Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier

Interactions protéiques de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1 chez les macrophages murins lors de la maturation du phagolysosome.

Par Carolina Plazas-Gómez

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.) en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinatrice interne	Krista Heinonen INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Michel L. Tremblay Département de biochimie Université McGill
Examinateur externe	Benoit Boivin Département des Nanobiosciences Polytechnic Institute SUNY
Directeur de recherche	Albert Descoteaux INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de (Carolina Plazas-Gómez), 2016

I

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Albert Descoteaux. Il m'avait accepté dans son laboratoire initialement pour une maîtrise et m'a gentiment offert de rester pour mon doctorat. Même si nous avons eu des problèmes avec mon projet, il n'a jamais perdu confiance en moi. Ses commentaires et sa rigueur m'ont aidé à grandir en tant que chercheure et je lui suis extrêmement reconnaissant.

Merci à la Fondation universitaire Armand-Frappier pour le financement qu'elle m'accordé lors de mon doctorat ainsi qu'au centre des interactions hôte-pathogène pour son support financier dans les derniers trimestres de mes études.

Merci à Jessy Tremblay pour son aide et sa patience. Son aide en microscopie confocale ainsi qu'en cytométrie est inestimable.

Merci à toute l'équipe du laboratoire Descoteaux. Vous avez fait de moi, peutêtre sans le vouloir, une personne plus forte et meilleure que je l'étais au début. Je suis devenue qui je suis aujourd'hui grâce à vous.

Merci à Benoît. Peut-être que tu ne le sais pas, mais tu m'as gardé saine d'esprit pour une grande partie de ce doctorat. Je suis tellement contente de te compter parmi mes amis.

Merci à ma famille québécoise qui m'a accueilli les bras ouverts. Christiane et Louis vous êtes les meilleurs beaux-parents que j'aurais pu avoir dans ma vie. Je vous aime fort.

Merci à Alex, je te dois tellement et je suis si heureuse d'avoir partagé autant avec toi. Merci d'avoir cru en moi tout le long.

Gracias a Victor. Gracias por ayudarme con mis ataques de pánico a media noche. Supongo que el cambio de hora a veces tiene sus ventajas.

Gracias a Sasha. Sobre todo por mi cajita para el mal humor. Gracias por aguantar mis preguntas tontas y darme ánimo. No podría tener mejor compañerita ;)

Gracias a Caro S. Si hay alguien en el mundo con el que me hayan de confundir, no podría ser nadie mejor que tú. Me siento inmensamente orgullosa de ti, y quizás no te lo digo lo suficiente. Siempre puedes contar conmigo, incluso para cantar en las calles en medio de la noche.

Gracias a mi familia en Colombia. Han hecho más de lo inimaginable para no dejarme caer. Han creído en mi desde el principio y se los debo absolutamente todo a ellos. Los quiero montones, y los extraño cada día un poco más. Hay muchas cosas que han cambiado desde que me fui hace 7 años, pero siempre han estado ahí para mí y no tengo suficientes palabras para agradecerles todo. Gracias, Gracias, mil veces Gracias.

RESUME

La régulation de la biogenèse du phagolysosome est un processus régulé par les interactions de plusieurs protéines ainsi que par les échanges du phagosome avec d'autres organelles endocytiques. La biogenèse ainsi que la maturation de l'organelle ont fait le sujet de plusieurs études à travers des années, mais les mécanismes qui régulent la série d'évènements permettant une telle maturation ne sont pas tout à fait connus.

Nous avons démontré auparavant que la protéine tyrosine phosphatase contenant le domaine SH2 1 (SHP-1) joue un rôle important lors de la biogenèse du phagolysosome. En effet, chez les macrophages déficients en SHP-1 (*Ptpn6*^{me}) nous avons observé que le recrutement de certains marqueurs de maturation du phagosome est affecté. De plus, nous avons observé que chez les macrophages *Ptpn6*^{me}, les phagosomes ont des problèmes lors de l'acidification de leur lumen, une des caractéristiques de la maturation du phagosome en phagolysosome.

Pour mon doctorat nous avons proposé d'identifier les protéines interagissant avec SHP-1 lors de la biogenèse du phagolysosome, permettant à SHP-1 de réguler ce processus. Par analyses de spectrométrie de masse, nous avons identifié deux protéines qui interagissent avec SHP-1 lors de la phagocytose: la moésine et la myosine non musculaire de chaîne lourde II-A (myosine). Les deux protéines sont impliquées dans la formation de protubérances dans les cellules et la formation du phagosome.

Nous avons démontré chez des macrophages primaires dérivés de la moelle osseuse (BMMs) ainsi que chez des lignés cellulaires de macrophages que la moésine et la myosine sont recrutées aux phagosomes et qu'elles colocalisent avec SHP-1. Nous avons en plus vérifié ces interactions par immuno-précipitations contre SHP-1 et immunobuvardages de type Western contre les partenaires ainsi que les immuno-

IV

précipitations inverses. Nous avons aussi évalué l'état de phosphorylation des résidus tyrosine des partenaires.

Avec des petits ARNs interférents (siRNA) contre soit la moésine soit la myosine, nous avons évalué le taux et l'index de phagocytose des cellules. Nous avons aussi évalué le recrutement de SHP-1 ainsi que le recrutement des marqueurs connus de la maturation des phagolysosomes, suite au traitement avec les siRNA. Finalement, suite au traitement avec les siRNA, nous avons évalué l'acidification des phagosomes, la libération de radicaux oxygénés ainsi que la capacité des macrophages à répondre à une infection bactérienne.

Nous émettons l'hypothèse que Moe et Myo affectent ainsi le recrutement de SHP-1 et donc la biogénèse des phagolysosomes. D'autres expériences seront nécessaires afin de valider cette hypothèse.

TABLE DE MATIERES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	IV
TABLE DE MATIÈRES	VI
LISTE DE TABLEAUX	VIII
LISTE DE FIGURES	X
LISTE DE ABRÉVIATIONS	XII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	16
1. IMMUNITE ADAPTATIVE ET INNEE	17
1.1 Immunité innée	17
1.2 Immunité adaptative	17
2. LE MACROPHAGE	18
3. Phagocytose	19
3.1 Récepteurs et ligands	20
3.1.1. Récepteurs opsoniques	21
3.1.2. Récepteurs non opsoniques	24
3.2 La maturation du phagosome	26
3.2.1. Formation du phagosome	26
3.2.2. Rôle des Rab GTPases	29
3.2.3. Le phagosome précoce	33
3.2.4. Le phagosome tardif et le phagolysosome	
3.2.5. Production des espèces réactives d'oxygène (ROS) et des intermédiaires réactive	s de
nitrogène (RNI)	
3.2.6. Le protéome et le phosphoprotéome du phagosome	41
3.3 Échappement de la phagocytose et de la maturation du phagosome par des agents	
pathogènes	44
3.3.1. Modulation de la signalisation cellulaire	44
3.3.2. Échappement de la phagocytose	
3.3.3. Arrêt de la maturation du phagosome.	
3.3.4. Redirection de la maturation du phagosome.	50
4. SIGNALISATION INTRACELLULAIRE PAR PHOSPHORYLATION DES RESIDUS DE TYROSINE	51
4.1 La famille des kinases Src (SFKs) et les protéines tyrosines kinases Syk	52
4.2 Les tyrosines phosphatases	54
4.2.1 Les PTPs classiques basées en cystéine (classe I)	54
4.2.2 La protéine phosphatase contenant le domaine d'homologie SH2 (SHP-1)	56

4.2.3 Les interactions protéiques de SHP-158
5. LES PROTÉINES MYOSINE ET MOESINE
5.1 La famille des protéines myosines59
5.1.1. Les myosines de classe II non musculaires61
5.1.2. La myosine de type non musculaire IIA63
5.2 La superfamille Band 4.164
5.2.1. La protéine moésine66
6. MISE EN CONTEXTE ET HYPOTHÈSE
CHAPITRE 2: ARTICLE
RÉSUMÉ DE LA PUBLICATION
TABLES
CHAPITRE 3: DISCUSSION
3.1 LA MYOSINE DE TYPE NON MUSCULAIRE IIA ET LA MOÉSINE INTERAGISSENT AVEC SHP-1 LORS DE LA
PHAGOCYTOSE
3.2 SHP-1 MODIFIE LES CINÉTIQUES DE RECRUTEMENT DE LA MYOSINE DE TYPE NON MUSCULAIRE IIA ET DE LA
MOÉSINE
3.3 LA MYOSINE DE TYPE NON MUSCULAIRE IIA ET LA MOÉSINE AFFECTENT LA BIOGENÈSE DU PHAGOLYSOSOME
CONCLUSION
Références131

LISTE DE TABLEAUX

Introduction

Tableau 1.1 Résumé des récepteurs opsoniques et non opsoniques chez la souris	22
Tableau 1.2. Exemples des agents pathogènes intracellulaires qui échappent au processus de la maturation du phagosome	47
Tableau 1.3. Quelques protéines tyrosines kinases et phosphatases impliquées dans la régulation de phagocytose	la 52

Article

Table 2.1. List of antibodies used in this study	107
Table 2.2. Sequences of siRNA pools used in this study	108
Table 2.3. List of 8 of the 61 identified proteins in this study	109

LISTE DE FIGURES

Introduction

Figure 1.1.	Formation de la coupe phagocytique	.27
Figure 1.2.	Localisation et fonction des protéines Rab GTPases	. 30
Figure 1.3.	Schéma des évènements de la maturation du phagosome	. 35
Figure 1.4.	Mécanismes antimicrobiens chez les phagocytes	. 40
Figure 1.5.	Le protéome du phagosome	.43
Figure 1.6.	Le phosphoprotéome total de la cellule	. 46
Figure 1.7.	Structure fonctionnelle et tridimensionnelle de la protéine SHP-1	. 58
Figure 1.8.	Structures des myosines exprimés par des leucocytes	. 61
Figure 1.9. musculaire	Mécanisme de l'activation des protéines motrices myosines de classe II non	62
Figure 1.10.	La famille ERM	. 65
Figure 1.11. liaison	Organisation des domaines de la moésine, ses états de conformation et ses sites de	67

Article

Figure 2.1. SHP-1 interacts with moesin and myosin	. 86
Figure 2.2. Moesin and myosin IIA are recruited to the phagosome and colocalize with SHP-1 in the phagocytic cup	.87
Figure 2.3. Silencing of either moesin or myosin IIA affects phagosome index, ratio and SHP-1 recruitment to the phagosome	.91
Figure 2.4. Recruitment of early and late phagosome markers after moesin or myosin IIA silencing	. 93
Figure 2.5. Acquisition of oxidative features is impaired in SHP-1-defective macrophages	.96
Figure 2.6. Silencing of moesin or myosin IIA affects acquisition of oxidative features	. 97
Figure 2.7. Acquisition of phagolysosomal features is impaired after silencing of moesin or myosin IIA.	. 98
Figure 2.8 Recruitment of Actin to the phagosome is impaired in SHP-1 deficient cells or after silencing Moesin or Myosin	g of .94
Figure 2.9. SHP-1, moesin and myosin IIA affect the microbicidal activity of macrophages	101

LISTE DE ABREVIATIONS

- ABP : protéines avec liaison à l'actine
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADP : adénosine diphosphate
- **APLT :** aminophospholipide transférase
- ARF : facteur de ribosylation avec ADP 1
- ARNi : ARN d'interférence
- BMMs : macrophages dérivés de la moelle osseuse
- CathD : cathepsine D active
- CPA : cellule présentatrice de l'antigène
- CpG: —C—phosphate—G—
- CR : récepteur du complément
- CSF : facteur stimulateur de colonies
- **Dok-1**: Doking protein 1
- dsPTP: protéine tyrosine phosphatase avec double substrat
- EE : endosome précoce
- EEA1 : antigène des endosomes précoces 1
- ESCRT : complexe de transport de triage endosomale
- ER: réticulum endoplasmique
- ESX: "early secretory antigenic target 6 system"
- FYVE : protéine contenant des domaines FYVE et « Coiled-Coil »
- GH: hormone de croissance
- **GST** : glutathione S-transferase
- GTP: guanosine triphosphate
- GAP : protéine activatrices des GTPases
- HOPS : complexe d'assortiment des protéines vacuolaires et de fusion homotypique
- IFN : interféron
- iBMMs : cellules dérivées de la moelle osseuse immortalisées

IL: interleukin

- iNOS : synthase d'oxyde nitrique inductible
- IRCM : institut de recherche cliniques de Montréal
- ITAMs: motif immunorécepteur d'activation basée en tyrosine
- IgG: immunoglobuline G
- JAK: Janus kinase
- LAD: syndrome de déficience d'adhésion des leucocytes de type I
- LAMP-1: protéine associée à la membrane lysosomale 1
- LE : endosome tardif
- LM: litter mate
- LMPTP: protéine tyrosine phosphatase de faible poids moléculaire
- LPG : lipophosphoglycan en surface
- LPS: lipopolysacharide
- LY: lysosome
- **MØ** : macrophage
- M6PR : récepteur de la mannose-6-phosphatase
- MAPK : protéine kinase activée par des mitogènes
- MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine
- MptpB : protéine tyrosine phosphatase de Mycobacterium tuberculosis B
- MVM : corps multi vésiculaire
- NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NF-κB : facteur nucléaire kappa des cellules B activées
- NK : cellules "natural killer"
- NLR : récepteurs du type domaine d'oligomerisation des nucléotides
- NMHC-IIA : myosine de type non musculaire IIA
- NOD : domaine d'oligomerisation des nucléotides
- NRPTP : protéine tyrosine phosphatase de type non récepteur
- NSF : facteur sensible au N-ethylmaleimide
- **OmpA :** protéine de membrane externe A

ORLP1 : protéine reliée à la protéine de liaison à l'oxysterol 1

PAMPs : patrons moléculaires associés aux agents pathogènes

PI: phosphatidylinositol

PIR-B: "paired Ig-like receptor"

PI3P: phosphatidylinositol 3-phosphatase

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PLC: phospholipase C

PRRs : récepteurs de reconnaissance des patrons

PS: phosphatidylserine

PTK: protéine tyrosine kinase

PTP: protéine tyrosine phosphatase

PTP-1B: protéine tyrosine phosphatase 1B

PTP-MEG2: protéine tyrosine phosphatase des mégacaryocytes 2

pTyr: résidus de tyrosine phosphorylés

REP: protéine chaperone des Rabs

RIG: gène 1 inductible à l'acide rétinoïque

RILP : protéine lysosomale d'interaction avec Rab7

RLC : chaînes légères regulatrices

RLR : récepteurs de type gène 1 inductible à l'acide rétinoïque

ROCK : kinase associeée à Rho contenant un « Coiled-Coil »

ROS : espèces réactives d'oxygène

RPTP : protéine tyrosine phosphatase de type récepteur

RNI : espèces intermédiaires réactives de nitrogène

SapM : phosphatase acide de Mycobaterium tuberculosis

SH2 : domaine d'homologie à Src 2

SH2-C : domaine SH2 du côté C-terminal

SH2-N : domaine SH2 du côté N-terminal

SHP-1 : protéine tyrosine phosphatase contenant le domaine SH2 1

SHP-1*GST : protéine SHP-1 liée à une étiquette GST

SNAREs: protéine de type récepteur d'attachement au facteur sensible au Nethylmaleimide

SR: récepteur de type « scavenger »

SRBC: globule rouge de mouton

SRCR-SF: récepteur de type « scavenger » rich en cystéine

STAT: transducteur du signal et activatuer de la transcription

SVF: sérum de veau fœtal

TC-PTP: protéine tyrosine phosphatase des cellules T

TCA : acide trichloracétique

TCL : lysats cellulaires totaux

TLR: récepteur de type Toll

TNF: facteur de nécrose tumorale

TfR : récepteur de transferrine

TTS : système de sécrétion de type III

v-ATPase: ATPase de type vacuolaire

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. Immunité adaptative et innée

1.1 Immunité innée

L'immunité innée, médiée par des phagocytes professionnels, est la première ligne de défense contre les agents pathogènes (Akira et al., 2006). Elle permet leur reconnaissance via des structures conservées (PAMPs ou patrons moléculaires associés aux agents pathogènes) contrairement au système immunitaire adaptatif (Kawai et al., 2010). La reconnaissance de ces structures se fait à travers de récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR ou récepteurs de reconnaissance des patrons). A date, plusieurs classes de PRRs ont été décrites, notamment les récepteurs Toll-like (TLRs), considérés comme les senseurs principaux pour les agents pathogènes ; les récepteurs RIG-I-like (RLRs), qui permettent la reconnaissance de virus à ARN ; les récepteurs NOD-like (NLRs), qui permettent la reconnaissance d'une large gamme de ligands à l'intérieur des cellules; et les récepteurs d'ADN (Kumar et al., 2011). L'immunité innée humorale implique la voie du complément, ainsi que les anticorps naturels. Finalement, l'immunité innée intracellulaire implique la reconnaissance de molécules conservées, induisant l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines, et impliquant la mort cellulaire par apoptose. Ces réponses sont rapides et ont pour but de limiter l'infection jusqu'à ce que les cellules effectrices de la réponse immunitaire adaptative puissent combattre l'infection. Chez les animaux, ainsi que chez les plantes, la présence de motifs conservés du système immunitaire inné démontre leur importance au niveau de la défense de l'hôte (Iwasaki et al., 2010, Kawai et al., 2010, Medzhitov et al., 2000, Medzhitov et al., 2002).

