to the phagosome of the small GTPase Rab7, the lysosomal markers LAMP1 and flotillin, as well as the lysosomal proteases cathepsin D and cathepsin S, thereby providing evidence that PKC- α participates in the regulation of phagolysosome biogenesis.

Previous work from our laboratory indicated a role for PKC- α in the regulation of innate macrophage functions involved in the control of infection by intracellular parasites (25). Hence, overexpression of DN PKC- α in RAW 264.76 macrophages markedly enhanced the intracellular survival of *Leishmania donovani* promastigotes and rendered this genetically resistant macrophage cell line permissive to the replication of *Legionella pneumophila*. Based on the proposed role for PKC- α in the regulation of phagosome maturation (1,17,26), we suggested that a defect in phagosome maturation in DN PKC- α -overexpressing macrophages may have contributed to the increased intracellular survival of *L. donovani* (25). The finding that LAMP1 and flotillin-1 levels are significantly down-regulated on latex bead-containing phagosomes isolated from DN PKC- α -overexpressing macrophages is consistent with a maturation defect in these macrophages.

To further investigate the effects of DN PKC- α on the phagosome maturation process and composition, we took a proteomic approach using two-dimensions electrophoresis of latex bead-containing phagosomes (19). This robust approach allowed us to take a global view of the compositional changes that occur in phagosomes from DN

PKC- α -overexpressing macrophages. Using the high-resolution two-dimensions proteome map of latex bead-containing phagosomes (19) and mass spectrometry analysis, we identified cathepsin D, cathepsin S, and the small GTPase Rab7 as being down-regulated in phagosomes isolated from DN PKC- α -overexpressing macrophages. Down-modulation of these key proteins was confirmed by Western blot analysis, thereby validating the proteomic approach. Thus, the features of phagosomes isolated from DN PKC- α -overexpressing macrophages strongly suggest that their maturation is arrested at a stage preceding their interaction with late endosomes. In this regard, our data indicate that PKC- α transiently associates to the phagosomes and is barely detectable on phagolysosomes. Collectively, these data are consistent with PKC- α being a key player of the maturation machinery, most likely at a maturation stage where microbicidal properties are acquired by phagosomes.

The inhibition of phagosome maturation in DN PKC- α -overexpressing macrophages, as defined by the absence of phagosome-associated LAMP1 and flotillin-1, is characterized by the impaired recruitment of Rab7 to phagosomes. This GTPase plays a key role in the regulation of late endocytic traffic particularly the transition from early to late endosomes (27,28). Rab7 also associates with lysosomes and controls their aggregation and fusion with late endocytic structures (29). In *Dictyostelium*, Rab7 is required for phagosome maturation (30). It is thus possible that the absence of Rab7 on phagosomes from DN PKC- α -overexpressing macrophages contributes to the observed inhibition of phagolysosome biogenesis (Figure 5). Whether recruitment of Rab7 to phagosomes is directly regulated by PKC- α -mediated phosphorylation is not known. Interestingly, in platelets, phosphorylation of Rab6 by PKC increases its affinity for GTP and leads to its translocation to the cytosol (31). It is also possible that PKC- α indirectly influences the recruitment of Rab7 to phagosomes. In *Dictyostelium*, the recruitment of Rab7 correlates with the dissociation of F-actin from the newly formed phagosome (30). Dissociation of periphagosomal F-actin is essential for interactions between phagosomes and endosomes to take place and recent evidence suggest that PKC plays a role in this process (18,32). It is thus possible that accumulation of periphagosomal F-actin in DN PKC- α -overexpressing macrophages (32) constitutes a physical barrier that interferes

with the recruitment of Rab7 and phagosome maturation. Clearly, additional studies will be required to address these issues.

A salient feature of phagolysosome biogenesis is the sequential appearance of the various hydrolases normally present in a phagolysosome (19). The impaired acquisition of cathepsin D observed in latex bead-containing phagosomes from DN PKC- α -overexpressing macrophages suggests that PKC- α acts at a maturation step preceding the acquisition of this hydrolase. Alternatively, it is possible that PKC- α regulates the interaction between the maturing phagosome and a subset of endosomes enriched in cathepsin D. Of note, total cathepsin S levels are reduced in DN-PKC- α -overexpressing macrophages, suggesting that PKC- α regulates the expression of this hydrolase.

In summary, we used for the first time a proteomic approach to evidence a role for PKC- α in the regulation of phagosome maturation. The absence of Rab7, cathepsin D and flotillin-1 in latex bead-containing phagosomes from DN PKC- α -overexpressing macrophages is a strong indication that these phagosomes are blocked at an early maturation step. Of interest, these phagosomes display characteristics similar to that of phagosomes containing either *L. donovani* promastigotes or lipophosphoglycan-coated particles (24,33,34). Indeed these phagosomes, which are devoid of PKC- α , are poorly fusogenic, fail to acquire Rab7, LAMP1 and flotillin-1. Thus, in addition to elucidating the role of PKC- α in the control of phagosome maturation, further characterization of phagosomes from DN PKC- α -overexpressing macrophages may lead to a better understanding of the mechanisms used by pathogens such as *Leishmania* to remodel their intracellular habitat.

Acknowledgements

We are grateful to Christiane Rondeau for helpful advices concerning isolation and two-dimensional analyses of latex bead-containing phagosomes. We thank Robert Lodge for comments on this manuscript.

REFERENCES

1. *Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999) Annu Rev Immunol 17, 593-623*
2. *Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G., and Griffiths, G. (1994) J Cell Biol 124, 677-688*
3. *Jahraus, A., Storrie, B., Griffiths, G., and Desjardins, M. (1994) J Cell Sci 107, 145-157*
4. *Mayorga, L. S., Bertini, F., and Stahl, P. D. (1991) J Biol Chem 266, 6511-6517*
5. *Alvarez-Dominguez, C., Barbieri, A. M., Beron, W., Wandinger-Ness, A., and Stahl, P. D. (1996) J Biol Chem 271, 13834-13843*
6. *Rabinowitz, S., Horstmann, H., Gordon, S., and Griffiths, G. (1992) J Cell Biol 116, 95-112*
7. *Vieira, O. V., Botelho, R. J., and Grinstein, S. (2002) Biochem J 366, 689-704*
8. *Jaken, S. (1996) Curr Opin Cell Biol 8, 168-173*
9. *Ohno, S., and Nishizuka, Y. (2002) J Biochem (Tokyo) 132, 509-511*
10. *Breton, A., and Descoteaux, A. (2000) Biochem Biophys Res Commun 276, 472-476*
11. *Brumell, J. H., Howard, J. C., Craig, K., Grinstein, S., Schreiber, A. D., and Tyers, M. (1999) J Immunol 163, 3388-3395*
12. *Allen, L. A., and Allgood, J. A. (2002) Curr Biol 12, 1762-1766*
13. *Larsen, E. C., DiGennaro, J. A., Saito, N., Mehta, S., Loegering, D. J., Mazurkiewicz, J. E., and Lennartz, M. R. (2000) J Immunol 165, 2809-2817*
14. *Larsen, E. C., Ueyama, T., Brannock, P. M., Shirai, Y., Saito, N., Larsson, C., Loegering, D., Weber, P. B., and Lennartz, M. R. (2002) J Cell Biol 159, 939-944*
15. *Zheng, L., Zomerdijk, T. P., Aarnoudse, C., van Furth, R., and Nibbering, P. H. (1995) J Immunol 155, 776-784*
16. *Zheleznyak, A., and Brown, E. J. (1992) J Biol Chem 267, 12042-12048*
17. *Allen, L. H., and Aderem, A. (1995) J Exp Med 182, 829-840*
18. *Itoh, S., Suzuki, K., Nishihata, J., Iwasa, M., Oku, T., Nakajin, S., Nauseef, W. M., and Toyoshima, S. (2002) Biol Pharm Bull 25, 837-844*