1.2 Immunité adaptative

A différence de l'immunité innée, l'immunité adaptative permet une réactivité plus rapide et efficace suite à des rencontres répétés avec un agent pathogène (Boehm, 2012). Les principaux protagonistes de l'immunité adaptative sont les lymphocytes B et T. Ces cellules possèdent des récepteurs de surface, générés de façon aléatoire, qui ont une spécificité unique pour des antigènes particuliers (Iwasaki *et al.*, 2010, Palm *et*

al., 2009). Une fois les antigènes reconnus par ces récepteurs, ces lymphocytes débutent une expansion de type clonale. Une population de cellules effectrices hautement spécifiques en résulte, menant à la résolution de l'infection. Finalement, la réponse immunitaire adaptative se termine par l'acquisition d'une population de lymphocytes mémoires, prêts à défendre l'organisme contre des infections futures. Ceci permet une réponse de longue durée envers des microorganismes pathogènes. Cependant, un délai ou une modulation de la présentation antigénique peut affecter de façon sévère la réponse adaptative. La modulation du système immunitaire par différents agents pathogènes peut mener, dans certains cas, à une maladie sévère chez l'hôte. Jusqu'à très récemment, il était considéré que les organismes procaryotes n'avaient pas une immunité adaptative. (Koonin *et al.*, 2015).

2. Le macrophage

Les macrophages (du grec : « grand mangeur », makros = grand, phagein = manger) sont des cellules infiltrant les tissus, décrites pour la première fois par Elie Metchnikoff en 1883. Ils proviennent souvent de la différenciation des monocytes, cellules qui occupent une place centrale dans l'homéostasie, la défense innée de l'hôte et l'induction de réponses adaptatives (S. Gordon et al., 2005). Cependant, les macrophages peuvent aussi être d'origine tissulaire dérivés des cellules hématopoïétiques fœtales (Lahmar et al., 2016). Plus récemment, plusieurs études ont étudié le rôle des macrophages lors du métabolisme systémique, l'adaptation au froid ainsi que lors du développement des tissues (Amit et al., 2016, Siamon Gordon et al., 2014, Wynn et al., 2013). Aussi connues comme des phagocytes professionnels, ces cellules sont spécialisées dans l'élimination de débris cellulaires, de cellules apoptotiques, nécrotiques et sénescentes, ainsi que de différents agents pathogènes (Erwig et al., 2007). Cette élimination a lieu suite à l'activation des macrophages, leur offrant de puissants mécanismes microbicides. De plus, ces cellules sont aussi des cellules présentatrices d'antigène (CPA) exceptionnelles. Grâce à leurs diverses fonctions, les macrophages jouent un rôle primordial dans la destruction des agents pathogènes et le contrôle des infections. Cependant, malgré l'efficacité des

macrophages à combattre les infections, plusieurs microorganismes pathogènes ont développé des stratégies visant à modifier l'activité des macrophages.

Les macrophages sont exposés à plusieurs types des signaux métaboliques, homéostatiques ou même des signaux de danger, comme des composants microbiens ou des molécules endogènes (alarmines) que peuvent influencer les fonctions et réponses de ces cellules. Ce processus, connu comme l'amorçage des macrophages, peut alors déterminer le type d'activation des cellules et, par conséquence, leur capacité phagocytique.(Glass, 2015)

L'activation implique une série des changements de type morphologique et biochimique chez les macrophages. Quand les macrophages interagissent avec des cytokines de type Th1 (comme l'IFN_γ) ils sont capables de produire des molécules de dégradation contre des agents microbiens Ce type d'activation est connue comme classique ou M1. De l'autres coté, quand les macrophages interagissent avec des molécules de type Th2 (comme certaines interleukines), les processus impliqués sont plutôt de type reconstructif, avec la suppression des cellules apoptotiques ainsi que la production de collagène. Ce type d'activation est connue comme alternative ou M2. Chaque voie a des effets distincts. Les macrophages de type M1 pressentent une phagocytose diminuée quand 'elle est médiée par des récepteurs F du complément. De l'autre côté, les macrophages de type M2 pressentent une phagocytose de particules diminuée mais, au même temps, peuvent avoir une augmentation lors de la production des cytokines inflammatoires.(Classen *et al.*, 2009, Martinez *et al.*, 2014)

3. Phagocytose

La phagocytose joue un rôle primordial dans le processus de défense contre des microorganismes et est considérée comme un des processus les plus dynamiques de la réponse innée (Aderem *et al.*, 1999a, Stuart *et al.*, 2008). Elle est définie comme le processus d'englobement d'un agent pathogène, de cellules apoptotiques, ou d'une particule avec une taille d'au moins 0.5 μ m de diamètre, accompagnée par certains

changements au niveau membranaire qui permettent la formation du phagosome (Flannagan *et al.*, 2012). Une fois formée, cette organelle démontrera des changements de type biochimiques par lesquels le phagosome acquiert ses caractéristiques microbicides et hydrolytiques (Flannagan *et al.*, 2009, Greenberg, 1995). Les phagocytes professionnels, tels les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages, deviennent alors des acteurs très importants de la réponse immunitaire. Il est important de remarquer que les macrophages possèdent une capacité plus grande pour moduler la réponse inflammatoire, en comparaison avec les neutrophiles, et en conséquence, peuvent répondre à une plus grande variété de pathogènes (Verschoor *et al.*, 2012). En plus de servir comme une des premières lignes de défense contre plusieurs microorganismes pathogènes, la phagocytose joue un rôle crucial dans la dégradation des cellules apoptotiques et des débris cellulaires lors de la mort cellulaire. La phagocytose est un processus dépendant de récepteurs, ce qui permet la reconnaissance de corps étrangers et de cellules apoptotiques.

3.1 Récepteurs et ligands

Il existe de multiples ligands de haute affinité capables d'induire la phagocytose, séparés en deux catégories principales : opsoniques et non opsoniques, souvent référés comme des PRRs (Tableau 1.1). Ces derniers interagissent avec des ligands endogènes aux agents pathogènes (Ofek *et al.*, 1995). Ces interactions comprennent les liaisons avec des récepteurs de lectine, des récepteurs de type « scavenger »(SR) (Peiser *et al.*, 2002b), et des récepteurs de phosphatidylserine (PS), ainsi que des récepteurs de type TLR (Doyle *et al.*, 2004, Herre *et al.*, 2004b, Taylor *et al.*, 2005). D'un autre côté, les récepteurs opsoniques interagissent avec des composants solubles, nommés opsonines, tels que les immunoglobulines et le complément (Sobota *et al.*, 2005). La présence d'opsonines augmente l'index de phagocytose, *i.e.* la quantité de particules ou de microorganismes phagocytés par cellule. Certains microorganismes exploitent les opsonines afin d'être internalisés par les cellules phagocytiques, qui leur offrent ainsi une niche protégée de la réponse immune adaptative de l'hôte (Drecktrah *et al.*, 2006, Flannagan *et al.*, 2009, Underhill *et al.*, 2002).

3.1.1. Récepteurs opsoniques

Parmi les récepteurs opsoniques, nous retrouvons les récepteurs du complément, qui comprennent une famille de protéines solubles ainsi que transmembranaires, permettant la reconnaissance de cellules infectées. Lors d'une infection microbienne, la réponse par le complément a lieu. Ceci résulte en la génération des fragments C3b et iC3b, qui vont couvrir la surface du microorganisme pour permettre sa reconnaissance par le phagocyte via les récepteurs du complément (CR) (Flannagan *et al.*, 2012). CR3 est un des récepteurs les plus importants dans la phagocytose, et est hautement exprimé chez les leucocytes. Son importance a été mise en évidence par la découverte du syndrome de déficience d'adhésion des leucocytes de type I (LAD), caractérisé par des infections récurrentes et une déficience au niveau de la guérison des blessures (Ehlers, 2000). Cependant, CR3 ne peut pas activer la phagocytose au niveau basal, et il a été démontré que CR3 et un autre récepteur, $Fc\gamma$ RIII, peuvent coopérer lors d'une réponse immunitaire (Zhou *et al.*, 1994).

Les anticorps de type IgG sont attachés aux particules étrangères via le domaine Fab et permettent la reconnaissance des antigènes étrangers. La portion Fc demeure exposée, permettant sa reconnaissance par les récepteurs Fc γ (Fc γ R) présents à la surface des phagocytes en déclenchant la phagocytose. À ce jour, trois classes différentes de Fc γ R ont été décrites : Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII. Fc γ RI est une glycoprotéine de 72 kDa qui est capable de détecter des IgG de type monomérique ainsi que de type agrégé. Une caractéristique des Fc γ RI est la présence de domaines Ig extracellulaires et leur expression constitutive chez les monocytes et les macrophages (Ravetch *et al.*, 2001, Ravetch *et al.*, 1991, Strzelecka *et al.*, 1997, Swanson *et al.*, 2004).

Récepteur			Ligand
Récepteurs opsoniques	Famille des récepteurs Fc	FcγRI (CD64)	IgG monomérique (IgG1 =IgG3 >IgG4)
		FcyRII (CD32)	IgG monomérique (IgG3≥ IgG1 = IgG2)
		FcγRIII (CD16)	IgG monomérique
	Complément	CR1 (CD35)	Particules opsonisées avec : MBL, Clq, C4b, C3b
		CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CDIIb/CD18, Macl)	Particules opsonisées avec iC3b
	Intégrines	$\alpha_5\beta_1$ (CD49e/CD29)	Particules opsonisées avec fibronectine ou vitronectine
		$\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29)	Particules opsonisées avec fibronectine ou vitronectine
		α _υ β ₃ (CD51/CD61)	Particules opsonisées avec fibronectine ou vitronectine
Récepteurs non opsoniques	Du type « scavenger »	SR-A I/II	Bactéries Gram ^{+/-} ; acide lipoteichoique, ADN CpG, endotoxines.
		MARCO	Bactéries Gram ^{+/-} ; acide lipoteichoique, ADN CpG, endotoxines.
	Mannose		Hautes structures de mannose
	Dectine-1		β 1,3- and β 1,6-glucan
	Phosphatidylserine		Phosphatidylserine
Récepteurs pour la phagocytose non spécifique	Famille des récepteurs TLR	TLR2	Lipopetides microbiennes
		TLR3	ARN double-brin
		TLR4	Lipopolysaccaride (LPS)
		TLR5	Flagellin
		TLR7/8	ARN simple-brin
		TLR9	Motifs CpG dans l'ADN

Tableau 1.1 Résumé des récepteurs opsoniques et non opsoniques chez la souris¹.

¹ Adapté de (Aderem *et al.*, 1999b, Areschoug *et al.*, 2009, Flannagan *et al.*, 2012, Ofek *et al.*, 1995, Takeda *et al.*, 2005, Underhill *et al.*, 2012, Underhill *et al.*, 2002).

FcγRII est une glycoprotéine de 40kDa, généralement exprimée par la majorité des leucocytes. Il s'agit d'un récepteur monomérique qui contient des motifs immunorécepteurs d'activation basés en tyrosine (ITAMs) dans leurs sous-unités d'attachement au ligand (Gessner *et al.*, 1998, Huang *et al.*, 2003, Tridandapani *et al.*, 2005). Pour sa part, FcγRIII est une glycoprotéine de 50-80 kDa, poids qui varie dû à une glycosylation extensive. FcγRIIIa est exprimée de façon constitutive chez les macrophages, tandis que FcγRIIIb est le récepteur le plus commun chez les neutrophiles (Ravetch *et al.*, 2001, Sanchez-Mejorada *et al.*, 1998).

3.1.2. Récepteurs non opsoniques

Les récepteurs de mannose, les récepteurs de type SR, ainsi que les récepteurs de PS sont les récepteurs non opsoniques les mieux décrits à ce jour. En plus des récepteurs mentionnés, presque toutes les cellules du système immunitaire présentent des PRRs (Kawai *et al.*, 2010, Takeuchi *et al.*, 2010), reconnaissant des PAMPs (Akira *et al.*, 2003, Tsan *et al.*, 2007).

Les récepteurs de mannose font partie de la grande famille des lectines de type C, une famille avec des fonctions très hétérogènes comprenant, par exemple, des récepteurs endocytiques, des sélectines et des collectines solubles. (Erbacher *et al.*, 2009, Gazi *et al.*, 2009). Dans le cas des récepteurs de mannose, il s'agit d'une protéine transmembranaire avec plusieurs domaines de lectine qui reconnaissent la structure du mannose. L'activité de ces récepteurs dépend d'un influx de calcium intracellulaire. Ces récepteurs contiennent des domaines de cystéine, ce qui leur permet de reconnaître des glycoprotéines endogènes. Ils reconnaissent des levures, des bactéries, ainsi que des virus (Gazi *et al.*, 2009). La dectine-1 est un autre membre de la famille des lectines. Elle contrôle la phagocytose et la réponse immunitaire contre certains types de champignons (Herre *et al.*, 2004c). Elle a aussi été impliquée dans la production du facteur de nécrose tumorale (TNF) α , une cytokine pro-inflammatoire (Brown, 2006), et dans la phagocytose chez les macrophages (Herre *et al.*, 2004a).

La grande famille des récepteurs de type « scavenger » comprend une famille de glycoprotéines transmembranaires avec des structures très diverses, ainsi que d'autres molécules telles que les chaperonnes, exprimées surtout chez les macrophages et les cellules dendritiques, mais aussi chez les cellules endothéliales et quelques autres types cellulaires (Peiser et al., 2002b). À ce jour, les SR sont organisés en 8 classes (A-H), selon leur structure générale (Murphy et al., 2005). De plus, il existe une superfamille parmi ces récepteurs : la superfamille des récepteurs SR riches en cystéines (SRCR-SF), qui comprend des récepteurs transmembranaires et sécrétés, avec au moins un module protéique riche en cystéines d'environ 100 acides aminés. Deux types de domaine SRCR ont été décrits, A et B, avec des différences dans le nombre d'exons codants et dans le nombre de domaines de cystéines internes (Miró-Julià et al., 2011). À ce jour, une fonction unique unifiant les membres de SRCR-SF n'a pas été décrite, mais beaucoup d'entre eux ont démontré une reconnaissance des PAMPs. Plus récemment, avec l'identification et l'étude des nouveaux membres de cette famille, la gamme de ligands reconnus par des SR a augmenté, et inclut maintenant des protéines endogènes ainsi que des lipoprotéines, sans oublier des PAMPS tels que le lypopolyssaccharide bactérien (Pluddemann et al., 2011).

La phagocytose de cellules apoptotiques est effectuée à travers la reconnaissance de PS, normalement absente de la surface des cellules non-apoptotiques. Celle-ci est activement restreinte au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique grâce à l'aminophospholipide transférase (APLT) (Wu *et al.*, 2006). Lors de l'apoptose, la PS est exposée à la surface cellulaire suite à la régulation à la baisse de l'APLT et à la régulation à la hausse de l'ABCA1, une enzyme que participe à la translocation de la PS du côté cytosolique au côté externe (Hamon *et al.*, 2000). Selon plusieurs études, la reconnaissance de la PS est faite à travers des récepteurs spécifiques et il a aussi été démontré que ces récepteurs régulent la phagocytose des cellules nécrotiques et apoptotiques (Fadok *et al.*, 2000, Verhoven *et al.*, 1995).

Finalement, la famille des récepteurs de type *Toll* (TLR) est une des plus étudiées parmi les PRRs. Il s'agit d'une famille de protéines transmembranaires de type I, c'est-à-dire qui ne traversent la membrane lipidique qu'une seule fois et qui possèdent

un domaine N-terminale ciblé au réticulum endoplasmique lors de sa synthèse. Il a été démontré que le TLR2 reconnaît des lipopeptides microbiennes; le TLR3 reconnaît l'ARN double-brin (un produit viral); le TLR4 est un récepteur essentiel pour la reconnaissance du lipopolysaccaride (LPS); le TLR7 peut reconnaitre des petites molécules qui modifient la réponse immunitaire, telles que l'imiquimod ainsi que les ARN simple-brin; le TLR9 pour sa part, reconnaît des motifs CpG non méthyles de l'ADN, retrouvés fréquemment chez les bactéries et les virus ; le TLR5 reconnaît la (Akira et al., 2003, Kawai et al., 2010, Takeda et al., 2005). Après flagelline l'internalisation des agents pathogènes, les TLRs induisent l'expression de gènes proinflammatoires. Plusieurs études ont démontré que les TLRs ne sont pas nécessaires à l'initiation de la phagocytose (Peiser et al., 2002a) et ils sont considérés plutôt comme responsables de la phagocytose « déclenché » ou non spécifique (triggered en anglais) (West et al., 2004) Cependant, il est clair qu'ils sont nécessaires à la réponse postphagocytose (Underhill et al., 2002) et qu'ils peuvent moduler l'expression des autres récepteurs phagocytiques (Blander et al., 2004).

3.2 La maturation du phagosome

3.2.1. Formation du phagosome

L'internalisation de particules et de cellules via la phagocytose à lieu grâce à la formation d'une invagination de la membrane plasmique, en forme de coupe. Cette coupe se referme pour former des organelles connus sous le nom de phagosomes ou macropinosomes (Swanson, 2008). Dans cette revue de littérature, nous nous concentrerons sur les phagosomes.

Parce que la formation des phagosomes dépend de la nature des particules à englober, ils existent plusieurs modèles d'internalisation (Figure 1.1, (Swanson, 2008)). Notamment, le modèle de fermeture-éclair est décrit comme dépendant des récepteurs Fc, où les phagosomes sont formés par un avancement de la membrane et du cytosquelette autour des particules opsonisés avec des IgGs, guidé par des récepteurs d'une manière qui ressemble justement une fermeture-éclair. La reconnaissance des

IgGs change les domaines cytoplasmiques des FcRs ce qui permet la polymérisation de l'actine ainsi que l'extension membranaire pour englober la particule visée (Cox *et al.*, 2001). L'actine est concentrée au point de formation du phagosome, et reste associée à l'organelle jusqu'à sa fermeture. Plusieurs membres de la famille des myosines ont été montré comme ayant aussi un rôle important lors de la phagocytose via des FcRs. Nous en discuterons plus en détail ce rôle dans le chapitre dédié à cette famille des protéines (Maravillas-Montero *et al.*, 2012).



Figure 2.1. Formation de la coupe phagocytique.

Lors de la phagocytose via des FcR, la membrane plasmique s'étend sur des particules, en formant des extensions chez la surface cellulaire, qui ressemblent une coupe, à travers des interactions progressives avec les FcRs (en vert) et des IgGs liés à la particule (en noir). Des filaments d'actine (en rouge) et la myosine (en jaune) sont concentrés dans la coupe en formation, et la membrane provenant des autres compartiments intracellulaires (en bleu) est ajoutée à la base de la coupe. Des flèches indiquent la direction nette du mouvement des récepteurs (a), le déplacement net des filaments d'actine par polymérisation, dépolymérisation et contraction (b), la contraction du réseau actine-myosine (c) et le flux net des membranes vers la coupe. Tirée de (Swanson, 2008).

Plusieurs modèles proposent que la formation du phagosome est contrôlée primordialement par la polymérisation d'actine, impliquée dans l'invagination de la membrane autour de la particule à phagocyter (Harrison et al., 2003), ainsi que dans le trafic des phagosomes (Bohdanowicz et al., 2010). Les modèles les plus anciens mentionnent aussi une diminution de la superficie de la membrane plasmique des phagocytes, une fois la particule internalisée. Cependant, plusieurs groupes ont démontré que les phagocytes peuvent internaliser de grosses particules sans diminuer la superficie de leur membrane plasmique (Booth et al., 2001), ce qui indique que la perte de membrane plasmique est compensée par l'apport de membranes par d'autres compartiments intracellulaires. En effet, il a été démontré que la formation des phagosomes demande l'addition de membranes provenant aussi d'autres organelles intracellulaires, tels les endosomes, les lysosomes, certains granules et même le ER (Huynh et al., 2007c), ce qui donne au phagosome naissant des caractéristiques de chaque organelle, modifiant non seulement sa membrane mais aussi son lumen. Ces évènements de fusion membranaire sont contrôlés par des protéines telles que les Rab GTPases et d'autres protéines de type récepteur d'attachement au facteur sensible à la N-ethylmaleimide (NSF), aussi connues comme des SNAREs.

Les protéines SNAREs sont des protéines transmembranaires avec un motif capable de s'assembler en un paquet de 4 hélices (Ungar *et al.*, 2003). Elles sont divisées en deux catégories, les v-SNAREs au niveau des vésicules, et les t-SNAREs au niveau de la membrane cible. L'interaction de ces SNAREs (connue aussi comme le SNAREpin) permet la fusion membranaire (Short *et al.*, 2004), puis l'ATPase NSF et son cofacteur α SNAP se lient au SNAREpin pour permettre son recyclage.

D'autres processus participent aussi à l'apport de la membrane pendant la formation du phagosome. La pinocytose ou endocytose locale proche de la coupe phagocytique, ainsi que la diffusion latérale de membrane induite par $Fc\gamma R$, ont été décrites (Botelho *et al.*, 2002, Swanson *et al.*, 2004). De plus, plusieurs études sur les microdomaines lipidiques ont montré des translocations de molécules comme Src ou SHP-1 et même du récepteur Fc (Sobota *et al.*, 2005, M. W. Su *et al.*, 2011).

3.2.2. Rôle des Rab GTPases

Les Rab GTPases sont des protéines qui contiennent des domaines hypervariables à leur extrémité C-terminale et qui présentent des modifications lipidiques post-traductionnelle, processus essentiels pour l'interaction correcte entre les protéines Rab et les membranes des différentes organelles (Figure 1. 2, ((Stenmark, 2009)).



Figure 2.2. Localisation et fonction des protéines Rab GTPases.

Schéma représentant une cellule épithéliale avec ces vois de transport ainsi que la localisation des certaines Rab GTPases. RAB1, localisé aux sorties du réticulum endoplasmique (ER) et dans le compartiment pre-Golgi intermédiaire (IC) régule le transport ER-Golgi. RAB2, localisée au IC, peut aussi réguler dit transport. Les protéines RAB6, RAB33 et RAB40, localisées dans Golgi, régulaient le trafic intra-Golgien. RAB33, en tandem avec RAB24, régule aussi la formation des autophagosomes. RAB8, régule le trafic biosynthétique du réseau trans-Golgi (TGN) vers la membrane plasmique et participe aussi lors de la translocation vésiculaire de GLUT4 (avec RAB 10 et RAB14) et lors de la formation de cilié (avec RAB17 et RAB23). RAB3, RAB26 RAB27 et

RAB37 régulaient différents types des évènements exocytiques et RAB27 régule aussi la translocation des mélanosomes vers la périphérie cellulaire. RAB32 et RAB38 sont impliquées lors de la biogénèse des mélanosomes et RAB32 régule aussi la fission des mitochondries. RAB13 régule l'assemblage des jonctions serrées entre les cellules épithéliales. RAB18 contrôle la formation des gouttelettes lipidiques. RAB22 réquie le trafic entre le TGN et les endosomes précoces et vice versa. RAB5. localisée aux endosomes précoces, aux phagosomes aux cavéosomes ainsi que à la membrane plasmique, régule l'endocytose et la fusion des endosomes avec des vésicules enrobées de clathrine (CCVs), la macropynocitose (avec RAB34) et la maturation des phagosomes précoces (avec RAB14 et RAB22). RAB21 régule l'endocytose via l'intégrine. RAB11 et RAB35 régulaient le recyclage endocytique lente à travers des endosomes de recyclage, tandis que RAB4 régule le recyclage endocytique rapide directement chez les endosomes précoces. RAB15 est impliquée lors du trafic entre les endosomes précoces et les endosomes de recyclage vers la membrane plasmique basolateral. RAB17 et RAB25 contrôlaient le trafic à travers les endosomes de recyclage apicales vers la membrane plasmique apicale. La protéine associée aux endosomes tardifs, RAB7, régule la maturation des endosomes tardifs et des phagosomes, ainsi que leur fusion avec les lysosomes. Une autre GTPase associée aux endosomes tardifs, RAB9, réquie le trafic entre les endosomes tardifs et le TGN. (Tiré de (Stenmark, 2009))

La localisation de chaque Rab permet de les utiliser comme des marqueurs spécifiques de membranes (Desjardins *et al.*, 1994b, Hutagalung *et al.*, 2011). Une séquence d'acides aminés conservée et nommée F1-F5 distingue les protéines Rab des autres membres de la superfamille des protéines Ras (Pereira-Leal *et al.*, 2001).

Les protéines Rab circulent entre le cytosol et la membrane de différents compartiments. Ce processus est connu comme le cycle des Rabs et est une étape critique pour la régulation du trafic intracellulaire (Hutagalung *et al.*, 2011). Une fois que chaque Rab est traduite, elle devient associée à une protéine chaperonne des Rabs (REP) qui permet les modifications lipidiques mentionnées auparavant. C'est de cette façon que chaque Rab trouvera sa membrane cible (Alexandrov *et al.*, 1994) et qu'elle deviendra active pour permettre son interaction avec d'autres protéines effectrices pour faciliter le trafic intracellulaire (Stenmark, 2009). Ces protéines effectrices ont plusieurs fonctions incluant le trafic vésiculaire, la fusion et fission vésiculaire, et peuvent aussi activer d'autres Rabs (Flannagan *et al.*, 2012).

La famille des Rab GTPases comprend environ 70 protéines. La plupart des études sont concentrées sur Rab5 et Rab7, protéines dont nous discuterons plus en détail dans les chapitres suivants. Cependant, il est important de remarquer que d'autres membres de la famille ont été montrées comme ayant de rôles importants lors de la maturation des phagosomes. C'est le cas de Rab10, présent au phagosome précoce, et qui semble faciliter le recyclage de certaines protéines du phagosome. En absence de Rab10, la maturation du phagosome est retardée (Cardoso *et al.*, 2010). Aussi, au niveau du phagosome précoce, Rab11a régule la fusion des endosomes précoces et les vésicules dérivées du réseau du Golgi (Husebye *et al.*, 2010).

En absence de Rab20 et Rab39 la maturation du phagosome tardif est arrêtée et de plus, en absence de Rab20, Rab22b, Rab32, Rab38 ou Rab43 la livraison de la cathepsine D est bloquée (Seto *et al.*, 2011).

3.2.3. Le phagosome précoce

Le phagosome naissant à la membrane plasmique ne possède aucune propriété microbicide ; le processus de maturation de cette organelle permet de les acquérir. Pendant ce processus, le phagosome subira des changements au niveau du pH luménal ainsi qu'au niveau du contenu protéique (Figure 1.3), qui permettront la dégradation des particules ou des microorganismes pathogènes phagocytés. Brièvement, le processus comprend la fusion du phagosome naissant avec des endosomes précoces, des endosomes tardifs et des lysosomes, ainsi que divers évènements de fissions vésiculaires qui permettent à la vésicule de se défaire de certains constituants (Desjardins *et al.*, 1994b, Desjardins *et al.*, 1997b, Imbuluzqueta *et al.*, 2010). Cette séquence d'interactions a pour conséquence des changements morphologiques et biochimiques du phagosome, incluant l'acquisition d'enzymes, de pompes vacuolaires de protons-ATPases et de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, notamment l'isoforme NOX2(Savina *et al.*, 2006).

Après l'internalisation de la particule, le phagosome entre dans le processus de maturation phagosomale, caractérisée par des fusions séquentielles avec des composantes de la voie endocytique tels que l'endosome précoce, l'endosome tardif et le lysosome. Chaque composante apporte au phagosome différentes protéines qui peuvent être utilisées comme des marqueurs vésiculaires de divers évènements de fusion. L'acidification augmente à mesure que la maturation du phagosome a lieu.



Figure 2.3. Schéma des évènements de la maturation du phagosome.

Suite à l'internalisation des particules, le phagosome suit une transformation importante, ce qui permet la création d'une organelle microbicide et capable de dégrader dites particules. Le phagosome en voie de maturation interagit en succession avec plusieurs sous-compartiments de la voie endocytique afin de générer des vacuoles avec des caractéristiques biochimiques distinctes. Les étapes reconnues de la maturation du phagosome sont les étapes précoce, intermédiaire, tardif et phagolysosomale. Au fur et à mesure que le phagosome mature, il devient de plus en plus acide à cause d'une livraison des ions H^+ à son lumen via la pompe ATPase vacuolaire (V-ATPase). Par ailleurs, le phagosome augmente sa capacité de dégradation grâce à un enrichissement des hydrolases et des autres protéines antimicrobiennes (Tirée de (Flannagan *et al.*, 2012)).