19. *Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., and Desjardins, M. (2001) J Cell Biol 152, 165-180*
20. *St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y., and Descoteaux, A. (1998) J Biol Chem 273, 32787-32792*
21. *Desjardins, M., Celis, J. E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., and Huber, L. A. (1994) J Biol Chem 269, 32194-32200*
22. *Desjardins, M. (1995) Trends Cell Biol 5, 183-186*
23. *Desjardins, M., and Griffiths, G. (2003) Curr Opin Cell Biol 15, 498-503*
24. *Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., and Desjardins, M. (2001) J Biol Chem 276, 18507-18512.*
25. *St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F., and Descoteaux, A. (1999) J Immunol 163, 5505-5511*
26. *Allen, L. A., and Aderem, A. (1996) J Exp Med 184, 627-637*
27. *Feng, Y., Press, B., and Wandinger-Ness, A. (1995) J Cell Biol 131, 1435-1452*
28. *Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C. B., and Bucci, C. (1997) J Biol Chem 272, 4391-4397*
29. *Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., and van Deurs, B. (2000) Mol Biol Cell 11, 467-480*
30. *Rupper, A., Grove, B., and Cardelli, J. (2001) J Cell Sci 114, 2449-2460*
31. *Fitzgerald, M. L., and Reed, G. L. (1999) Biochem J 342 (Pt 2), 353-360*
32. *Holm, A., Tejle, K., Gunnarsson, T., Magnusson, K. E., Descoteaux, A., and Rasmusson, B. (2003) Biochem Biophys Res Commun 302, 653-658*
33. *Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.-F., Méresse, S., Descoteaux, A., and Desjardins, M. (1999) Cellular Microbiology 1, 19-32*
34. *Holm, Å., Tejle, K., Magnusson, K. E., Descoteaux, A., and Rasmusson, B. (2001) Cellular Microbiology 3, 439-447*

FOOTNOTES

** This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grant MT-29033 (AD) and a Team grant from the Fonds FCAR (AD and MD). AD is a Chercheur-boursier from the Fonds de la recherche en santé du Québec and holder of the Canada Research Chair in Infection and Immunity. MD is holder of the Canada Research Chair in Cellular Microbiology.*

§ To whom correspondence should be addressed: Albert Descoteaux, INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7. Tel: 450-687-5010 ext 4465; Fax: 450-686-5301; Email:albert.descoteaux@inrs-iaf.quebec.ca

Discussion

Le macrophage est une cellule spécialisée du système immunitaire. Aussi connu comme phagocyte professionnel et cellule présentatrice d'antigènes, le macrophage joue un rôle essentiel tant dans l'immunité innée que dans l'immunité adaptative. Grâce à l'expression de multiples récepteurs, le macrophage peut reconnaître directement une grande variété de pathogènes par la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou par la reconnaissance indirecte suite à l'opsonisation de ces agents pathogènes par des anticorps ou par le complément (*Aderem et Underhill, 1999*). Afin de répondre efficacement à une infection, la reconnaissance d'un pathogène par le macrophage déclenche diverses cascades de signalisation menant notamment à la phagocytose et aussi à la sécrétion des molécules telles des cytokines et d'autres molécules pro-inflammatoires. Cependant, malgré la grande efficacité de destruction des macrophages, plusieurs parasites déjouent les mécanismes de destruction grâce à différentes stratégies d'échappement (*Aderem et Underhill, 1999; Meresse et al., 1999; Duclos et al., 2000; Sansonetti, 2001; Ismail et al., 2002*). Parmi ces stratégies, les parasites ont développé la capacité de détourner différentes protéines de signalisation, incluant la protéine kinase C (*Descoteaux et al., 1992; Moore et al., 1993; Jacob et al., 1994*).

La protéine kinase C fait partie de la grande famille des protéine sérine/thréonine kinases. Tout comme les autres protéines de signalisation, la famille de PKC est constituée de plusieurs isoenzymes. En dépit de leur grande homologie de séquence et de structure, les différentes isoenzymes de PKC démontrent des fonctions distinctes (*Jaken et Parker, 2000*). Initialement, cette spécificité a été attribuée à la reconnaissance spécifique des substrats par ces enzymes. Cependant une étude sur l'identification systématique des motifs peptiques des substrats de chaque isoenzyme a été effectuée par Nishikawa et ces collaborateurs en 1997 (*Nishikawa et al., 1997*). Les résultats de cette étude révèlent que les PKC ne démontrent pas de grandes préférences spécifiques pour une séquence particulière. Ceci suggère donc que la spécificité de ces enzymes réside plutôt dans leur localisation intracellulaire.

Chez les macrophages, on dénombre six isoenzymes soient PKC α , β I, β II, δ , ϵ et γ . Toutefois, leurs rôles respectifs ne sont pas entièrement connus chez les macrophages. Au cours des dernières années, plusieurs groupes ont montré que ces isoenzymes jouent un rôle important dans les fonctions du macrophage notamment dans le processus de phagocytose régulé entre autres par les récepteurs Fc γ (Zheleznyak et Brown, 1992; Zheng et al., 1995; Allen et Aderem, 1996a; Melendez et al., 1999; Breton et Descoteaux, 2000). En plus de l'association très rapide de PKC- α et de l'un de ses substrats, MARCKS, à la coupe phagocytaire, Allen et Aderem ont observé que PKC- α et MARCKS demeurent associés aux phagosomes jusqu'à la formation du phagolysosome suggérant ainsi leur implication dans le processus de maturation (Allen et Aderem, 1995a). Également, St-Denis et collègues ont démontré que PKC- α est impliquée dans la maturation du phagosome. Suite à la surexpression d'un mutant dominant-négatif de PKC- α , ils ont constaté que PKC- α joue un rôle important dans le contrôle de la réplication des parasites intracellulaires tel *Leishmania donovani* et *Legionella pneumophila* (St-Denis et al., 1999). Cet effet n'est pas dû à un défaut de l'activité microbicide de ces macrophages, car ils conservent la capacité de tuer *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, ces observations suggèrent que l'activité de PKC- α est importante dans la régulation du processus de maturation du phagosome.

Afin de mieux comprendre le rôle de PKC- α dans le processus de maturation, nous avons utilisé l'approche de la surexpression d'un mutant dominant-négatif de PKC- α dans la lignée murine de macrophage RAW264.7 au lieu des inhibiteurs pharmacologiques, car ces inhibiteurs ne permettent pas de distinguer entre les différentes isoenzymes. Nous avons aussi utilisé des billes de latex de faible densité afin d'extraire des phagosomes par la méthode de flottaison sur gradient de sucrose. Cette approche offre plusieurs avantages notamment sa simplicité et rapidité d'exécution (Desjardins et al., 1994a; Desjardins et al., 1994b). De plus, il a été démontré que les phagosomes contenant des billes de latex étaient dépourvus de contaminant majeur pouvant provenir des autres organelles de la cellule (Desjardins et al., 1994a; Desjardins et al., 1994b). Également, ces phagosomes démontrent des propriétés fonctionnelles normales incluant

la fusion avec les compartiments endosomaux, la maturation en phagolysosomes (ce qui inclut l'acquisition de différentes hydrolases) (*Desjardins et al., 1994b; Desjardins, 1995; Claus et al., 1998; Garin et al., 2001*).

Nos résultats confirment le niveau d'expression élevé du mutant DN PKC- α dans les cellules mutantes. Également, ces résultats démontrent bien la présence de PKC- α dans les phagosomes contenant des billes de latex. De plus, nous avons constaté une diminution d'association de PKC- α dans les phagosomes âgés de 24 heures dans les cellules. Cette baisse n'est pas due à une réduction du niveau d'expression de PKC- α dans la cellule, car le niveau d'expression de PKC- α à 24 heures est similaire au niveau d'expression observé à une heure. Étant donné que le mutant DN PKC- α s'associe aux phagosomes et demeure associé 24 heures après internalisation, cette approche permet donc d'étudier spécifiquement l'activité de PKC- α dans la maturation des phagosomes.