La voie de maturation phagosomale interagit avec la voie endocytique et partage diverses caractéristiques de cette voie (Vieira et al., 2002). La voie endocytique est organisée en vésicules qui ont internalisé des ligands liés aux membranes, des protéines transmembranaires, ainsi que certains corps dissouts pour les diriger vers les endosomes précoces. Normalement, les ligands et les récepteurs sont séparés et recyclés lors de cette étape. Une des caractéristiques communes aux endosomes et aux phagosomes précoces est le pH luménal, légèrement acide (pH \approx 6.0). Aussi, ces organelles ne contiennent pas d'enzymes hydrolytiques et sont caractérisées par la présence de marqueurs tels que la GTPase Rab5, l'antigène des endosomes précoces 1 (EEA1) et les récepteurs de transferrine (Boulais et al., 2010, Vieira et al., 2002), qui déclenchent et guident la fusion des phagosomes avec les éléments correspondants de la voie endocytique. Rab5, pour sa part, régule la fusion totale des phagosomes avec des endosomes (Fairn et al., 2012). Dans une étude en 2000, il a été démontré que dans le cas d'une dérégulation de Rab5, les macrophages ayant phagocyté des billes de latex opsonisées avec sérum, ou ayant phagocyté le parasite Leishmania donovani, formaient des phagosomes plus grands que d'habitude. La maturation de ces phagosomes était normale, mais ceux-ci montraient un défaut dans l'élimination du parasite (Duclos et al., 2000).

C'est Rab5 qui, une fois activée, recrute les effecteurs en aval d'EEA1. EEA1, quant à lui, est un homodimère qui présente deux domaines de liaison à Rab5 et qui sert de pont entre deux endosomes précoces qui présentent Rab5 (Dumas *et al.*, 2001, Kitano *et al.*, 2008). En même temps, la PI3K de type III est aussi cruciale pour la production du PI 3-phosphate (PI3P). La PI3P est synthétisée après la fermeture du
phagosome, et il a été démontré qu'elle est essentielle pour les étapes subséquentes de la maturation (Bohdanowicz *et al.*, 2010, Fratti *et al.*, 2001). Parmi les effecteurs de PI3P se trouvent la NADPH et EEA1. En effet, il a été démontré que PI3P sert comme point d'attachement et active plusieurs protéines impliquées lors de la maturation, notamment EEA-1 et la protéine associée aux endosomes, Hrs (Fairn *et al.*, 2012, Fratti *et al.*, 2001).

3.2.4. Le phagosome tardif et le phagolysosome

En comparaison avec les phagosomes précoces, les phagosomes tardifs ont un pH luminal beaucoup plus acide (pH 5.5- 6.0) et ne contiennent pas Rab5. Par contre, ce sont des organelles enrichies en composantes d'endosomes tardifs, tels que Rab7 et des protéines associées aux membranes des lysosomes (LAMPs) (Huynh *et al.*, 2007a, Vieira *et al.*, 2002, Vieira *et al.*, 2003).

L'acidification phagosomale est aussi attribuée au recrutement des ATPases de type vacuolaire (v-ATPases) qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour activer des pompes protoniques (Kinchen *et al.*, 2008, Vinet *et al.*, 2009). L'acidification du phagosome a longtemps été considérée comme une conséquence de la maturation phagosomale. Plus récemment, il a été démontré que cette acidification est aussi essentielle pour le processus-même de maturation (Huynh *et al.*, 2007b). Aussi, quelques études ont montré que le pH acide peut recruter des régulateurs négatifs des Rab, comme des protéines activatrices des GTPases (GAPs). C'est le cas d'études avec *Mycobacterium tuberculosis*, qui ont démontré que la maturation est arrêtée si la fonction de Rab7 est altérée (Feng *et al.*, 1995).

Malgré le rôle des protéines Rab dans les étapes précoces du phagosome, leur rôle au niveau du phagosome tardif été moins étudié. Cependant, plusieurs études ont montré que Rab7 est capable de réguler la transition entre les endosomes précoces et tardifs, ainsi que la modulation de la fusion des lysosomes avec des organelles endocytiques tardives (Bucci *et al.*, 2000, Cantalupo *et al.*, 2001, Harrison *et al.*, 2003, Vieira *et al.*, 2003).

Il a été montré que Rab5 est échangé pour Rab7 lors de l'endocytose, un processus connu comme la « conversion de Rab » (Rink *et al.*, 2005). Le recrutement de Rab7 indépendant de la fusion vésiculaire a aussi été montré dans l'élimination de cellules apoptotiques chez les nématodes (Yu *et al.*, 2008). Un candidat potentiel pour la régulation de ce processus est le complexe d'assortiment des protéines vacuolaires et de fusion homotypique (HOPS), impliqué dans le recrutement de Rab7 pendant l'endocytose (Rink *et al.*, 2005). Plus récemment, des études sur *Caenorhabditis elegans* ont montré que la protéine de fusion vacuolaire, Mon1/ab, est une effectrice de Rab5 chez le phagosome précoce. Une fois recrutée au phagosome, Mon1a/b faciliterai l'acquisition et l'activation de Rab7 (Poteryaev *et al.*, 2010).

Certaines protéines effectrices de Rab7 ont été identifiées. La protéine lysosomale d'interaction avec Rab7 (RILP) et la protéine reliée à la protéine de liaison à l'oxysterol 1 sont deux des protéines effectrices de Rab7 étudiées à date. Ces deux protéines sont accumulées dans les endosomes tardifs, dans les phagosomes et dans les lysosomes, de manière Rab7-dépendante (Cantalupo *et al.*, 2001, Johansson *et al.*, 2007). Plus récemment, un des composants du complexe de la PI3K de classe III (PI3KC3), Rubicon, a été montré comme ayant un rôle lors du contrôle de la maturation endosomale (Sun *et al.*, 2010). De plus, la protéine contient des domaines FYVE et Coiled-Coil, connue comme FYCO1, et a été identifiée comme une autre protéine effectrice de Rab7 lors de l'autophagie (Pankiv *et al.*, 2010).

Une autre voie de régulation du rôle de Rab7 lors du trafic endosomal tardif a été montré plus récemment. En effet, la protéine phosphatase lipidique PTEN régule la déphosphorylation de Rab7 dans des résidus sérine (S72) et tyrosine (Y183) ce qui suggère un rôle important des phosphatases lors de la maturation des phagosomes (Shinde *et al.*, 2016). Finalement, il a été montré que la voie Rab7-RILP, importante pour le transport rétrograde des lysosomes, est promue par la présence du cholestérol (Rocha *et al.*, 2009). De manière intéressante, ce transport peut aussi être effectué par la protéine TRPML1, indépendamment de la voie Rab7-RILP, ce qui suggère des fonctions non redondantes pour TRPML1 et Rab7-RILP (Li *et al.*, 2016).

Les LAMPs sont des protéines transmembranaires hautement glycosylées, qui comptent parmi les composantes les plus abondantes des lysosomes. Dû aux évènements de fusion décrits auparavant, elles sont aussi présentes dans les phagosomes tardifs ainsi que dans les phagolysosomes (Eskelinen *et al.*, 2003). Deux protéines principales ont été étudies dans ce groupe de protéines, LAMP-1 et LAMP-2, avec 37% d'homologie au niveau des séquences des acides aminés et les deux sont impliquées lors de l'autophagie et lors de la biogenèse du lysosome. LAMP-2 est exprimé de manière spécifique dans les différents tissues. Chez les souris déficientes en LAMP-2, le taux de mortalité peut atteindre jusqu'à 50% à 20-40 jours d'âge. Par contre, lorsque LAMP-1 n'est pas exprimé, les souris sont viables et même fertiles (Eskelinen, 2006).

Il a été montré que LAMP-1 n'est pas nécessaire pour la morphologie ou la fonction des lysosomes (Andrejewski *et al.*, 1999), mais la maturation des phagolysosomes est affectée en absence de cette protéine puisqu'elle est essentielle à la fusion des phagosomes avec les lysosomes (Huynh *et al.*, 2007a). En même temps, Rab7 est présente au phagosome dans les cellules déficientes en LAMP-1, ce qui suggère que l'association de Rab7 avec les phagosomes est indépendante de LAMP-1.

Les lysosomes sont les dernières organelles à interagir avec le phagosome lors de sa maturation. Avec un contenu riche en protéases hydrolytiques et en lipases, ils ont aussi un pH extrêmement acide (pH 4.5-5.5). Souvent, LAMP-1 et d'autres enzymes hydrolytiques, comme la cathepsine D, sont utilisées comme des marqueurs de lysosomes, mais sont aussi présentes chez les endosomes tardifs. Vers la fin du processus de maturation, le phagosome fusionne avec les compartiments lysosomaux, formant le phagolysosome, un compartiment hautement protéolytique et acide (Luzio *et al.*, 2003). Il a été démontré que cette fusion peut être bloquée par l'ammoniaque ainsi que par des agents pathogènes intracellulaires tel *Mycobacterium tuberculosis* et *Leishmania* (A. H. Gordon *et al.*, 1980, Lodge *et al.*, 2005, Vergne *et al.*, 2005).

La maturation du phagosome et la biogénèse du phagolysosome permettraient à l'organelle d'acquérir ces caractéristiques microbicides dont nous allons discuter plus en détail. La particule ou l'agent pathogène englobé est digéré par des enzymes

hydrolytiques activées grâce au pH acide du phagolysosome. Cette dégradation permet la présentation de ligands additionnels à la surface du macrophage, servant à la reconnaissance d'épitopes par d'autres cellules du système immunitaire. En contrepartie, le relâchement de composantes bactériennes permet aux autres phagocytes de déterminer si le microorganisme est mort ou encore vivant (Underhill *et al.*, 2012).

3.2.5. Production des espèces réactives d'oxygène (ROS) et des intermédiaires réactives de nitrogène (RNI).

Parmi les systèmes microbicides les plus importantes des cellules phagocytiques, nous trouvons la réponse oxydative et la réponse via la synthase d'oxyde nitrique inductible (iNOS) (Fang, 2004). De manière générale, tous les phagocytes polymorphonucleaires expriment l'oxydase NADPH NOX2 et iNOS. Cependant, les neutrophiles produisent plus de ROS que les macrophages, tandis que ces dernières produisent plus de RNI (Nathan *et al.*, 2000).

Comme mentionné auparavant, l'acquisition de l'oxydase NADPH joue un rôle important lors de la maturation du phagosome. En effet, c'est grâce à cette molécule que la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) a lieu. NOX2 est un complexe multimérique des protéines qu'est formé en réponse des stimuli pro inflammatoire afin de permettre la production de l'anion superoxyde (O₂⁻). NOX2 est formée par les protéines membranaires gp91^{phox} et gp22^{phox} (ensemble référés comme le flavocytochrome) et des protéines cytosoliques p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox}. Suite à l'activation des composantes cytosoliques, ils s'associent avec les GTPases Rac1 et Rac2 pour, par la suite, s'associer avec le flavocytochrome (Figure 1.4).

L'élimination des agents pathogènes intraphagosomaux est dépendant d'un « burst » oxydatif produit via le complexe NOX2. Même si chez les macrophages, ce burst est relativement moins fort que celui observé chez les neutrophiles, le rôle des ROS chez le phagosome du macrophage est néanmoins important (Russell *et al.*, 2009,

Rybicka *et al.*, 2012). Parce que NOX2 est assemblé dans la membrane cellulaire, ces fonctions ont lieu tant à l'intérieur que à l'extérieur de la cellule (Kotsias *et al.*, 2013).



Figure 2.4. Mécanismes antimicrobiens chez les phagocytes.

A-B. Représentation schématique de l'assemblage de l'oxydase NADPH. Dans les cellules en repos (A) les différents composants de l'oxydase restent séparés. Suite à une signale d'activation le flavocytochrome est déplacé au phagosome et les composants cytotoxiques sont recrutés, pour former le complexe oxydase. Représentation simplifiée du phagocyte. L'oxyde nitrique (NO) es generé par iNOS tadis que l'anion superoxide est genereé par l'oydase NADPH, et cet anion peut être transformée en proxide d'hydrogène (H_2O_2), acide hypoclorique (HOCL) ou peroxynitrite (ONOO⁻) (Modifiée de (Fang, 2004, Kotsias *et al.*, 2013)).

De sa part, les RNIs participaent aussi à de l'élimination des agents pathogènes, via une dégradation non-spécifique contre des protéines cellulaires, des lipides et même des acides nucléiques. En effet, la formation de NO chez les phagocytes via iNOS devient fondamentale à la dégradation de certains parasites comme *Leishmania* et *Trypanosoma* (Chakravortty *et al.*, 2003, Vazquez-Torres *et al.*, 2000).

De la même façon que plusieurs agents pathogènes ont développé des stratégies pour échapper l'acidification du phagolysosome, ils existent des microorganismes qui ont développé des stratégies pour se protéger contre les ROS et les RNIs. C'est le cas de *M. tuberculosis* qui peut empêcher la production de RNI par l'interférence d'une des protéines d'échafaudage d'iNOS, la EBP-50 (Davis *et al.,* 2007). Nous discuterons plus en détail des différentes stratégies que certains microorganismes ont développées pour éviter la phagocytose ou pour modifier la maturation du phagosome dans la partie 6 de cette revue de littérature.

Autre que son rôle lors de la maturation du phagosome, les ROS et les RNIs sont aussi connus pour leurs rôles lors de la signalisation cellulaire, la régulation du ton vasculaire, l'endommagement de tissu et dans le contrôle de l'inflammation (Fang, 2004).

3.2.6. Le protéome et le phosphoprotéome du phagosome

Récemment, plusieurs équipes se sont penchées sur l'étude de la composition protéique du phagosome, via différentes techniques de protéomique. Une schématisation des protéines identifiées, classées selon leur organelle d'origine, se trouve dans la figure 1.5. De nouvelles techniques d'isolation du phagosome permettent d'obtenir des échantillons de pureté élevée (Stuart *et al.*, 2007). Des protéines considérées *a priori* comme des impuretés ont été identifiées comme originaires de l'interaction du phagosome avec l'autophagosome, tel que des protéines ribosomales (Sanjuan *et al.*, 2007). Une étude a démontré que la plupart des protéines trouvées dans le phagosome sont hautement conservées chez les eucaryotes, avec plus de 70% du protéome étant conservé (Boulais *et al.*, 2010). De plus, l'étude a mis

en évidence que les propriétés fonctionnelles du phagosome sont possiblement apparues via un remodelage des protéines présentes, par l'addition de nouvelles composantes et par la duplication de protéines déjà existantes, produisant des machineries très complexes et d'origine mixte.



Figure 2.5. Le protéosome du phagosome

Origine des protéines phagosomales et ses differents rôles. Endosome précoce (EE), endosome tardif (LE), lysosome (Ly), réticulum endoplasmique (ER). (Tirée de (Boulais *et al.*, 2010).

Étant donné l'importance de la phosphorylation dans la régulation de la signalisation, il n'est pas surprenant que diverses études se soient focalisées sur le phosphoprotéome global de la cellule, ainsi que sur celui de chaque organelle. Dans le cas du phagosome, on retrouve plus de 1000 protéines phosphorylées ainsi que

presque 3000 sites de phosphorylation (Trost *et al.*, 2009). Ces nombres deviennent encore plus étonnants quand nous les comparons avec le phosphoprotéome d'autres organelles. Par exemple, dans le cas du noyau cellulaire, nous nous attendrions à un phosphoprotéome considérablement plus grand quand on considère que les cascades de signalisation ont besoin d'un haut niveau de régulation. Pourtant, avec une méthode similaire à celle utilisée avec le phagosome, on ne trouve que 580 protéines phosphorylées et presque 2000 sites de phosphorylation (Figure 1. 6). C'est également le cas de plusieurs autres organelles (Trost *et al.*, 2010).

3.3 Échappement de la phagocytose et de la maturation du phagosome par des agents pathogènes.

Comme nous l'avons mentionné auparavant, la phagocytose sert de première ligne de défense contre une panoplie de microorganismes pathogènes intracellulaires. Ce n'est pas étonnant alors que plusieurs agents pathogènes aient développé des stratégies pour éviter la phagocytose ou pour modifier la maturation du phagosome à leur avantage. Nous discuterons en détail de quelques stratégies mentionnées dans le tableau 1.2.

3.3.1. Modulation de la signalisation cellulaire

Plusieurs agents pathogènes affectent la signalisation cellulaire de leur hôte pour soi moduler, soi arrêter l'activation cellulaire. Un des exemples les plus connues est celui de *Leishmania* qui relâche des protéines effectrices pour activer des phosphatases du macrophage, ce qui inhibe la signalisation via Jak-STAT et MAPK (M. A. Gomez *et al.*, 2009). Certains agents pathogènes peuvent aussi réguler à la baisse l'expression de l'IFNγ, comme c'est le cas de *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania* (Thi et al., 2012). D'autres exemples de parasites qui modulent la signalisation de l'hôte inclus *Yersenia sp.* qui exprime aussi un tyrosine phosphatase, YopH, qui hydrolyse plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (i.e Cas) (Bliska *et al.*, 1991).



Figure 2.6. Le phosphoprotéome total de la cellule.

Des exemples des analyses phosphoprotéomiques subcellulaires. Notez le nombre exacerbé de protéines phosphorylées (Protéines-P) et de sites de phosphorylation (Sites-P) dans le phagosome (carre mauve pale). (Trost *et al.*, 2010)

Strategie	Microorganisme	Méchanisme de survie
Échappemente de la phagocytose	Staphylococcus aureus	Inhibition de la reconnaissance par les FcR avec la protéine A
	Listeria monocytogenes	Perméabilisation du phagosome par listeriolysin O
	<u>Escherichia coli</u>	Production de la protéine OmpA qui inhibe la réponse du complément
	Yesernia sp.	Production de protéines effectrices via le TTSS
	Streptococcus pneumonia	Expression de polysaccharides de surfaces qui inhibe la réponse du complément
	<u>Shiegella flexneri</u>	Lyse du phagosome via le système de sécrétion de type III Mxi-Spa
	<u>Trypanosoma cruzzi</u>	Lyse du phagosome par la sécrétion de Tc-TOX
Arrêt de la maturation du phagosome	Mycobacterium tuberculosis	Arret de la maturation par expression des protéines effectices (i.e : SapM). Modulation de l'acquisition d'EEA1 et de v-ATPase.
	Burkholderia cenocepacia	Modulation de l'activation de Rab7 et de l'acidfication du phagosome.
	<u>Leishmania spp.</u>	Modulation de la maturation par LPG, incluant l'acquisition de v-ATPase et de NADPH oxydase
	Salmonalla antarica	
	Histonlasma cansulatum	
	Neisseria gonorrheae	Perméabilisation de la membrane phagosomale par la porine PorB
Redirection de la maturation du phagosome		Association avec des vésigulos du rétigulum andeplasmique
	<u>Legionena prieumoprina</u>	Recrutement d'ARF-1 et Rab1
	<u>Toxoplasma gondii</u>	Formation des vacuoles non fusogéniques associées aux mitochondries et au réticulum endoplasmique.
Biogenèse d'une vacuole unique	Chlamydia trachomatis	Formation d'une vacuole unique pour faciliter la réplication. Cette vacuole ne recrute pas Rab5 ou Rab7.
	<u>Toxoplasma gondii</u>	Formation d'une vacuole qui ne s'acidifie pas, mais qui permettre l'obtention des nutriments solubles.

Tableau 1.2. Exemples des agents pathogènes intracellulaires qui échappent au processus de la

maturation du phagosome²

³ Modifié de (Flannagan *et al.*, 2012, Haas, 2007, Scott *et al.*, 2003)

Escherichia coli peut inhiber la phagocytose médiée par $Fc\gamma R$ et CR3 ainsi que les interactions myosine-actine (lizumi *et al.*, 2007, Marches *et al.*, 2008). Finalement, *Haemophilus ducreyi* peut inhiber la famille des kinases Src ce qui inactive plusieurs voies de signalisation (Vakevainen *et al.*, 2003).

3.3.2. Échappement de la phagocytose

Pour éviter la reconnaissance par les phagocytes, quelques agents pathogènes présentent des molécules de surface qui, dans certains cas, peuvent altérer le processus de phagocytose directement. Par exemple, *Staphylococcus aureus* exprime la protéine A qui inhibe la phagocytose en interagissant avec les récepteurs Fc (Foster, 2005). Des bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Escherichia coli* expriment des polysaccharides de surfaces et la protéine OmpA, respectivement, qui leur permettent d'échapper à la réponse du complément (Blom *et al.*, 2009).

L'échappement de la phagocytose peut aussi être faite par la modulation des voies de signalisation phagocytique. C'est le cas de Yersinia qui a un système de sécrétion de type III, aussi connu comme TTSS, qui produit différentes protéines effectrices pour empêcher la phagocytose (Ernst, 2000). En plus, une des espèces de Yersinia, Y. enterocolitica, possède l'adhesine YadA qui permet d'éviter la déposition du composant du complement iC3b (China *et al.*, 1993). Finalement, il existent des bactéries comme Salmonella qui sécrètent des protéines, dans ce cas-ci, une phosphatase, capable de perturber l'actine du cytosquelette (Fu *et al.*, 1998).

Malgré le fait que quelques microorganismes pathogènes n'arrivent pas à échapper à la phagocytose, ils sont capables de s'évader du phagosome avant que celui-ci n'acquière des caractéristiques hydrolytiques. C'est le cas de *Listeria monocytogenes*, une bactérie Gram⁺ qui possède trois protéines effectrices pour échapper au phagosome, notamment la lysteriolysine O, qui produit des pores dans la

membrane phagosomale afin de perturber les gradients ioniques et faciliter l'échappement (Flannagan *et al.*, 2009). Une fois dans le cytoplasme du phagocyte, la bactérie se trouve dans un environnement riche en nutriments et protégé de la reconnaissance du système immunitaire, ce qui lui permet de proliférer et de continuer son infection. *Mycobaterium tuberculosis* est aussi capable d'échapper au phagosome grâce au système de sécrétion précoce de l'antigène nommé ESX (van der Wel *et al.*, 2007). Grâce à sa protéine kinase G (Mtb), *M. tuberculosis* peut supprimer l'activité de la protéine kinase C du macrophage, ce qu'inhibe le burst oxydative chez les macrophages et qui a pour conséquence une diminution du taux de phagocytose de la bactérie (Chaurasiya *et al.*, 2009).

3.3.3. Arrêt de la maturation du phagosome.

Mycobacterium tuberculosis est un des agents pathogènes qui arrêtent la maturation du phagosome à l'aide de différentes stratégies. En premier lieu, nous avons la sécrétion de SapM, une phosphatase qui hydrolyse le PI3P, ce qui empêche la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs. Les phagosomes contenant *M. tuberculosis* possèdent Rab5a à leur surface, mais manquent des effecteurs tel que EEA1 (Vergne *et al.*, 2005). De même, la protéine MptpB a été montrée comme essentielle à la survie du parasite dans le phagosome, par la manipulation du métabolisme du PI de l'hôte (NJ. Beresford *et al.*, 2009, N. Beresford *et al.*, 2007). Aussi, les phagosomes contenant cette bactérie présentent un niveau d'acidité beaucoup plus bas, comparativement aux phagosomes typiques (Deretic *et al.*, 1999), ce qui pourrait être associé à un défaut au niveau du recrutement de la v-ATPase (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Dernièrement, il a été démontré que l'activation du facteur nucléaire kappa des cellules B activées (NF- κ B) est nécessaire à la formation du phagolysosome (Gutierrez *et al.*, 2008).

Leishmania est un autre microorganisme pathogène connu pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Liese *et al.*, 2008, Olivier *et al.*, 2005). Même si la plupart des études sur ce sujet se sont concentrées sur les mécanismes externes au phagosome (M. A. Gomez *et al.*, 2009), il existe des études récentes qui ont démontré

que des mutants de *Leishmania donovani* qui n'expriment pas de lipophosphoglycan (LPG) en surface forment des phagolysosomes fonctionnels tandis que le parasite de type sauvage réside dans un phagosome non fusogénique (Desjardins *et al.*, 1997a, Lodge *et al.*, 2005). Plus récemment, des travaux dans notre laboratoire ont démontré que le LPG chez *Leishmania* cause l'exclusion de la v-ATPase des phagosomes, en empêchant le recrutement de la synaptotagmine V et, par conséquent, les phagosomes n'acquièrent pas le niveau d'acidité typique des phagosomes matures (Vinet *et al.*, 2009).

Les rôles du LPG ne s'arrêtent pas là. Il a aussi été démontré qu'il est nécessaire pour que le parasite puisse moduler les différents évènements de fusion dont nous avons discuté auparavant (Dermine *et al.*, 2005). Aussi, le LPG bloque la formation de l'oxydase NADPH, ce qui résulte en une vacuole protégée de la réponse immune de l'hôte (Lodge *et al.*, 2006b). Finalement, des défauts au niveau du recrutement de Rab7 dans les phagosomes contenant *Leishmania* corrèlent avec l'inhibition de la maturation des phagosomes (Scianimanico *et al.*, 1999).

3.3.4. Redirection de la maturation du phagosome.

Un exemple clair de ce type de modification est *Legionella pneumophila*, une bactérie Gram⁻. Les phagosomes qui contiennent cette bactérie la transportent vers le réticulum endoplasmique. *L. pneumophila* a un système de sécrétion Dot/Icm qui libère une signal d'inhibition de la fusion avec les organelles endocytiques (Roy, 2002). Après cette modulation, des vésicules couvertes de Sarl-COPII provenant du réticulum endoplasmique, fusionnent avec les phagosomes qui contiennent *L. pneumophila* (Flannagan *et al.*, 2009).

L. pneumophila est aussi capable de manipuler l'activité du facteur de ribosylation de l'ADP 1 (ARF1), ce qui a comme effet le recrutement de Rab1 et ARF1 vers le phagosome qui contient la bactérie, régulant la fusion du phagosome avec le ER. De manière simultanée, *L. pneumophila* perturbe le transport dépendant des microtubules grâce à d'autres facteurs de virulence (Flannagan *et al.*, 2009).

4. Signalisation intracellulaire par phosphorylation des résidus de

tyrosine

La phosphorylation des protéines est considérée comme un des mécanismes de base régulant de la physiologie cellulaire. Plusieurs voies de signalisation sont contrôlées par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation, et c'est un phénomène conservé dans plusieurs organismes. Les différentes voies régulées par les récepteurs mentionnés auparavant, dont les voies liées aux récepteurs FcyR présent chez les macrophages et lors de la phagocytose, n'y font pas exception.

Bien que la phosphorylation des résidus serine/thréonine est considérée comme étant plus abondante, le rôle de la phosphorylation des résidus tyrosine est considéré comme un mécanisme de régulation clé dans plusieurs aspects de la physiologie des eucaryotes (Tautz *et al.*, 2013).

Malgré que la régulation de la phosphorylation des résidus tyrosine se fasse autant par les kinases que les phosphatases, la plupart des études se sont concentrées sur les kinases impliquées dans la signalisation intracellulaire. La première protéine tyrosine phosphatase (PTP) a été purifiée et clonée environ dix ans après la découverte de la première protéine tyrosine kinase (PTK) (Alonso *et al.*, 2004). Néanmoins, plusieurs études ont démontré l'importance des PTPs au niveau de la signalisation intracellulaire (Neel *et al.*, 1997, J. Zhang *et al.*, 2000, Z. Y. Zhang, 2002, Z. Y. Zhang, 2005) ainsi que lors de la prolifération cellulaire (Hunter, 2009) et la réponse immune (Tonks, 2006).

Puisque la littérature sur les kinases est assez vaste, cette revue de littérature sera focalisée sur les familles de PTKs de types Src et Syk, ainsi que sur la famille de PTPs de type non récepteur. Les phosphotyrosines représentent environ seulement 0.1% des acides aminés phosphorylés, mais jouent un rôle très important au niveau de la signalisation intracellulaire (Stoker, 2005). La phagocytose n'en fait pas exception ; des kinases et des phosphatases régulent le cytosquelette d'actine chez les macrophages, tel lors de la formation des pseudopodes (Baruzzi *et al.*, 2008, Pixley *et al.*, 2004). Le tableau 1.3 présente un résumé des kinases et des phosphatases ayant des rôles démontrés au niveau de la phagocytose.

Tableau 1.3. Quelques protéines tyrosines kinases et phosphatases impliquées dans la régulation de la phagocytose³

Famille			Effet
Kinases (PTKs)	SFK	Hck	BMMs déficients en Hck montrent une phagocytose réduite.
		Fgr	Régulation négative de la phagocytose en association avec le complexe SIRPα-SHP-1.
		Lyn	BMMs déficients en Lyn montrent une phagocytose réduite.
		Src	Phosphorylation de FcγRIIA <i>in vitro</i> .
		Fyn	Phosphorylation de FcγRIIA <i>in vitro</i> .
	Syk		BMMs déficients en Syk sont incapables d'ingérer des particules opsonisées avec des IgG.
			La sous-unité γ n'est pas phosphorylée en absence de Syk dans les BMMs.
Ps)	SHP-1		Surexpression de SHP-1 a comme effet une réduction de la phagocytose. En association avec FcγRIIA, semble être capable d'abolir toute la phosphorylation des tyrosines dans la cellule.
Phosphatases (PT			Régulation négative de la phagocytose en association avec SIRP α .
	SHP-2		Régulation positive de la phagocytose induite par FcγR.
	CD148/ CD45		Des BMMs doublement déficients en CD148 et CD45 montrent une phagocytose réduite. Régulation de la signalisation via ITAMs ; régulation du regroupement de la dectine-1, nécessaire pour la synapse phagocytique.

ΡΤΡσ	Régulation de l'autophagie.
PTP MEG2	Régulation des voies de signalisation pour la phagocytose des cellules apoptotiques. Régulation des évènements de fusion de membrane lors de la

²Modifié de (Flannagan *et al.*, 2012, Kruger *et al.*, 2002, K. R. Martin *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2011, Zhao *et al.*, 2003).

4.1 La famille des kinases Src (SFKs) et les protéines tyrosines kinases Syk

Suite à l'attachement de ligands et au recrutement de récepteurs, l'activation de ses derniers nécessite une phosphorylation spécifique au niveau des résidus de tyrosine contenus dans les motifs immunorécepteurs d'activation basées en tyrosine (ITAMs). Suite au regroupement des récepteurs Fc, le recrutement de kinase de la famille Src (SFKs) a lieu, ce qui permet la phosphorylation des ITAMs par les kinases Hck, Lyn ou Fgr. (Strzelecka-Kiliszek *et al.*, 2002).

L'importance de ces kinases dans la phagocytose médiée par les $Fc\gamma R$ a été mise en évidence dans les études avec des souris déficientes en ces trois kinases. Les macrophages dérivés de souris déficientes en Hck, Lyn et Fgr exhibent un problème majeur dans les réponses fonctionnelles et de signalisation, incluant une baisse de la phosphorylation des tyrosines et dans l'efficacité de la phagocytose. (Fitzer-Attas *et al.*, 2000).