Au cours de la biogénèse du phagolysosome, le phagosome s'acidifie et acquiert les hydrolases nécessaires pour la destruction des agents pathogènes. Les mécanismes de régulation de la maturation ne sont pas encore élucidés. Toutefois, le modèle qui représente le mieux le processus de maturation est décrit par le modèle « Kiss-and-Run » proposé par Desjardins en 1995 (*Desjardins, 1995*). Ce modèle propose des interactions transitoires et séquentielles des phagosomes avec les compartiments endosomaux. En plus des hydrolases, les phagosomes acquièrent successivement des marqueurs endosomaux telles les petites GTPases Rab5 et Rab7. La fin du processus de maturation, c'est-à-dire la formation du phagolysosome, est caractérisée par la présence notamment du marqueur lysosomal LAMP-1. Considérant que ces marqueurs sont principalement localisés dans des compartiments spécifiques, soient les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes, plusieurs groupes ont utilisé ces marqueurs afin de suivre les étapes de maturation des phagosomes. Nous avons aussi utilisé cette approche pour étudier l'impact de la surexpression du mutant DN PKC- α sur le processus de maturation. Nos analyses par Western blot des phagosomes isolés 1h et 24 h après leur formation démontrent que l'activité de PKC- α influence effectivement la maturation. Nous avons constaté une diminution du niveau d'expression des marqueurs lysosomaux LAMP-1 ainsi que de la

flotilline, protéine lysosomale dont la fonction n'est pas encore déterminée (*Dermine et al., 2000*), dans les phagosomes provenant des macrophages surexprimant le mutant DN PKC- α comparativement aux phagosomes provenant des cellules de type sauvage. Ainsi, nos résultats suggèrent que le DN PKC- α inhibe la maturation du phagosome, en accord avec un rôle pour PKC- α dans le processus de maturation. Cette observation semble confirmer l'hypothèse de St-Denis et collègues quant au rôle de PKC- α dans la modulation de la maturation. Ainsi, la survie des parasites *Leishmania donovani* et *Legionella pneumophila* peut s'expliquer du moins en partie, par un défaut de maturation des phagosomes due à l'inhibition de l'activité régulatrice de PKC- α (*St-Denis et al., 1999*).

Ayant établi que la maturation du phagosome est régulée par l'activité de PKC- α , nous avons déterminé l'effet du mutant DN PKC- α sur la composition des phagosomes. Pour ce faire, nous avons opté pour une approche protéomique utilisant l'analyse par électrophorèse à 2 dimensions. Cette technique offre l'avantage de pouvoir analyser des centaines de protéines simultanément. A l'aide de cette approche, le groupe de Desjardins a dressé une carte protéomique du phagosome chez la lignée cellulaire de macrophage murin J774, identifiant plus de 140 protéines (*Garin et al., 2001*). Cependant, il est à noter que même si les lignées cellulaires J774 et RAW264.7 proviennent de la même lignée de souris, leur patron protéomique diffère quelque peu. Après comparaison de la composition des phagosomes provenant de macrophages contrôles et de macrophages surexprimant le mutant DN PKC- α , nous avons pu identifier trois régions où il y a une régulation à la baisse des protéines. En se basant sur la carte protéomique du phagosome et de l'analyse par spectrométrie de masse, nous avons identifié trois protéines correspondant aux cathepsines D et S et Rab7. Afin de confirmer les résultats obtenus par électrophorèse à 2 dimensions, nous avons procédé à une analyse par Western blot de ces protéines. Ceci nous a permis de confirmer la diminution du niveau de ces protéines dans les phagosomes provenant de macrophages surexprimant le mutant DN PKC- α comparativement aux phagosomes provenant des cellules normales. Suite à ces observations, nous pouvons dire que PKC- α influence la composition du phagosome.

La protéine Rab7 est une petite GTPase de la famille Rab. Rab7 est principalement localisée sur les endosomes tardifs, mais récemment Bucci a montré que Rab7 est aussi retrouvé aux lysosomes (Bucci *et al.*, 2000). L'utilisation de mutants dominant-négatifs et de mutants constitutivement actifs de Rab7 démontre que Rab7 est important dans la régulation du trafic membranaire entre les endosomes précoces et tardifs (Feng *et al.*, 1995; Vitelli *et al.*, 1997). Cependant, le mécanisme d'action de Rab7 dans le phagosome demeure obscur. Toutefois par analogie avec les voies endosomales, Rab7 pourrait certainement réguler la fusion des phagosomes avec les endosomes tardifs et les lysosomes. La surexpression d'un mutant dominant-négatif de Rab7 chez *Dictyostelium* montre une interférence dans la maturation du phagosomes (Rupper *et al.*, 2001). De même, Scianimanico a noté une corrélation entre une inhibition du recrutement de Rab7 et inhibition de la maturation des phagosomes contenant des promastigotes de *L. donovani* (Scianimanico *et al.*, 1999). Ces études et nos résultats, nous permettent de spéculer que la diminution du recrutement de Rab7 aux phagosomes serait un événement qui expliquerait l'inhibition de la maturation observée dans nos expériences (Figure G). Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de faire un lien avec l'inhibition de l'activité de PKC- α et la diminution du niveau de Rab7 sur les phagosomes. De plus, il ne faut pas exclure la possibilité que l'inhibition du recrutement de Rab7 et l'inhibition de la maturation ne soient que des événements découlant d'une étape qui se produirait en amont du processus de maturation suite à l'inactivation de PKC- α dans le phagosome.

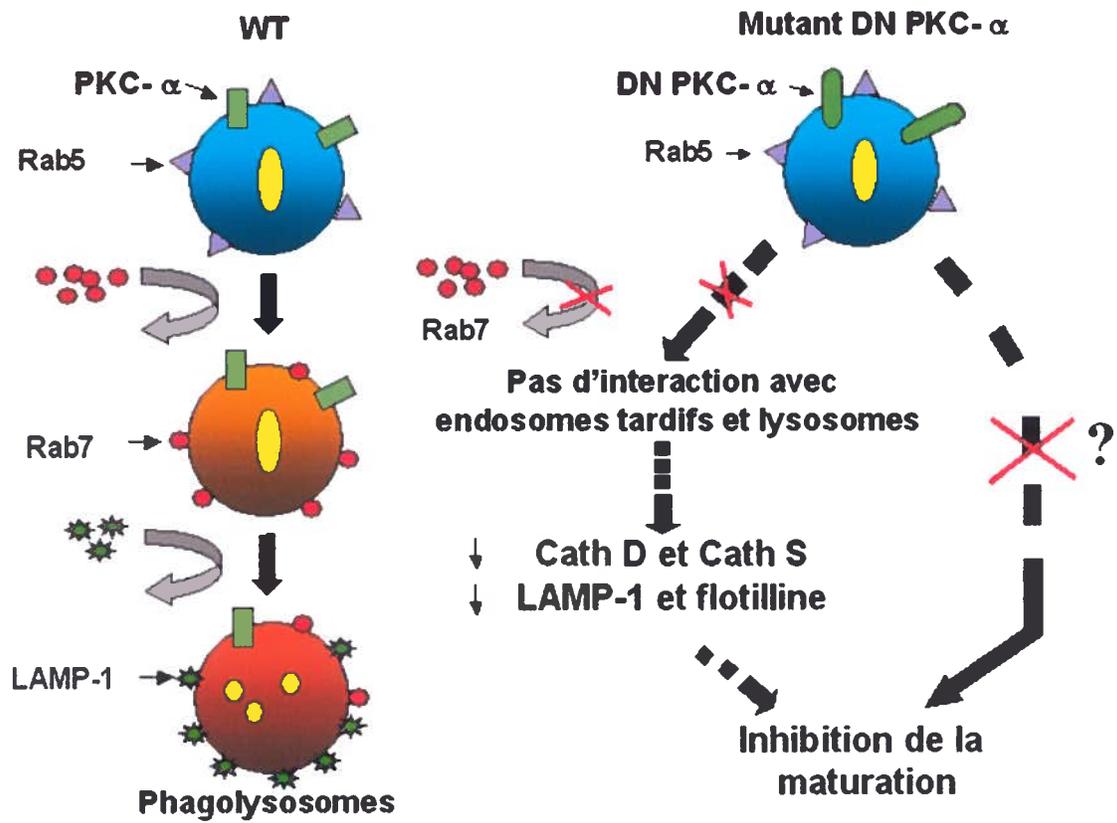


Figure G. Modèle du rôle de PKC- α dans la maturation du phagosome

Dans le même ordre d'idée, Rupper a aussi observé que l'association de Rab7 corrèle avec la dissociation de l'actine des phagosomes nouvellement formés dans *Dictyostelium* (Rupper et al., 2001). Or, nous savons qu'au cours de la phagocytose PKC- α et MARCKS sont recrutés aux sites de phagocytose et suite à sa phosphorylation par PKC- α , MARCKS perd ses propriétés de liaison aux filaments d'actine et se dissocie du phagosome (Allen et Aderem, 1995b). De plus, Holm a observé que l'accumulation de l'actine périphagosomale corrèle avec la diminution du recrutement de PKC- α aux phagosomes suggérant l'implication de PKC- α dans le démantèlement de l'actine autour du phagosome (Holm et al., 2001). En effet, les macrophages mutants surexprimant un dominant-négatif de PKC- α démontrent une augmentation de l'actine périphagosomale (Holm et al., 2003). Ainsi, il a été suggéré que l'accumulation de l'actine agisse comme une barrière physique empêchant la fusion des phagosomes et des endosomes (Holm et al., 2001). Également, une étude effectuée récemment par Itoh et collègues semble proposer un rôle semblable de PKC dans la maturation du phagosome. Itoh a démontré que p57, une protéine associée à l'actine et faisant partie de la famille des coronines et homologue à la protéine TACO, pouvait être phosphorylée par PKC. De plus, l'inhibition de PKC bloque non seulement la phosphorylation de p57, mais inhibe aussi la dissociation de p57 et de l'actine autour des phagosomes (Itoh et al., 2002). Ces observations suggèrent donc que la régulation de protéines associées à l'actine par PKC soit une étape essentielle dans le mécanisme de dépolymérisation de l'actine. Donc, ce démantèlement serait nécessaire dans le processus de fusion des phagosomes et des endosomes. Ainsi, un modèle possible pour expliquer nos résultats est que l'inhibition de l'activité de PKC- α au niveau du phagosome bloquerait le démantèlement des filaments d'actine possiblement par l'inhibition de la phosphorylation de MARCKS, de p57 ou d'autres protéines associées à l'actine (Figure G). L'actine périphagosomale empêcherait la fusion des phagosomes et les endosomes suggérant donc une inhibition du processus de maturation. Cette inhibition expliquerait alors la diminution de Rab7, de LAMP-1, de flotilline et des cathepsines D et S aux phagosomes. Cependant, il faut prendre en considération qu'il pourrait exister d'autres possibilités de mécanismes impliquant PKC- α qui nous sont présentement inconnus.

La diminution observée du niveau des cathepsines D et S à l'étape précoce des interactions des phagosomes avec les lysosomes semble, à première vue, en accord avec notre modèle proposant l'inhibition de la fusion entre le phagosome et le lysosome. Cependant, l'analyse par Western blot révèle des informations qui nécessitent d'autres explications. La diminution de Cath S dans les phagosomes des mutants DN PKC- α est aussi observée dans les extraits cellulaires totaux. Cela indique donc que la réduction du niveau de Cath S dans les phagosomes n'est pas due à une inhibition de la maturation, mais suggère plutôt que le niveau total de Cath S de la cellule soit diminué dans les cellules exprimant le mutant DN PKC- α comparativement aux cellules normales. Toutefois, nous ne pouvons pas tirer de conclusion en se basant simplement sur ces données. Nous pouvons néanmoins spéculer que PKC- α peut réguler l'expression et le niveau de Cath S. Ceci démontre que l'approche de la surexpression d'un mutant dominant-négatif de PKC- α a aussi des inconvénients notamment lorsque les différents événements affectés par la mutation générée dans la cellule s'entrecroisent. Ainsi, afin de vérifier si l'inhibition de PKC- α pouvait influencer le recrutement de Cath S dans les phagosomes, une alternative possible serait d'utiliser un système inductible de la surexpression du mutant dominant-négatif. Une deuxième alternative possible serait d'inhiber spécifiquement la PKC- α à l'aide de la méthode d'interférence ARN (RNAi). Récemment, Irie et collègues ont démontré que la RNAi dirigée contre la PKC- α chez des lignées cellulaires dérivées de l'humain pouvait effectivement inhiber de façon très spécifique l'expression de PKC- α endogène (Irie et al., 2002).

Conclusion

En conclusion, ce projet a permis de démontrer que PKC- α régule effectivement le processus de maturation du phagosome. L'inhibition de PKC- α par la surexpression d'un mutant DN PKC- α bloque le recrutement des marqueurs lysosomaux LAMP-1, flotilline, cathepsine D et Rab7 aux phagosomes. Étant donné que Rab7 n'est pas recrutée aux phagosomes, nous pouvons spéculer que PKC- α agit très tôt après la formation des phagosomes possiblement entre les interactions phagosomes/endosomes précoces et phagosomes/endosomes tardifs. Nous avons aussi constaté que PKC- α affecte le niveau de cathepsine S dans les macrophages.

Afin d'approfondir nos connaissances dans le mécanisme de PKC- α dans la biogenèse du phagolysosome, il serait intéressant d'analyser les événements précoces suite à la formation du nouveau phagosome. Nous pourrions notamment vérifier si les phagosomes provenant des macrophages DN PKC- α peuvent interagir avec les endosomes précoces en analysant le recrutement des marqueurs précoces comme Rab5 et EEA1. Cela nous donnera des informations si PKC- α agit dans l'étape de transition des phagosomes avec endosomes précoces et les endosomes tardifs ou dans une étape encore plus tôt de la maturation. Également, nous pourrions étudier l'effet de PKC- α dans le démantèlement de l'actine périphagosomale. Ainsi, nous pourrions vérifier le modèle proposé par Holm et collègues selon lequel l'actine agirait comme une barrière physique (Holm *et al.*, 2001) et le démantèlement du réseau d'actine autour des phagosomes est nécessaire pour la fusion des phagosome avec les endosomes (Holm *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2002).

Remerciements

Je désire sincèrement remercier le Dr Albert Descoteaux de m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. De plus, je tiens à le remercier pour ses précieux conseils qui ont aidé à l'avancement de mon projet et pour ses nombreux encouragements durant les moments difficiles. Je le remercie aussi pour m'avoir donné la chance de participer à des congrès. Finalement, je le remercie pour son soutien financier tout au long de ma maîtrise.

Je tiens également à remercier le Dr Michel Desjardins pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant l'été 2001 et de m'avoir donné une formation sur les analyses à électrophorèse à 2 dimensions. Je tiens aussi à le remercier pour ses précieux conseils et pour les analyses de spectrométrie de masse et de nous avoir offert gracieusement les anticorps contre LAMP-1, flotilline et Rab7. Je tiens également à remercier Christianne Rondeau, technicienne dans le laboratoire de Michel Desjardins, pour m'avoir accueilli chaleureusement durant mon stage de l'été 2001 ainsi que pour ses précieux conseils techniques sur les gels 2D.

Également, je suis très reconnaissant de l'accueil que j'ai reçu de tous les membres du laboratoire ainsi que pour les supports moraux et techniques au cours de ma maîtrise. Je tiens à remercier tout particulièrement Robert Lodge pour ses précieux conseils.

Finalement, je terminerai par remercier particulièrement mes parents qui m'ont encouragé à travailler et à persévérer dans mes études.