Normalement, les kinases Src demeurent inactives en raison d'interactions intramoléculaires entre les tyrosines C-terminal phosphorylées et leur propre domaine SH2. Ceci permet à la protéine de se replier et de bloquer l'accès des substrats à son site catalytique (Garcia-Garcia *et al.*, 2002). L'activation de la famille Src implique aussi la déphosphorylation de la tyrosine C-terminale pour sortir de son état inactif. Cette déphosphorylation est complétée par la phosphatase CD45 ainsi que par des interactions protéine-protéine qui mènent à leur autophosphorylation. Cette dernière active certaines phosphatases qui complètent la déphosphorylation initiale (Garcia-Garcia *et al.*, 2002). Cette activation déclenche le recrutement d'autres protéines qui présentent des domaines SH2, comme la tyrosine kinase de la rate, Syk (Johnson *et*

al., 1995, Strzelecka-Kiliszek *et al.*, 2002). La phagocytose médiée via FcγR a besoin de l'activation de Syk; il a été montré que les macrophages déficients en Syk présentent un défaut dans la phagocytose de particules opsonisées avec des IgG, ainsi qu'un défaut dans la signalisation par FcγR (Crowley *et al.*, 1997, Kiefer *et al.*, 1998). Les kinases Syk activées permettent au processus de phagocytose de continuer en interagissant avec d'autres molécules en aval, par exemple la phosphatidylinositol (PI) 3-kinase (PI3K), la phospholipase C (PLC) et des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPKs).

4.2 Les tyrosines phosphatases

La famille des tyrosines phosphatases est la plus grande famille des phosphatases, ayant un motif actif $C(x)_5R$. Elle est divisée en 4 groupes : Les PTPs récepteurs classiques (RPTPs) (Andersen *et al.*, 2004); les PTPs non récepteurs classiques (NRPTPs); les PTPs de double spécificité (dsPTPs) et les PTPs de faible poids moléculaire (LMPTP) (Alonso *et al.*, 2004). Les RPTPs et les NRPTPs sont regroupés sous la classe I des PTPs et seront décrites plus en détails :

4.2.1 Les PTPs classiques basées en cystéine (classe I)

Chez l'humain, il existe 99 PTPs classiques, dont 38 appartenant à la classe I. Toutes ces PTPs ont des orthologues chez la souris. C'est à cause de la haute spécificité de substrat (résidus tyrosine) chez les PTPs qu'elles sont reconnues comme des PTPs classiques. Toutes les phosphatases de classe I ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Lim *et al.*, 2010), basée sur des structures similaires. Selon la localisation intracellulaire, ces PTPs sont divisées en type récepteur, localisées surtout au niveau de la membrane plasmique, ou en type non récepteur, se retrouvant dans plusieurs compartiments cellulaires ainsi que dans le cytosol. Tel que mentionné auparavant, ces PTPs jouent un rôle au niveau de la phagocytose et du chimiotactisme chez les macrophages, mais aussi au niveau de l'adhésion cellulaire à d'autres cellules ou au substrat, et au niveau du développement cellulaire. PTP-1B, une protéine de 50 kDa et la première PTP à être isolée (Tonks *et al.*, 1988), est connue pour son rôle dans la réponse à l'insuline, ainsi que dans la signalisation via les intégrines (Tonks, 2006). PTP-1B est souvent utilisée comme le point de référence pour les descriptions de structures des autres membres de la famille, considérant que la structure générale est hautement conservée comprenant une feuillet β centrale, entourée par des arrangements d'hélices α (Tautz *et al.*, 2013). Il a été montré que plusieurs MAPKs ainsi que des protéines traductrices du signal et activatrices de la transcription (STAT) sont des substrats de PTP-1B; grâce à cette régulation de la phosphorylation de ces protéines. PTP-1B régule l'activation des macrophages (Traves et al., 2014). TC-PTP, une protéine de 45 kDa, est l'homologue le plus proche de PTP-1B. Tandis que PTP-1B est localisée dans le réticulum endoplasmique (ER), TC-PTP possède un signal de localisation intra-nucleaire, mais peut aussi s'attacher au ER et à la membrane plasmique selon le stimulus. Les deux enzymes reconnaissent des substrats différents mais régulent des voies similaires. C'est le cas de la voie de signalisation de l'interféron γ (IFN- γ) où PTP-1B et TC-PTP régulent l'activité des Janus kinases (JAK) Jak2 et Jak1, respectivement, ou de la réponse à l'hormone de croissance (GH), dont TC-PTP régule Jak2 ainsi que STAT5 tandis que PTP-1B régule STAT1 (Bourdeau et al., 2005). Malgré le chevauchement des voies de signalisation que régulent ces phosphatases, il a été démontré que leurs rôles ne sont pas redondants au niveau de la voie de l'IFN-y chez les macrophages. Leur absence simultanée confère un phénotype létal lors de l'embryogenèse. Chez un hétérozygote pour une double déficience en PTP-1B et TC-PTP, les macrophages sont hautement sensibles à l'IFN- γ . Finalement, l'absence de TC-PTP (TC-PTP KO) a un effet létal sur l'organisme. (Heinonen et al., 2009).

D'autres membres de la famille sont aussi impliqués lors de la régulation des STATs. SHP-2 peut réduire la phosphorylation de STAT3 chez des cellules qui expriment la phosphatase de manière constitutive et *in vitro*, et peut déphosphoryler STAT5. En absence de PTP-BL, une phosphatase associée à la mort cellulaire via Fas, STAT4 est surphosphorylée et, *in vitro*, PTP-BL est capable de déphosphoryler pSTAT6 (Bohmer *et al.*, 2014). Finalement, PTPN22, une PTP associée à la kinase Csk et ayant un rôle lors de la régulation de la famille de PTKs Src, aurait aussi un lien lors de la phosphorylation de STAT6. Des macrophages qui n'expriment pas PTPN22 ont une

activation à la hausse de NF κ B ainsi qu'une surexpression de l'interleukine (IL) IL-12p70, IL-23 et de l'oxyde nitrique (NO), suite à une stimulation avec l'IFN γ et du LPS (Kozicky *et al.*, 2015).

4.2.2 La protéine phosphatase contenant le domaine d'homologie SH2 (SHP-1)

SHP-1 est une protéine cytosolique de 68 kDa qui est exprimée principalement, mais pas exclusivement, dans les cellules hématopoïétiques (Bouchard et al., 1994, Neel et al., 1997, L. Su et al., 1996, F. W. Tsui et al., 2006). SHP-1 a la caractéristique d'avoir deux domaines d'homologie SH2, un des motifs de reconnaissance des tyrosines phosphorylés les plus importants. Les deux domaines sont localisés dans la partie N-terminale de la protéine (Figure 1.7A). Normalement, les deux motifs SH2 induisent le repliement de la protéine, cachant le site catalytique de la protéine et la rendant inactive. Suite à un signal d'activation, la protéine subit des changements conformationels qui exposent le site catalytique. La structure de la protéine SHP-1 a été étudiée par cristallographie par Yang et son équipe en 2003. Puis en 2011, Wang et son équipe ont réussi à produire un modèle par cristallographie dont le site catalytique est ouvert (Fig. 1B) (Wei Wang et al., 2011a, Yang et al., 2003), et un modèle de la restructuration conformationelle a été proposé. SHP-1 partage 60% d'identité avec la PTP SHP-2. Le domaine SH2 C-terminal (SH2-C) de ces protéines est hautement mobile, ce qui suggère qu'il est en charge de la recherche des phosphopeptides pour l'activation de l'enzyme lors des étapes initiales d'activation. Le domaine SH2 Nterminal (SH2-N) serait pour sa part en charge de la régulation de plusieurs évènements de déphosphorylation, tel au niveau de la transduction de la signalisation, par exemple en aval du récepteur d'interleukine 3 (Paling et al., 2002) et de quelques immunorécepteurs (D'Ambrosio et al., 1995). Finalement, SHP-1 joue un rôle au niveau de la différenciation des cellules gliales, au niveau de certaines fonctions des cellules dendritiques (Ramachandran et al., 2011) ainsi que dans l'activation de la kinase Src et des MAPK dépendent de RAS (Frank et al., 2004).

Les connaissances que nous possédons à ce jour sur le rôle de SHP-1 dans les cellules hématopoïétiques proviennent des nombreuses études chez les souris nommées « motheaten (^{me}/_{me})» (Green *et al.*, 1975, Minton, 2013). Ces souris possèdent une mutation ponctuelle de l'allèle *me*, conférant une déficience complète en SHP-1.

Ces souris présentent des défauts au niveau du recrutement des prothymocytes, soit une réponse de cellules T et B défectueuse et un problème au niveau des cellules « natural killers » (NK) (H. W. Tsui *et al.*, 1993). De plus, ces souris montrent une réponse inflammatoire exacerbée ainsi qu'une espérance de vie courte (Shultz *et al.*, 1976). Malgré que la souris ^{me}/_{me} soit un modèle exceptionnel pour l'étude du rôle de SHP-1, les limites de ce modèle animal ont mené à la production de multiples lignés cellulaires immortalisées. Forget et collaborateurs (Forget *et al.*, 2001) ont immortalisé des lignées de macrophages dérivés de la moelle osseuse des souris ^{me}/_{me} ainsi que de souris de type sauvage, nommées initialement *me* et « litter mate » *me* (LM*me*). Nous référons à ces cellules comme étant des macrophages immortalisés dérivés de la moelle osseuse (iBMM), soit WT soit *Ptpn6*^{me}.



Figure 2.7. Structure fonctionnelle et tridimensionnelle de la protéine SHP-1

Les deux domaines SH2 sont représentés, avec le domaine SH2 N-terminal (SH2-N) en orange, le domaine SH2 interne (SH2-C) en bleu marin, et le domaine PTP en fuchsia. Les unions entre chaque domaine sont en rouge. La ligne pointillée représente la queue C-terminale en désordre. B. Schéma de la structure secondaire de SHP-1. Le cercle jaune pointillé montre la position du site actif. Les lignes pointillées montrent les régions en désordre. Tirée de (Wei Wang *et al.*, 2011a)

Cette même équipe a démontré que l'activation de SHP-1 est induite lors de l'infection avec *Leishmania* pour inactiver la voie JAK/STAT, via l'interaction avec JAK2 (Blanchette *et al.*, 1999). Ceci n'est pas la première étude démontrant que SHP-1 est utilisée par des parasites pour moduler la réponse de l'hôte (Hauck *et al.*, 1999, Knutson *et al.*, 1998), démontrant que SHP-1 joue un rôle très important dans la réponse immunitaire de l'hôte. Il a été montré que SHP-1 a un rôle lors de la prolifération des cellules, de l'apoptose, de la survie et de l'adhésion cellulaire (Chong *et al.*, 2007, J. Zhang *et al.*, 2000). En plus, SHP-1 peut aussi être un régulateur de l'homéostasie du glucose, ainsi que de la résorption osseuse (Aoki *et al.*, 1999, Dubois *et al.*, 2006).

L'association de SHP-1 avec des phagosomes a été démontré auparavant (Boulais *et al.*, 2010, Strzelecka-Kiliszek *et al.*, 2002), mais ce n'est que récemment que son rôle lors de la maturation du phagosome a été démontré (C. P. Gomez *et al.*, 2012). En effet, nous avons démontré non seulement que SHP-1 est recrutée au phagosome, mais que, chez les cellules *Ptpn6^{me}*, le recrutement des marqueurs de maturation ainsi que l'acidification des phagosomes sont affectés.

L'absence de SHP-1 chez différents types cellulaires mène à divers phénotypes; des souris avec des neutrophiles déficients en SHP-1 présentent une inflammation spontanée de la peau, tandis que des souris avec des cellules dendritiques déficientes en SHP-1 présentent une auto-immunité sévère (Abram *et al.*, 2013).

4.2.3 Les interactions protéiques de SHP-1

SHP-1 possède une préférence de substrats très spécifique, avec une prédilection vers des acide aminés acides (comme l'acide aspartique) ou aromatiques

hydrophobiques (comme la phénylalanine) de chaque côté du résidu tyrosine reconnue par son domaine SH2 (Ren *et al.*, 2011). Plusieurs substrats ou protéines qui interagissent avec SHP-1 ont été étudié auparavant, incluant la SHP-1 même (Ozawa *et al.*, 2007), Dok-1 et PIR-B (Berg *et al.*, 1999, Timms *et al.*, 1998). Nous avons confirmé le recrutement de Dok-1 au phagosome, mais ce recrutement a lieu indépendamment de l'expression de SHP-1 (C. P. Gomez *et al.*, 2012). Plusieurs de ces substrats ont aussi été identifiées lors d'une analyse du protéome du phagosome, mais leur possible contribution lors de la maturation de cet organelle reste encore à être évaluée.

Depuis des années plusieurs groupes ont développée des PTPs mutantes pour mieux évaluer leurs substrats, ces mutantes sont connues comme des « trappingmutants » et de manière typique leur capacité catalytique est bloquée ce qui permettre d'emprisonner le substrat dans la pochette catalytique de la PTP. Les mutations les plus communes impliquent des changements des cystéines par des sérines (mutants C/S) ou des aspartates par des alanines (mutants D/A). Dans le cas de la SHP-1, ils existent des mutants C/S, D/A ainsi que des double mutants C/S et D/A qu'ont permis l'identification des substrats tel que PirB (Blanchetot *et al.*, 2005). De plus l'addition des étiquettes de type GST à ces mutants permet la purification de complexes d'interactions pour leur identification par spectrométrie de masses.

5. Les protéines myosine et moesine

5.1 La famille des protéines myosines

La famille des protéines myosines est une de plus large et plus divergents familles de protéines chez les eucaryotes. Elles peuvent être formées par une ou deux chaines lourdes ainsi qu'un nombre variable des chaînes légères régulatrices (RLC). Une représentation schématique de ces structures est présentée dans la figure 1.8. Il s'agit de protéines motrices, ubiquitaire et multifonctionnelles, qui participent à l'hydrolyse de l'ATP afin de produire un mouvement actif sur des filaments d'actine (Heissler *et al.*, 2016).

La caractéristique partagée par toutes les myosines est la présence de leur domaine motrice, localisé au niveau de leurs chaines lourdes (Krendel *et al.*, 2005) et qui permet la liaison à l'actine via l'ATP. Des chaînes lourdes de la myosine ont été identifiées comme des substrats de SHP-1 *in vivo* suite au « cross-linking » d'IgM des souris (Baba *et al.*, 2003). Aussi présents dans la chaîne lourde, le domaine queue représente le domaine plus variable des protéines, ce qui régules leurs fonctions. Les chaînes légères, quant à elles, sont constituées de calmoduline ou des protéines de type calmoduline, et servent à maintenir la rigidité des chaînes lourdes.

Différents types des myosines ont été démontrées comme ayant un rôle lors du trafic des organelles, le mouvement des cellules ou cytokinèse, l'entretien de la forme de la cellule ainsi que la contraction musculaire (Maravillas-Montero *et al.*, 2012). Dans le cas des macrophages, plusieurs myosines ont été reportés comme importants pour la fermeture de la coupe phagocytique ainsi que dans la formation des pseudopodes ou lamellipodes (Cox *et al.*, 2002, Soldati *et al.*, 2006, Swanson *et al.*, 1999) Plus récemment, il a été montré que certaines myosines peuvent réguler la maturation des phagosome par liaison à la F-actine (Gopaldass *et al.*, 2012) et la livraison des composants d'ER et des pompes protoniques au phagosome, chez *Dictyostelium* (Dieckmann et al., 2012).