Liste des références

1. Aderem, A. et D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol 17: 593-623.
2. Alexander, J. et D. G. Russell (1992). "The interaction of Leishmania species with macrophages." Adv Parasitol 31: 175-254.
3. Allen, L. A. et A. Aderem (1996a). "Mechanisms of phagocytosis." Curr Opin Immunol 8(1): 36-40.
4. Allen, L. A. et J. A. Allgood (2002). "Atypical protein kinase C-zeta is essential for delayed phagocytosis of Helicobacter pylori." Curr Biol 12(20): 1762-6.
5. Allen, L. H. et A. Aderem, (1995a). "A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages" J Exp Med 186(3) 829-40
6. Allen, L. H. et A. Aderem (1995b). "Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts." Embo J 14(6): 1109-20.
7. Allen, W. E., G. E. Jones, J. W. Pollard et A. J. Ridley (1997). "Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages." J Cell Sci 110 (Pt 6): 707-20.
8. Allen, W. E., D. Zicha, A. J. Ridley et G. E. Jones (1998). "A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis." J Cell Biol 141(5): 1147-57.
9. Alvarez-Dominguez, C., A. M. Barbieri, W. Beron, A. Wandinger-Ness et P. D. Stahl (1996). "Phagocytosed live Listeria monocytogenes influences Rab5-regulated in vitro phagosome-endosome fusion." J Biol Chem 271(23): 13834-43.
10. Andrews, N. W., C. K. Abrams, S. L. Slatin et G. Griffiths (1990). "A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH." Cell 61(7): 1277-87.
11. Andrews, N. W. et M. B. Whitlow (1989). "Secretion by Trypanosoma cruzi of a hemolysin active at low pH." Mol Biochem Parasitol 33(3): 249-56.
12. Apostolopoulos, V. et I. F. McKenzie (2001). "Role of the mannose receptor in the immune response." Curr Mol Med 1(4): 469-74.
13. Araki, N., M. T. Johnson et J. A. Swanson (1996). "A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages." J Cell Biol 135(5): 1249-60.
14. Arber, S., F. A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C. A. Stanyon, O. Bernard et P. Caroni (1998). "Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase." Nature 393(6687): 805-9.
15. Armstrong, J. A. et P. D. Hart (1975). "Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival." J Exp Med 142(1): 1-16.
16. Backer, J. M. (2000). "Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of vesicular trafficking." Mol Cell Biol Res Commun 3(4): 193-204.
17. Bajno, L., X. R. Peng, A. D. Schreiber, H. P. Moore, W. S. Trimble et S. Grinstein (2000). "Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation." J Cell Biol 149(3): 697-706.

18. Barbieri, M. A., G. Li, M. I. Colombo et P. D. Stahl (1994). "Rab5, an early acting endosomal GTPase, supports in vitro endosome fusion without GTP hydrolysis." J Biol Chem **269**(29): 18720-2.
19. Berthiaume, E. P., C. Medina et J. A. Swanson (1995). "Molecular size-fractionation during endocytosis in macrophages." J Cell Biol **129**(4): 989-98.
20. Bevec, T., V. Stoka, G. Pungercic, I. Dolenc et V. Turk (1996). "Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L." J Exp Med **183**(4): 1331-8.
21. Booth, J. W., W. S. Trimble et S. Grinstein (2001). "Membrane dynamics in phagocytosis." Semin Immunol **13**(6): 357-64.
22. Breton, A. et A. Descoteaux (2000). "Protein kinase C-alpha participates in FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages." Biochem Biophys Res Commun **276**(2): 472-6.
23. Bromme, D., P. R. Bonneau, P. Lachance, B. Wiederanders, H. Kirschke, C. Peters, D. Y. Thomas, A. C. Storer et T. Vernet (1993). "Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme." J Biol Chem **268**(7): 4832-8.
24. Brown, G. D., P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. Wong et S. Gordon (2002). "Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages." J Exp Med **196**(3): 407-12.
25. Bucci, C., A. Lutcke, O. Steele-Mortimer, V. M. Olkkonen, P. Dupree, M. Chiariello, C. B. Bruni, K. Simons et M. Zerial (1995). "Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms." FEBS Lett **366**(1): 65-71.
26. Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy et B. van Deurs (2000). "Rab7: a key to lysosome biogenesis." Mol Biol Cell **11**(2): 467-80.
27. Burleigh, B. A. et N. W. Andrews (1998). "Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." Curr Opin Microbiol **1**(4): 461-5.
28. Burleigh, B. A. et A. M. Woolsey (2002). "Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion." Cell Microbiol **4**(11): 701-11.
29. Caron, E. et A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-21.
30. Casanova, J. E., X. Wang, R. Kumar, S. G. Bhartur, J. Navarre, J. E. Woodrum, Y. Altschuler, G. S. Ray et J. R. Goldenring (1999). "Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells." Mol Biol Cell **10**(1): 47-61.
31. Chano, F. et A. Descoteaux (2002). "Modulation of lipopolysaccharide-induced NF-IL6 activation by protein kinase C-alpha in a mouse macrophage cell line." Eur J Immunol **32**(10): 2897-904.
32. Charest, H. et G. Matlashewski (1994). "Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene." Mol Cell Biol **14**(5): 2975-84.
33. Chatila, T. A., R. S. Geha et M. A. Arnaout (1989). "Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules." J Cell Biol **109**(6 Pt 2): 3435-44.
34. Chen, C. C., J. K. Wang et S. B. Lin (1998). "Antisense oligonucleotides targeting protein kinase C-alpha, -beta I, or -delta but not -eta inhibit lipopolysaccharide-

- induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor kappa B-dependent mechanism." J Immunol **161**(11): 6206-14.
35. Chimini, G. et P. Chavrier (2000). "Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment." Nat Cell Biol **2**(10): E191-6.
 36. Claus, V., A. Jahraus, T. Tjelle, T. Berg, H. Kirschke, H. Faulstich et G. Griffiths (1998). "Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes." J Biol Chem **273**(16): 9842-51.
 37. Clos, J., L. Klaholz, M. Kroemer, S. Krobitch et S. Lindquist (2001). "Heat shock protein 100 and the amastigote stage-specific A2 proteins of *Leishmania donovani*." Med Microbiol Immunol (Berl) **190**(1-2): 47-50.
 38. Collins, R. F., A. D. Schreiber, S. Grinstein et W. S. Trimble (2002). "Syntaxins 13 and 7 function at distinct steps during phagocytosis." J Immunol **169**(6): 3250-6.
 39. Coppolino, M. G., C. Kong, M. Mohtashami, A. D. Schreiber, J. H. Brumell, B. B. Finlay, S. Grinstein et W. S. Trimble (2001). "Requirement for N-ethylmaleimide-sensitive factor activity at different stages of bacterial invasion and phagocytosis." J Biol Chem **276**(7): 4772-80.
 40. Coppolino, M. G., R. Dierckman, J. Loijens, R. F. Collins, M. Pouladi, J. Jongstra-Bilen, A. D. Schreiber, W. S. Trimble, R. Anderson et S. Grinstein (2002). "Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Ialpha impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis." J Biol Chem **277**(46): 43849-57.
 41. Courret, N., C. Frehel, E. Prina, T. Lang et J. C. Antoine (2001). "Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages." Parasitology **122**(Pt 3): 263-79.
 42. Cox, D., P. Chnag, Q. Zhang, P. G. Reddy, G. M. Bokoch et S. Greenberg (1997). "Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes." J Exp Med **186**(9): 1487-94.
 43. Cox, D. et S. Greenberg (2001). "Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system." Semin Immunol **13**(6): 339-45.
 44. Cox, D., D. J. Lee, B. M. Dale, J. Calafat et S. Greenberg (2000). "A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 680-5.
 45. Cox, D., C. C. Tseng, G. Bjekic et S. Greenberg (1999). "A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension." J Biol Chem **274**(3): 2140-7.
 46. Crowle, A. J., R. Dahl, E. Ross et M. H. May (1991). "Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic." Infect Immun **59**(5): 1823-31.
 47. Daeron, M. (1997). "Fc receptor biology." Annu Rev Immunol **15**: 203-34.

48. Defacque, H., E. Bos, B. Garvalov, C. Barret, C. Roy, P. Mangeat, H. W. Shin, V. Rybin et G. Griffiths (2002). "Phosphoinositides regulate membrane-dependent actin assembly by latex bead phagosomes." Mol Biol Cell **13**(4): 1190-202.
49. Defacque, H., M. Egeberg, A. Habermann, M. Diakonova, C. Roy, P. Mangeat, W. Voelter, G. Marriott, J. Pfannstiel, H. Faulstich et G. Griffiths (2000). "Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes." Embo J **19**(2): 199-212.
50. Defacque, H., E. Bos, B. Garvalov, C. Barret, C. Roy, P. Mangeat, H. W. Shin, V. Rybin et G. Griffiths (2002). "Phosphoinositides regulate membrane-dependent actin assembly by latex bead phagosomes." Mol Biol Cell **13**(4): 1190-202.
51. Dermine, J. F., S. Scianimanico, C. Prive, A. Descoteaux et M. Desjardins (2000). "Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis." Cell Microbiol **2**(2): 115-26.
52. Descoteaux, A., G. Matlashewski et S. J. Turco (1992). "Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by Leishmania donovani lipophosphoglycan." J Immunol **149**(9): 3008-15.
53. Descoteaux, A. et S. J. Turco (2002). "Functional aspects of the Leishmania donovani lipophosphoglycan during macrophage infection." Microbes Infect **4**(9): 975-81.
54. Desjardins, M. (1995). "Biogenesis of phagosomes: the "Kiss and Run" hypothesis." Trends in cell biology **5**: 183-5.
55. Desjardins, M., J. E. Celis, G. van Meer, H. Dieplinger, A. Jahraus, G. Griffiths et L. A. Huber (1994b). "Molecular characterization of phagosomes." J Biol Chem **269**(51): 32194-200.
56. Desjardins, M. et A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan." J Exp Med **185**(12): 2061-8.
57. Desjardins, M., L. A. Huber, R. G. Parton et G. Griffiths (1994a). "Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus." J Cell Biol **124**(5): 677-88.
58. Detmers, P. A., S. D. Wright, E. Olsen, B. Kimball et Z. A. Cohn (1987). "Aggregation of complement receptors on human neutrophils in the absence of ligand." J Cell Biol **105**(3): 1137-45.
59. Devitt, A., O. D. Moffatt, C. Raykundalia, J. D. Capra, D. L. Simmons et C. D. Gregory (1998). "Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells." Nature **392**(6675): 505-9.
60. Driessen, C., R. A. Bryant, A. M. Lennon-Dumenil, J. A. Villadangos, P. W. Bryant, G. P. Shi, H. A. Chapman et H. L. Ploegh (1999). "Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells." J Cell Biol **147**(4): 775-90.
61. Duclos, S., R. Diez, J. Garin, B. Papadopoulou, A. Descoteaux, H. Stenmark et M. Desjardins (2000). "Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages." J Cell Sci **113 Pt 19**: 3531-41.

62. El Fakhry, Y., M. Ouellette et B. Papadopoulou (2002). "A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*." Proteomics **2**(8): 1007-17.
63. El-Etr, S. H. et Cirillo, J. D.(2001) "Entry mechanisms of mycobacteria" Front Biosci **6**: D737-47
64. Engman, D. M. et J. S. Leon (2002). "Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity." Acta Trop **81**(2): 123-32.
65. Fasshauer, D., R. B. Sutton, A. T. Brunger et R. Jahn (1998). "Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15781-6.
66. Feng, Y., B. Press et A. Wandinger-Ness (1995). "Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic." J Cell Biol **131**(6 Pt 1): 1435-52.
67. Ferrari, G., H. Langen, M. Naito et J. Pieters (1999). "A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria." Cell **97**(4): 435-47.
68. Fraser, I. P., H. Koziel et R. A. Ezekowitz (1998). "The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity." Semin Immunol **10**(5): 363-72.
69. Fratti, R. A., J. M. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera et V. Deretic (2001). "Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest." J Cell Biol **154**(3): 631-44.
70. Fujihara, M., N. Connolly, N. Ito et T. Suzuki (1994). "Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production." J Immunol **152**(4): 1898-906.
71. Gagnon, E., S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P. H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J. J. Bergeron et M. Desjardins (2002). "Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages." Cell **110**(1): 119-31.
72. Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J. F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau et M. Desjardins (2001). "The phagosome proteome: insight into phagosome functions." J Cell Biol **152**(1): 165-80.
73. Gatfield, J. et J. Pieters (2000). "Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages." Science **288**(5471): 1647-50.
74. Gillooly, D. J., A. Simonsen et H. Stenmark (2001). "Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins." Biochem J **355**(Pt 2): 249-58.
75. Giroux, M. et A. Descoteaux (2000). "Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C-alpha." J Immunol **165**(7): 3985-91.
76. Gonzalez, L., Jr. et R. H. Scheller (1999). "Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex." Cell **96**(6): 755-8.
77. Green, E. G., E. Ramm, N. M. Riley, D. J. Spiro, J. R. Goldenring et M. Wessling-Resnick (1997). "Rab11 is associated with transferrin-containing recycling compartments in K562 cells." Biochem Biophys Res Commun **239**(2): 612-6.

78. Greenberg, S. (1999). "Modular components of phagocytosis." J Leukoc Biol 66(5): 712-7.
79. Griffin, F. M., Jr., J. A. Griffin, J. E. Leider et S. C. Silverstein (1975). "Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane." J Exp Med 142(5): 1263-82.
80. Hackam, D. J., O. D. Rotstein, M. K. Bennett, A. Klip, S. Grinstein et M. F. Manolson (1996). "Characterization and subcellular localization of target membrane soluble NSF attachment protein receptors (t-SNAREs) in macrophages. Syntaxins 2, 3, and 4 are present on phagosomal membranes." J Immunol 156(11): 4377-83.
81. Hackam, D. J., O. D. Rotstein, C. Sjolín, A. D. Schreiber, W. S. Trimble et S. Grinstein (1998). "v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A 95(20): 11691-6.
82. Hartwig, J. H., G. M. Bokoch, C. L. Carpenter, P. A. Janmey, L. A. Taylor, A. Toker et T. P. Stossel (1995). "Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets." Cell 82(4): 643-53.
83. Hay, J. C. (2001). "SNARE complex structure and function." Exp Cell Res 271(1): 10-21.
84. Holevinsky, K. O. et D. J. Nelson (1998). "Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages." Biophys J 75(5): 2577-86.
85. Holm, A., K. Tejle, T. Gunnarson, K. E. Magnusson, A. Descoteaux et B. Rasmusson (2003). "Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages." Biochemical and Biophysical Research Communications 302: 653-658.
86. Holm, A., K. Tejle, K. E. Magnusson, A. Descoteaux et B. Rasmusson (2001). "Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKCalpha and defective phagosome maturation." Cell Microbiol 3(7): 439-47.
87. Horikoshi, T., I. Arany, S. Rajaraman, S. H. Chen, H. Brysk, G. Lei, S. K. Tying et M. M. Brysk (1998). "Isoforms of cathepsin D and human epidermal differentiation." Biochimie 80(7): 605-12.
88. Horiuchi, H., R. Lippe, H. M. McBride, M. Rubino, P. Woodman, H. Stenmark, V. Rybin, M. Wilm, K. Ashman, M. Mann et M. Zerial (1997). "A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function." Cell 90(6): 1149-59.
89. House, C. et B. E. Kemp (1987). "Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain." Science 238(4834): 1726-8.
90. Irie, N., N. Sakai, T. Ueyama, T. Kajimoto, Y. Shirai et N. Saito (2002). "Subtype- and species-specific knockdown of PKC using short interfering RNA." Biochem Biophys Res Commun 298(5): 738-43.
91. Ismail, N., J. P. Olano, H. M. Feng et D. H. Walker (2002). "Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms." FEMS Microbiol Lett. 207(2): 111-20.