Les myosines sont classifiées en 31 classes différentes, selon une analyse phylogénétique de leur domaine moteur. Cependant, une classification plus simple, basée sur leur propriété fonctionnelle propose cinq classes: (I) mouvement rapide, (II) lents et efficaces comme détentrices de force, (III) senseurs de tension, (IV) processives (Bloemink *et al.*, 2011) et (V) inactives au niveau cinétique. Cette dernière classe a été proposé plus récemment (Heissler *et al.*, 2016).



Figure 2.8. Structures des myosines exprimés par des leucocytes.



5.1.1. Les myosines de classe II non musculaires.

Les myosines de classe II sont exprimés par tous les organismes eucaryotes sauf les plantes, avec plus de 34 membres répertoriés à date (Betapudi, 2014). Les myosines IIA, IIB et IIC sont exprimées de manière exclusive dans des cellules non-musculaire, et sont donc nommée des myosines de classe II non-musculaire. Les 3 membres de ce groupe partagent entre 60-80% de leur séquence (Jung *et al.*, 2008) et sont exprimés chez le macrophage. Les myosines de ce groupe se retrouvent surtout dans la partie cytoplasmique des cellules, avec un certain niveau d'expression dans le noyau.

Même si les myosines IIA, IIB et IIC sont exprimés dans toutes les cellules de type non musculaire chez l'humain, leurs niveaux d'expression peut varier selon le type cellulaire (Golomb *et al.*, 2004). Par exemple, les myosines IIA et IIB sont exprimées

par des cellules endothéliales et épithéliales mais seulement IIA est exprimé chez les plaquettes (Betapudi, 2014).



Figure 2.9. Mécanisme de l'activation des protéines motrices myosines de classe II non musculaire. La phosphorylation de la RLC par certaines kinases active les protéines. Tirée de (Betapudi, 2014).

Comparées aux autres myosines, la régulation des myosines de classe II non musculaires implique la phosphorylation réversible des acides aminés spécifiques localisés lors de RLC ainsi que dans leur chaînes lourdes. Une schématisation de cette phosphorylation est illustrée dans la figure 1.9. Une des kinases impliquées, la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) ou la kinase associée à Rho contenant un « Coiled-Coil » (ROCK), phosphorylent des résidus sérine/thréonine dans les RLC (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). Plus récemment, la possibilité d'une phosphorylation des résidus de tyrosine via des kinases Src chez la myosine IIA a été reporté (Almeida *et al.*, 2015).

Les myosines IIA et IIB ont été montrées comme ayant un rôle lors de la formation des mouvements cellulaires. IIB favorise la formation des lamellipodes tandis que IIA régule la rétraction cellulaire (Betapudi, 2010).

Autre que les mouvements et la signalisation cellulaire, des myosines de classe II jouent un rôle lors de la phagocytose via des récepteurs Fc. En effet, une inhibition de ces myosines diminue le taux phagocytique (Araki, 2006, Olazabal *et al.*, 2002).

5.1.2. La myosine de type non musculaire IIA

La myosine de type non musculaire IIA (NMHC-IIA) est codée par le gène *Myh9* chez l'humain et la souris. Il s'agit d'une protéine d'environ 200 kDa. Comme le reste des membres de la famille, NMHC-IIA interagit avec l'actine et est impliquée lors du mouvement cellulaire et de la réorganisation de la membrane plasmique (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009).

Des souris déficientes (knockout) en NMHC-IIA meurent dans l'étape embryonnaire (Conti *et al.*, 2004). Dans des souris « knockdown » en NMHC-IIA, la distribution de l'actine change au niveau du neuroepithelium et dans les surfaces apicale et basale des tubes neuronales (Gutzman *et al.*, 2015). Chez l'humain, plus de 45 mutations sur *Myh9* ont été décrites, associées à désordres de type dominant-autosomale tel le syndrome de Fetchner. Les patients atteints de ces mutations développe une surdité, des cataractes et souvent des maladies des reines (Betapudi, 2014).

La régulation de NMHC-IIA par phosphorylation à lieu soit par des serine/thréonine kinases, soit par des kinases de la famille Src comme nous avons discutée auparavant. En plus, des études de phosphoprotéomique ont identifié la NMHC-IIA comme faisant partie des voies globales de signalisation via la phosphotyrosine, et est aussi considérée comme une suppresseur tumoral (Rikova *et al.*, 2007, Schramek *et al.*, 2014).

La NMHC-IIIA régule la formation de protrusions ainsi que la migration des cellules dépendant de l'actine ; elle est aussi nécessaire pour la maturation de l'adhésion via des intégrines, contrôle l'adhésion entre cellules en facilitant la localisation de la E-cadhérine et régule la polarisation des cellules épithéliales (Cai *et al.*, 2006, Smutny *et al.*, 2010). Elle est aussi nécessaire à la distribution et

l'organisation de la F-actine chez les mégacaryocytes et chez les plaquettes (Arii *et al.*, 2010). Lors d'infections virales, la NMHC-IIA est importante pour l'entrée des virus Epstein-Bar et herpès simplex 1(Arii *et al.*, 2010, Xiong *et al.*, 2015).

5.2 La superfamille Band 4.1

La superfamille Band 4.1 est un groupe de protéines qui présentent un domaine N-terminal conservé de ~300 acides aminés, connu comme FERM. Cet acronyme représente les protéines 4.1R (F), ezrine (E), radixine et moésine (M) respectivement(Diakowski *et al.*, 2006). La protéine Band 4.1 est considérée comme le prototype de la famille et est présente au niveau des membranes des erythrocytes. À date, plus de 50 protéines font partie de cette superfamille, organisée en 5 sous familles : 1) la Band 4.1, 2) la famille ERM, 3) la taline, les PTPH ou protéine tyrosine phosphates contenant des domaines FERM (PTPH1 et PTP-MEG), et 3) les protéines NLB4 et NLB5. Plus récemment, ces familles étaient séparées en 3 groupes distincts : 1) les talines et les kindlines, 2) La famille ERM et les kinases/phosphatase de type GEF (facteurs d'échange des nucléotides guanine), et finalement 3) les protéines d'interaction Krev et les myosines (Frame *et al.*, 2010, Moleirinho *et al.*, 2013).

La famille ERM est composée des protéines ezrine, radixin et moésine et, plus récemment, merline. Une schématisation des domaines présents en ces protéines, comparées à la Band 4.1, est montrée dans la figure 1.10. Cette famille fait aussi partie des protéines avec liaison à l'actine (ABP). Les ABPs peuvent se lier à la fois à l'actine et aux phosphoinositides membranaires, et sont considérées comme des liens mécaniques entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique (Defacque *et al.*, 2000).

L'ezrine est le premier membre de la famille à être décrit en 1981 comme une protéine de 81kDa avec une réponse rapide à l'exposition au facteur de croissance de l'épiderme. Cette réponse été mise en évidence par la phosphorylation de ces résidus tyrosine. Les membres de cette famille partagent ~75% d'identité au niveau des acides aminés et sont localisés dans des compartiments cellulaires similaires, bien

qu'exprimés de manière différentielle dans différents tissues. L'ezrine est exprimée surtout a niveau des cellules épithéliales polarisées des cellules mesotheliales. La moésine est exprimée surtout chez les cellules épithéliales et les cellules lymphoïdes. Enfin, la radixine est exprimée surtout chez les hépatocytes (Moleirinho *et al.*, 2013).

En général, les membres de cette famille ont été montré comme ayant des rôles lors de la signalisation cellulaire incluant l'organisation du cytosquelette, l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire, ainsi que lors de la réponse immune des cellules B (Arpin *et al.*, 2011, Fievet *et al.*, 2007, Pore *et al.*, 2015). La famille ERM a été identifié comme pouvant jouer un rôle lors de la maturation des phagosomes chez les macrophages suite à leur identification comme cibles de la Rho kinase lors de l'élimination des cellules apoptotiques (Erwig *et al.*, 2006). En plus, il a été démontré que l'ezrine est nécessaire pour la fusion du phagosome avec le lysosome ainsi que pour l'assemblage de la membrane du phagosome (Marion *et al.*, 2011).





Représentation schématique des membres de la famille ERM, avec les pourcentages d'homologie globale. Tirée de (Louvet-Vallee, 2000).

Comme nous l'avons mentionné, l'activation d'ezrine (et par conséquence des autres membres de la famille ERM) implique la phosphorylation de différents sites. Dans le cas de l'ezrine, cette phosphorylation à lieu dans deux résidus de tyrosine (Y145 et Y353), tandis que l'activation de la moésine a été reporté comme êtant régulé par la phosphorylation d'un résidu de thréonine (T558) (Ben-Aissa *et al.*, 2012, Nakamura *et al.*, 1995).

5.2.1. La protéine moésine

La protéine d'organisation des extension en pics (membrane-organizing extension spike protein) moésine, est une protéine de ~77kDa qui partage 72% d'identité avec l'ezrine (Meyer *et al.*, 1998). Elle est connue pour son rôle lors de la régulation des changements de forme de la cellule au moment de la division cellulaire (Carreno *et al.*, 2008). La figure 1.11 montre la structure de la moésine ainsi que ses sites d'activation/liaison.

En plus du domaine FERM de son côté N-terminal, la protéine possède une région « acid-linker » composée surtout d'hélices α , et une queue C-terminale. Lors de son activation, la protéine subit des transformations de conformation. Dans son état actif, la protéine est localisée dans la membrane cellulaire et le domaine FERM est lié à plusieurs ligands. La liaison au domaine FERM a lieu à travers une rainure hydrophobique ainsi qu'un site de liaison pour les hélices hydrophobiques. Par contre, dans son état inactif, la moésine est capable de s'auto inhiber et est localisée au cytosol (Carreno *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter que chez *Drosophila,* le seul membre de la famille ERM à être exprimé est la moésine, où la protéine joue un rôle important au niveau de l'intégrité cellulaire et de sa polarité (Arpin *et al.*, 2011). À date, différents rôles ont été attribués à la moésine. Par exemple, elle est capable de se lier et stabiliser des microtubules dans le cortex cellulaire (Solinet *et al.*, 2013). La moésine est aussi présente au niveau des phagosomes (Desjardins *et al.*, 1994a) mais son rôle lors de la maturation de l'organelle n'a pas été démontré. Par contre, plusieurs études indiquent qu'elle pourrait être impliquée lors de la maturation du phagolysosome. Par exemple,

deux composantes de la NADPH oxydase, p47^{phox} et p40^{phox}, interagissent avec la moésine via leur domaine PX (Wientjes *et al.*, 2001). Plus récemment, l'interaction de la moésine et de Rab11, une GTPase impliqué lors du trafic endocytique à travers des endosomes de recyclage, a été montré chez *Drosophila* (Ramel et al., 2013).



Figure 2.11. Organisation des domaines de la moésine, ses états de conformation et ses sites de liaison.

A. Les domaines de la moésine dans sa séquence primaire. Le domaine FERM est divisé en 3 lobes : A (vert), B (orange) et C (jaune). Ce domaine est suivi d'une région α -hélicale (rouge), une région acide (FLAP, rouge) et une queue C-terminale (grise). B. schéma des conformations active et inactive de la protéine avec ses sites de liaison. (Tirée de (Ben-Aissa *et al.*, 2012)).

6. Mise en Contexte et Hypothèse

À date, un rôle de la protéine SHP-1 lors de la maturation a été identifiée dans notre laboratoire (C. P. Gomez *et al.*, 2012). Comme discuté auparavant, en absence de SHP-1 la maturation du phagosome et par conséquence la biogenèse du phagolysosome est affectée. Cependant, les mécanismes permettant ce rôle sont encore inconnues. Nous proposons que la SHP-1 accomplit ce rôle à travers des interactions de type protéine-protéine lors du processus de biogénèse du phagolysosome. Nous suggestions l'évaluation de ces interactions ainsi que les cinétiques de dites interactions. Finalement, nous suggestions l'identification du (des) rôle(s) des protéines identifiées lors de la biogénèse du phagolysosome. Les résultats obtenus lors de ce doctorat permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la maturation du phagolysosome ainsi qu'une meilleure idée de comment plusieurs agents pathogènes utilisent lesdits mécanismes pour éviter ou bien échapper la maturation du phagolysosome.

CHAPITRE 2: ARTICLE

The protein Tyrosine phosphatase SHP-1 interacts with proteins Moesin and Nonmuscle Myosin Heavy Chain-IIA during phagolysosome biogenesis.

Carolina P. Gomez $^{^{*\!\Upsilon}}$ and Albert Descoteaux $^{^{*\!\Upsilon}}$

^{*}INRS-Institut Armand-Frappier and [°]Center for host-parasite interactions, Laval, QC, Canada H7V 1B7.

Running tittle: SHP-1 interacts with Moesin and NMHC-IIA during phagolysosome biogenesis

Keywords: SHP-1, Moesin, NMHC-IIA, Myosin phagolysosome biogenesis, macrophage

Résumé de la publication

La biogenèse du phagolysosome est un processus finement régulé qui nécessite le recrutement de protéines effectrices qui participent aux interactions avec des organelles endocytiques. Nous avons montré auparavant que la protéine phosphatase SHP-1 avait un rôle important lors de la maturation du phagosome. Dans cette étude, nous identifions la moésine et la myosine de type non-musculaire de chaine lourde-IIA (myosine) comme des protéines qui interagissent avec SHP-1 lors de la phagocytose. Par ailleurs, suite au traitement avec des petits ARN interférents conte soit la moésine soit la myosine, nous avons observé un phénotype phagosomal similaire à celui décrit chez les macrophages déficients en SHP-1 (Ptpn6^{me}) incluant des défauts lors du recrutement de protéines effectrices LAMP-1 et la composante de l'oxydase NADPH, gp91^{phox}. En utilisant l'agent lysomotropic Lysotraker comme indicateur de pH phagosomal, nous avons observé qu'autant la moésine que la myosine sont nécessaires pour l'acidification du phagosome. De plus, nous avons obtenu des évidences que la libération de radicaux oxygénés au niveau intraphagosomal est affectée en absence de SHP-1 ou de la myosine, mais pas en absence de la moésine. Finalement, l'absence de SHP-1, de la moésine ou bien de la myosine a entraîné une diminution de la capacité des macrophages à répondre à une infection bactérienne. Nos résultats suggèrent que la régulation de la biogenèse du phagolysosome par SHP-1 est effectué, au moins en partie, à travers des interactions avec la moésine et la myosine.
Titre : La protéine tyrosine phosphatase SHP-1 interagisse avec les protéines moésine et myosine de type non-musculaire de chaine lourde-IIA lors de la biogénèse du phagolysosome.

Contribution des auteurs

Le projet a été élaboré principalement par Carolina Plazas-Gómez et Albert Descoteaux. Les manipulations ont été majoritairement effectués par Carolina Plazas-Gómez. Le manuscrit a été rédigé par Carolina Plazas-Gómez et Albert Descoteaux.