92. Itoh, S., K. Suzuki, J. Nishihata, M. Iwasa, T. Oku, S. Nakajin, W. M. Nauseef et S. Toyoshima (2002). "The role of protein kinase C in the transient association of p57, a coronin family actin-binding protein, with phagosomes." Biol Pharm Bull **25**(7): 837-44.
93. Jacob, T., J. C. Escallier, M. V. Sanguedolce, C. Chicheportiche, P. Bongrand, C. Capo et J. L. Mege (1994). "Legionella pneumophila inhibits superoxide generation in human monocytes via the down-modulation of alpha and beta protein kinase C isotypes." J Leukoc Biol **55**(3): 310-2.
94. Jahn, R. et T. C. Sudhof (1999). "Membrane fusion and exocytosis." Annu Rev Biochem **68**: 863-911.
95. Jahraus, A., T. E. Tjelle, T. Berg, A. Habermann, B. Storrie, O. Ullrich et G. Griffiths (1998). "In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages." J Biol Chem **273**(46): 30379-90.
96. Jaken, S. et P. J. Parker (2000). "Protein kinase C binding partners." Bioessays **22**(3): 245-54.
97. Kaplan, G. (1977). "Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages." Scand J Immunol **6**(8): 797-807.
98. Kima, P. E., B. Burleigh et N. W. Andrews (2000). "Surface-targeted lysosomal membrane glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by Trypanosoma cruzi." Cell Microbiol **2**(6): 477-86.
99. Kirschke, H., B. Wiederanders, D. Bromme et A. Rinne (1989). "Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins." Biochem J **264**(2): 467-73.
100. Konduri, S. D., N. Yanamandra, K. Siddique, A. Joseph, D. H. Dinh, W. C. Olivero, M. Gujrati, G. Kouraklis, A. Swaroop, A. P. Kyritsis et J. S. Rao (2002). "Modulation of cystatin C expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells." Oncogene **21**(57): 8705-12.
101. Kwok, T., S. Backert, H. Schwarz, J. Berger et T. F. Meyer (2002). "Specific entry of Helicobacter pylori into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism." Infect Immun **70**(4): 2108-20.
102. Larsen, E. C., J. A. DiGennaro, N. Saito, S. Mehta, D. J. Loegering, J. E. Mazurkiewicz et M. R. Lennartz (2000). "Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells." J Immunol **165**(5): 2809-17.
103. Larsen, E. C., T. Ueyama, P. M. Brannock, Y. Shirai, N. Saito, C. Larsson, D. Loegering, P. B. Weber et M. R. Lennartz (2002). "A role for PKC-varepsilon in Fc-gammaR-mediated phagocytosis by RAW 264.7 cells." J Cell Biol **159**(6): 939-44.
104. Lennartz, M. R., A. F. Yuen, S. M. Masi, D. G. Russell, K. F. Buttle et J. J. Smith (1997). "Phospholipase A2 inhibition results in sequestration of plasma membrane into electronlucent vesicles during IgG-mediated phagocytosis." J Cell Sci **110** (Pt 17): 2041-52.
105. Lennon-Dumenil, A. M., A. H. Bakker, R. Maehr, E. Fiebiger, H. S. Overkleeft, M. Roseblatt, H. L. Ploegh et C. Lagaudriere-Gesbert (2002). "Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the

- phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation." J Exp Med **196**(4): 529-40.
106. Ley, V., E. S. Robbins, V. Nussenzweig et N. W. Andrews (1990). "The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments." J Exp Med **171**(2): 401-13.
 107. Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira et Darnell (1997). "Biologie Moléculaire de la cellule." New York, 3eEd, Editions deBroeck university, Ch22.
 108. Lutcke, A., R. G. Parton, C. Murphy, V. M. Olkkonen, P. Dupree, A. Valencia, K. Simons et M. Zerial (1994). "Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression." J Cell Sci **107** (Pt 12): 3437-48.
 109. Machesky, L. M. et K. L. Gould (1999). "The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 117-21.
 110. Machesky, L. M. et R. H. Insall (1998). "Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex." Curr Biol **8**(25): 1347-56.
 111. Maniak, M., R. Rauchenberger, R. Albrecht, J. Murphy et G. Gerisch (1995). "Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocation visualized by a green fluorescent protein Tag." Cell **83**(6): 915-24.
 112. Martin, T. F. (2001). "PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 493-9.
 113. May, R. C., E. Caron, A. Hall et L. M. Machesky (2000). "Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3." Nat Cell Biol **2**(4): 246-8.
 114. McBride, H. M., V. Rybin, C. Murphy, A. Giner, R. Teasdale et M. Zerial (1999). "Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13." Cell **98**(3): 377-86.
 115. McConville, M. J. et J. M. Blackwell (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids." J Biol Chem **266**(23): 15170-9.
 116. McNeely, T. B., G. Rosen, M. V. Londner et S. J. Turco (1989). "Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*." Biochem J **259**(2): 601-4.
 117. Melendez, A. J., M. M. Harnett et J. M. Allen (1999). "FcγRI activation of phospholipase Cγ1 and protein kinase C in dibutyryl cAMP-differentiated U937 cells is dependent solely on the tyrosine-kinase activated form of phosphatidylinositol-3-kinase." Immunology **98**(1): 1-8.
 118. Melo, M. D. et R. W. Stokes (2000). "Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with MH-S, an immortalized murine alveolar macrophage cell line: a comparison with primary murine macrophages." Tuber Lung Dis **80**(1): 35-46.
 119. Meresse, S., J. P. Gorvel et P. Chavrier (1995). "The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes." J Cell Sci **108** (Pt 11): 3349-58.

120. Meresse, S., O. Steele-Mortimer, E. Moreno, M. Desjardins, B. Finlay et J. P. Gorvel (1999). "Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death." Nat Cell Biol **1**(7): E183-8.
121. Miao, L., A. Stafford, S. Nir, S. J. Turco, T. D. Flanagan et R. M. Epand (1995). "Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*." Biochemistry **34**(14): 4676-83.
122. Mochly-Rosen, D. et L. M. Kauvar (2000). "Pharmacological regulation of network kinetics by protein kinase C localization." Semin Immunol **12**(1): 55-61.
123. Moore, K. J., S. Labrecque et G. Matlashewski (1993). "Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction." J Immunol **150**(10): 4457-65.
124. Mosser, D. M., T. A. Springer et M. S. Diamond (1992). "Leishmania promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)." J Cell Biol **116**(2): 511-20.
125. Nakagawa, T. Y. et A. Y. Rudensky (1999). "The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation." Immunol Rev **172**: 121-9.
126. Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C: structure, function, and regulation." J Biol Chem **270**(48): 28495-8.
127. Nishikawa, K., A. Toker, F. J. Johannes, Z. Songyang et L. C. Cantley (1997). "Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes." J Biol Chem **272**(2): 952-60.
128. Nishizuka, Y. (1992). "Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C." Science **258**(5082): 607-14.
129. Nishizuka, Y. (1995). "Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses." Faseb J **9**(7): 484-96.
130. Palecanda, A. et L. Kobzik (2001). "Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors." Curr Mol Med **1**(5): 589-95.
131. Patki, V., J. Virbasius, W. S. Lane, B. H. Toh, H. S. Shpetner et S. Corvera (1997). "Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7326-30.
132. Pfeffer, S. R. (1999). "Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs." Nat Cell Biol **1**(1): E17-22.
133. Pfeffer, S. R., A. B. Dirac-Svejstrup et T. Soldati (1995). "Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place." J Biol Chem **270**(29): 17057-9.
134. Pierre, P. et I. Mellman (1998). "Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells." Cell **93**(7): 1135-45.
135. Platt, N., H. Suzuki, Y. Kurihara, T. Kodama et S. Gordon (1996). "Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12456-60.
136. Pollard, T. D., L. Blanchoin et R. D. Mullins (2000). "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 545-76.

137. Press, B., Y. Feng, B. Hoflack et A. Wandinger-Ness (1998). "Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment." J Cell Biol **140**(5): 1075-89.
138. Quraishi, O., D. K. Nagler, T. Fox, J. Sivaraman, M. Cygler, J. S. Mort et A. C. Storer (1999). "The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide." Biochemistry **38**(16): 5017-23.
139. Rabinowitz, S., H. Horstmann, S. Gordon et G. Griffiths (1992). "Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages." J Cell Biol **116**(1): 95-112.
140. Reddy, A., E. V. Caler et N. W. Andrews (2001). "Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes." Cell **106**(2): 157-69.
141. Rezabek, B. L., J. M. Rodriguez-Paris, J. A. Cardelli et C. P. Chia (1997). "Phagosomal proteins of Dictyostelium discoideum." J Eukaryot Microbiol **44**(4): 284-92.
142. Riese, R. J. et H. A. Chapman (2000). "Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation." Curr Opin Immunol **12**(1): 107-13.
143. Roberts, R. L., M. A. Barbieri, J. Ullrich et P. D. Stahl (2000). "Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis." J Leukoc Biol **68**(5): 627-32.
144. Rodriguez, A., I. Martinez, A. Chung, C. H. Berlot et N. W. Andrews (1999). "cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes." J Biol Chem **274**(24): 16754-9.
145. Rodriguez, A., P. Webster, J. Ortego et N. W. Andrews (1997). "Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells." J Cell Biol **137**(1): 93-104.
146. Rosen, A., K. F. Keenan, M. Thelen, A. C. Nairn et A. Aderem (1990). "Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia." J Exp Med **172**(4): 1211-5.
147. Rupper, A., B. Grove et J. Cardelli (2001). "Rab7 regulates phagosome maturation in Dictyostelium." J Cell Sci **114**(Pt 13): 2449-60.
148. Sansonetti, P. J. (2001). "Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(3): G319-23.
149. Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg et C. Haslett (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis." Nature **343**(6254): 170-3.
150. Savill, J., N. Hogg, Y. Ren et C. Haslett (1992). "Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis." J Clin Invest **90**(4): 1513-22.
151. Schechtman, D. et D. Mochly-Rosen (2001). "Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction." Oncogene **20**(44): 6339-47.
152. Scianimanico, S., M. Desrosiers, J. F. Dermine, S. Meresse, A. Descoteaux et M. Desjardins (1999). "Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by Leishmania donovani promastigotes." Cell Microbiol **1**(1): 19-32.

153. Serrander, L., P. Skarman, B. Rasmussen, W. Witke, D. P. Lew, K. H. Krause, O. Stendahl et O. Nusse (2000). "Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils." J Immunol **165**(5): 2451-7.
154. Shapira, L., S. Takashiba, C. Champagne, S. Amar et T. E. Van Dyke (1994). "Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes." J Immunol **153**(4): 1818-24.
155. Stahl, P. D. et R. A. Ezekowitz (1998). "The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense." Curr Opin Immunol **10**(1): 50-5.
156. St-Denis, A., V. Caouras, F. Gervais et A. Descoteaux (1999). "Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages." J Immunol **163**(10): 5505-11.
157. St-Denis, A., F. Chano, P. Tremblay, Y. St-Pierre et A. Descoteaux (1998). "Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line." J Biol Chem **273**(49): 32787-92.
158. Stenmark, H., A. Valencia, O. Martinez, O. Ullrich, B. Goud et M. Zerial (1994). "Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity." Embo J **13**(3): 575-83.
159. Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A. K. Fok, R. D. Allen, S. L. Gluck, J. Heuser et D. G. Russell (1994). "Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase." Science **263**(5147): 678-81.
160. Sumi, T., K. Matsumoto, Y. Takai et T. Nakamura (1999). "Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2." J Cell Biol **147**(7): 1519-32.
161. Suzaki, E., H. Kobayashi, Y. Kodama, T. Masujima et S. Terakawa (1997). "Video-rate dynamics of exocytotic events associated with phagocytosis in neutrophils." Cell Motil Cytoskeleton **38**(3): 215-28.
162. Takenawa, T. et H. Miki (2001). "WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement." J Cell Sci **114**(Pt 10): 1801-9.
163. Tapper, H., W. Furuya et S. Grinstein (2002). "Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules." J Immunol **168**(10): 5287-96.
164. Tapper, H. et S. Grinstein (1997). "Fc receptor-triggered insertion of secretory granules into the plasma membrane of human neutrophils: selective retrieval during phagocytosis." J Immunol **159**(1): 409-18.
165. Tardieux, I., P. Webster, J. Ravesloot, W. Boron, J. A. Lunn, J. E. Heuser et N. W. Andrews (1992). "Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells." Cell **71**(7): 1117-30.
166. Taylor, M. E., K. Bezouska et K. Drickamer (1992). "Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor." J Biol Chem **267**(3): 1719-26.
167. Teng, F. Y., Y. Wang et B. L. Tang (2001). "The syntaxins." Genome Biol **2**(11): REVIEWS3012.

168. Tjelle, T. E., T. Lovdal et T. Berg (2000). "Phagosome dynamics and function." Bioessays **22**(3): 255-63.
169. Tolson, D. L., S. J. Turco et T. W. Pearson (1990). "Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*." Infect Immun **58**(11): 3500-7.
170. Tomlinson, S., F. Vandekerckhove, U. Frevert et V. Nussenzweig (1995). "The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH." Parasitology **110** (Pt 5): 547-54.
171. Turco, S. J. et A. Descoteaux (1992). "The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites." Annu Rev Microbiol **46**: 65-94.
172. Turco, S. J. et D. L. Sacks (1991). "Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes." Mol Biochem Parasitol **45**(1): 91-9.
173. Turk, B., I. Dolenc, B. Lenarcic, I. Krizaj, V. Turk, J. G. Bieth et I. Bjork (1999). "Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity." Eur J Biochem **259**(3): 926-32.
174. Turk, B., D. Turk et V. Turk (2000). "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 98-111.
175. Ullrich, O., S. Reinsch, S. Urbe, M. Zerial et R. G. Parton (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." J Cell Biol **135**(4): 913-24.
176. Van Der Sluijs, P., M. Hull, A. Zahraoui, A. Tavitian, B. Goud et I. Mellman (1991). "The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6313-7.
177. Vanhaesebroeck, B. et M. D. Waterfield (1999). "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases." Exp Cell Res **253**(1): 239-54.
178. Via, L. E., D. Deretic, R. J. Ulmer, N. S. Hibler, L. A. Huber et V. Deretic (1997). "Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7." J Biol Chem **272**(20): 13326-31.
179. Vieira, O. V., R. J. Botelho, L. Rameh, S. M. Brachmann, T. Matsuo, H. W. Davidson, A. Schreiber, J. M. Backer, L. C. Cantley et S. Grinstein (2001). "Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation." J Cell Biol **155**(1): 19-25.
180. Vitelli, R., M. Santillo, D. Lattero, M. Chiariello, M. Bifulco, C. B. Bruni et C. Bucci (1997). "Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway." J Biol Chem **272**(7): 4391-7.
181. Vray, B., S. Hartmann et J. Hoebeke (2002). "Immunomodulatory properties of cystatins." Cell Mol Life Sci **59**(9): 1503-12.
182. Wang, Y. L. et M. B. Goren (1987). "Differential and sequential delivery of fluorescent lysosomal probes into phagosomes in mouse peritoneal macrophages." J Cell Biol **104**(6): 1749-54.
183. Webb, B. L., S. J. Hirst et M. A. Giembycz (2000). "Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis." Br J Pharmacol **130**(7): 1433-52.

184. Welch, M. D., A. Iwamatsu et T. J. Mitchison (1997). "Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*." Nature **385**(6613): 265-9.
185. Wilkowsky, S. E., Barbieri, M. A., Stahl, P., Isola, E. L. (2001) "Trypanosoma cruzi: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion." Exp Cell Res **264**(2):211-8
186. Wilkowsky, S. E., Barbieri, M. A., Stahl, P. D., Isola, E. L., (2002) "Regulation of Trypanosoma cruzi invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7" Biochem Biophys Res Commun **291**(3):516-21
187. Wu, S. K., K. Zeng, I. A. Wilson et W. E. Balch (1996). "Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily." Trends Biochem Sci **21**(12): 472-6.
188. Yang, B., L. J. Gonzalez, R. Prekeris, M. Steegmaier, R. J. Advani et R. H. Scheller (1999). "SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity." J Biol Chem. **274**(9): 5649-53.
189. Zamze, S., L. Martinez-Pomares, H. Jones, P. R. Taylor, R. J. Stillion, S. Gordon et S. Y. Wong (2002). "Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor." J Biol Chem **277**(44): 41613-23.
190. Zhang, W. W., H. Charest, E. Ghedin et G. Matlashewski (1996). "Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **78**(1-2): 79-90.
191. Zhang, W. W. et G. Matlashewski (1997). "Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8807-11.
192. Zheleznyak, A. et E. J. Brown (1992). "Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes." J Biol Chem **267**(17): 12042-8.
193. Zheng, L., T. P. Zomerdijk, C. Aarnoudse, R. van Furth et P. H. Nibbering (1995). "Role of protein kinase C isozymes in Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes." J Immunol **155**(2): 776-84.
194. Zigmond, S. H. et J. G. Hirsch (1972). "Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis." Exp Cell Res **73**(2): 383-93.