État de l'article : Soumis à Journal of Immunology. Resoumission à PLoS One

Abstract

Biogenesis of phagolysosomes is a finely tuned process that requires the acquisition of effector proteins that participate in the interactions with various endocytic organelles. We previously showed that the Src homology region 2 domain-containing phosphatase I (SHP-1) participates in the regulation of phagosome maturation. In the present study, we identified moesin and the Non-muscle myosin IIA heavy chain subunit of myosin-IIA (myosin IIA) as proteins interacting with SHP-1 during phagocytosis. Furthermore, following silencing of either moesin or myosin IIA with small interfering RNA, we observed a phagosomal phenotype similar to that we described previously in SHP-1-deficient (Ptpn6^{me}) macrophages, including a defective recruitment of the effectors LAMP-1 and the NADPH oxidase component gp91^{*phox*}. Using the lysomotropic agent Lysotraker as an indicator of phagosomal pH, we observed that both moesin and myosin IIA were required for proper phagosomal acidification. Moreover, we obtained evidence that the intraphagosomal oxidative burst was impaired in the absence of either SHP-1 or myosin IIA but not moesin. Finally, absence of either SHP-1, moesin, or myosin IIA resulted in a decreased capacity of macrophages to clear bacterial infection. Taken together, these results are consistent with a regulation of the phagolysosome biogenesis that involves interactions between SHP-1 with both moesin and myosin IIA.

Introduction

Phagocytosis plays a pivotal role in host defense against invading microorganisms (Stuart *et al.*, 2008). This highly dynamic process consists in the internalization of various particles including pathogens and apoptotic cells into a vacuole termed phagosome (Flannagan *et al.*, 2012). Once the phagosome is formed, it undergoes extensive remodeling to acquire lysosomal features and becomes a phagolysosome, an organelle with properties that allows for recognition and degradation of its content, as well as antigen presentation. These properties include an acidic lumen, the presence of several hydrolytic enzymes, and the production of reactive oxygen species (ROS) (Haas, 2007, Kotsias *et al.*, 2013). To acquire these properties, the phagosome undergoes sequential interactions with intracellular organelles, resulting in a profound alteration of the phagosomal protein content as it matures into a phagolysosome (Kinchen *et al.*, 2008).

Tyrosine (Tyr) phosphorylation represents one of the key regulatory mechanisms in eukaryote physiology (Hunter, 2009, Tautz *et al.*, 2013, Tonks, 2006). In macrophages, phosphotyrosine (pTyr) signaling plays a central role in signal transduction and as such modulates multiple cellular processes including cytoskeletal function and intracellular trafficking (Baruzzi *et al.*, 2008, Pixley *et al.*, 2004). pTyr are regulated by both protein tyrosine kinases (PTK) and protein tyrosine phosphatases (PTP) through Src homology 2 (SH2) domains (Lim *et al.*, 2010). Previous studies revealed an overrepresentation of Tyr phosphorylation sites in the phagosome

proteome compared to the global phosphoproteome (Olsen et al., 2006, Trost et al., 2010), suggesting a regulatory role for pTyr in phagosomal signaling. The non-receptor SH2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) is a cytosolic protein expressed by hematopoietic cells, including macrophages. Its role in innate immune responses, such as inflammation and regulation of the JAK/STAT pathway, has been formerly shown by several studies (Abram et al., 2013, Abu-Dayyeh et al., 2008). We previously reported that in macrophages, SHP-1 is recruited to phagosomes during phagocytosis and plays a role in phagolysosome biogenesis (C. P. Gomez et al., 2012). However, the molecular interactions that allow for SHP-1 to achieve such regulation remain to be elucidated. In this regard, the phagosome proteome has previously been characterized (Boulais et al., 2010, Goyette et al., 2012). Over 2000 proteins were identified and bioinformatics analyses revealed the existence of complex protein networks associated to phagotrophy and innate and adaptive immunity. Several of those proteins are involved in vesicle trafficking and interaction with the cytoskeleton (Boulais et al., 2010). Hence, SHP-1 was associated to receptor signaling and actin cytoskeleton networks but little information is available concerning the mechanism by which it regulates phagolysosome biogenesis.

In the present study, we sought to identify SHP-1 interactors during phagocytosis. We identified the membrane-organizing extension spike protein, moesin and the non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA), a subunit of non-muscle myosin IIA among the SHP-1 interactors. We present evidence that similar to SHP-1, both moesin and myosin IIA contribute to the generation of a microbicidal phagosome.

Materials and Methods

Cell culture

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the Canadian Council on Animal Care, and all animal work was approved by the Comité institutionnel de protection des animaux of INRS- Institut Armand-Frappier (protocol 130203). Bone marrow-derived macrophages (BMM) were obtained as described previously (Descoteaux *et al.*, 1989), by extracting the femur and tibias from 8 to 10 week-old female BALB/c mice (Charles River Laboratories, QC, Canada) at 37°C in 5% CO₂ for 7 days in Dulbecco Modified Eagle Medium with L-glutamine (Life Technologies, CA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA, UT, USA), 10 mM Hepes (pH 7.4) and antibiotics (complete medium) in the presence of 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium as a source of colony stimulating factor-1. SHP-1-deficient (*Ptpn6*^{me}) and wild type (WT) immortalized bone marrow-derived macrophages (iBMM) were previously described (Forget *et al.*, 2001) and were grown in complete medium at 37°C in 5% CO₂. The murine macrophage cell line RAW 264.7 was grown in complete medium.

Phagosome preparation and isolation

WT and *Ptpn6^{me}* iBMMs (2 x 10^7 per 150 x 20 mm tissue culture dishes) were incubated with magnetic beads (3 μ m average diameter, 2.5% w/v suspension, Spherotech, IL, USA) diluted 1/50 in 10 ml complete medium at 37°C for 1, 2 or 4 h.

Cells were then washed with cold PBS at 4°C and scrapped in cold PBS. Cells were resuspended in purification buffer (5 mM EDTA, pH 8.0 and PBS, with a final pH of 7.2), lysed by aspirations through a 22 G needle, and then transferred into micro centrifuge tubes. Phagosomes were isolated with a magnet.

Protein extraction

Cells and purified phagosomes were lysed in ice-cold regular lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40) or ice-cold membrane lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS]) containing protease (cOmplete EASYpacks, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and phosphatase (Na₃VO₄) inhibitors. In the case of membrane protein extraction, after chemical lysis, cells were disrupted by homogenization (sonication for a 30-sec pulse) and then precleared by a 30-min centrifugation at 5000 x g at 4°C.

Pull-down assays

Protocol has been previously described (Vikis *et al.*, 2004). Briefly lysates were precleared in lysis buffer (1% Triton X-100, 50mM, (pH 7.5), 0.9M NaCl, 1mM DTT, 0.2 mM PMSF) and 50% slurry of sepharose beads. Lysates were then incubated with either GST alone or GST-SHP-1 (C453S) (Somani *et al.*, 1997) and 50% slurry of sepharose beads for 2h at 4°C to then be centrifuged 1 min at 5000 rpm, washed twice

with lysis buffer with 1M NaCl, twice with lysis buffer alone, and finally thrice with lysis buffer without triton. Samples were then frozen for further analysis.

Mass Spectrometry analyses

Samples were analysed at the Proteomics Discovery Platform of the Clinical Research Institute of Montreal. Protein samples were precipitated by 20% TCA clearing, sent to the IRCM facilities, and after analysis, results were sent back to us to be analyzed with Scaffold Software.

Data base Searching

Charge state deconvolution and deisotoping were not performed. All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.3.02). Mascot was set up to search the NCBInr_20120718 database (selected for *Mus musculus*, unknown version, 144901 entries) assuming the digestion enzyme trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.60 Da and a parent ion tolerance of 15 PPM. Carbamidomethyl of cysteine was specified in Mascot as a fixed modification. Oxidation of methionine was specified in Mascot as a variable modification.

Criteria for protein identification

Scaffold (version Scaffold_3.6.5, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide

identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm (Keller *et al.*, 2002) .Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99.9% probability and contained at least five identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

Antibodies and siRNA transfections

Antibodies are listed in Table I. For small interfering RNA (siRNA) transfections, RAW264.7 macrophages in the second passage were reverse-transfected in 24-well plates with the Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies, CA, USA) per the manufacturer's protocol. The final concentration of siRNA was 25 nM for moesin and 50nM for myosin IIA, in a final volume of 500 []; incubation in transfection medium lasted 48 h. For controls, the same transfection was performed with non-targeting siRNA in the corresponding concentration. siRNA sequences are listed in Table II. BLAST searches were conducted to ensure that these sequences targeted only the targeted mRNA.

Western blots

Protein samples were separated by SDS-PAGE, transferred onto Hybond-ECL membranes (Amersham Biosciences, QC, Canada), and immunodetection was

achieved by chemiluminescence (Amersham Biosciences, QC, Canada). Unless specified otherwise, Western blots (WBs) were performed with 10 _g of either total cell lysates or phagosome lysates. Results were confirmed in three independent experiments. Density of bands was measured by pixel: pixel of each protein, using ImageJ software.

Immunoprecipitations

After lysis, 500

Septiarose If 4 effective cleared with

Flow beads (GE Healthcare Life Sciences, Germany) for 1 h at 4°C followed by overnight immunoprecipitation with each antibody in immunoprecipitation (IP) buffer (1% Triton X-100, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EGTA without protease inhibitors). Samples were then washed thrice in IP buffer with protease and phosphatase inhibitors, resuspended in a mix of IP buffer and Laemmli sample buffer 6x (1:6) and boiled for 7 min. IP samples were separated by SDS-PAGE, transferred onto Hybond-ECL membranes, and immunodetection was achieved by chemiluminescence. Unless stated otherwise, 10

were confirmed in three independent experiments.

Phagocytosis assays

Zymosan (Sigma-Aldrich, ON, Canada) and latex beads (3 μm; Polyscience Inc., PA, USA) were opsonized with mouse serum or mouse IgG respectively. For synchronized phagocytosis assays, cells were incubated with particles at a particle-to-

cell ratio of 5:1 for 10 min at 4°C. Excess particles were removed and phagocytosis was triggered by transferring the cells to 37°C for the indicated time points before proceeding with Giemsa staining with Fisher HealthCare[™] PROTOCOL[™] Hema 3[™] (Fisher Scientific, PA, USA).

Microscopy and immunofluorescence

Macrophages were fixed, permeabilized using 0.5% Triton X-100, and nonspecific surface FcyR binding were blocked using 20% normal calf serum (Wisent, QC, CA), 20% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) and 0.5% Tween-20. Particle internalization was quantified by immunofluorescence (IF) microscopy. Quantification of phagosomal recruitment was performed as follows. Slides were prepared with 3 coverslips per time point for each experiment, and 100 phagosomes were counted per coverslip for a total of 300 phagosomes per experiment. Experiments were repeated a minimum of three times. Primary antibodies were incubated for 2h and secondary antibodies for 1h, both at room temperature with the concentrations described in Table I. NucBlue® Live cell Stain (Molecular Probes, CA, USA) was used to visualize cells nuclei. All coverslips were mounted on slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, AL, USA). Detailed analysis of protein presence and localization on the phagosome was performed using Zeiss LSM780 system equipped with 30 mW 405 nm diode laser, 25 mW 458/488/514 argon multiline laser, 20 mW DPSS 561 nm laser and 5 mW HeNe 633 nm laser mounted on Zeiss Axio Observer Z1 and operated with Zen 2011 software (Zeiss). We used a Plan-APOCHROMAT 63x oil DIC 1.4NA objective for our observations and images were

acquired via sequential acquisition. All acquisitions were made at 23°C Colocalization was measured by pixel: pixel of each protein, using ImageJ software.

Analysis of phagosome acidification and oxidative activity

Cells were preloaded with the lysosomotropic agent LysoTracker Red (Molecular Probes, CA, USA) diluted in DMEM (1:2000) for 1 h at 37°C prior to each time point end. Cells were washed and synchronized phagocytosis was performed for the indicated time points at 37°C as described above. Cells were then rinsed, fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min, washed and directly mounted for confocal analysis. Phagosomal oxidative burst was measured as described (Podinovskaia *et al.*, 2013). Briefly, cells were adhered in 6-well plates until confluency. Serum-opsonized Si-COOH modified particles (Kisker Biotech) were incubated with Oxyburst-SE (Molecular Probes, CA, USA) and Alexa 633-SE in coupling buffer (0.1M sodium borate, pH 8.0) and added to cells for the described time points. After each time point cells, werescraped and resuspended in cold PBS and 1% paraformaldehyde for analysis by flow cytometry. Viable cells were analyzed on a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson) and FACS analysis was performed using CellQuest software or FCS Express software (De Novo software).

Bacteria killing assays

iBMM and RAW 264.7 macrophages transfected with siRNAs were infected with non-opsonised *Escherichia coli* DH1 ($OD_{600} = 0.6$) at a ratio of 20:1 as previously described (Arango Duque 2013). Briefly, bacteria were added in 20 µl of PBS, and

plates were centrifuged at 1000*g* for 1 min. Plates were next incubated at 37°C for 20 min prior to four washes with 1 ml PBS. Complete DMEM with 5 µg/ml of gentamicin (Life Technologies) was then added for 20 min (zero time point) or for an additional 4 h. After these time points, macrophages were washed once with 0.5 ml of PBS, and lysed with a solution of 1% Triton X-100 (v/v) in PBS. Lysates were diluted, plated in agar plates, and incubated for 18 h at 37°C. Bactericidal activity was assessed by counting colonies in agar plates, and results were expressed as the log₁₀ of CFU per ml (CFU/ml). Infections were done in 24-well plates in duplicate, in three independent experiments.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the statistical tools provided in GraphPad prism software. Standard deviations were calculated from 3 independent experiments. t-Tests and ANOVAs, followed by Tuckey tests were performed when appropriate.

Results

Moesin and myosin IIA interact with SHP-1

To investigate how SHP-1 modulates phagolysosome biogenesis, we sought to identify proteins that associate with SHP-1 during phagocytosis. To this end, we fed adherent iBMM with serum opsonized zymosan for 1 h, and we performed pull-down assays with GST and GST-SHP-1 (C453S) (Somani et al., 1997) and samples were analyzed by mass spectrometry. With a peptide threshold of 50% and with protein identifications accepted if they could be established at greater than 99.9% probability and contained at least 1 identified peptide, we obtained 198 possible partners. In order to confine the amount of possible partners and increase the stringency of our analysis, we performed a triage of the samples where the peptide threshold was increased to 95% and protein identification was maintained to 99.9% probability but increasing the minimum of identified peptides to five. This reduced the number of possible partners to 61. We finalized our data purge by comparing our results with the literature. A sample of 8 proteins from our 61 candidates pool is shown in Table III. Presence of Dok-1 in the SHP-1 interactors identified in macrophages undergoing phagocytosis is consistent with previous findings that Dok-1 is a major SHP-1 substrate (Berg et al., 1999) and that it is recruited to phagosomes (Alvarez de Celis et al., 2015, C. P. Gomez et al., 2012). Based on the aforementioned criteria and availability of antibodies to further validate our proteomics data, we chose to study the interaction of SHP-1 with the Nonmuscle heavy chain myosin II-A (myosin IIA) and moesin.



Figure 2.1. SHP-1 interacts with moesin and myosin

A-C. Proteins moesin and myosin IIA co immunoprecipitate with SHP-1 in total cell lysates. A. Immunoprecipitation against SHP-1. Membrane was blotted against myosin IIA (upper panel), moesin (middle panel) or SHP-1 (lower panel). B. Immunoprecipitation against moesin. Membrane was blotted against moesin (upper panel) or stripped and then blotted against SHP-1 (lower panel). C. Immunoprecipitation against myosin IIA. Membrane was blotted against myosin IIA (upper panel) or against SHP-1 (lower panel). For figures A-B, 300 □g of RAW TO condition, from either resting cells or cells given serum-opsonized zymosan added for 60 minutes. Images are representative of 3 independent experiments. D. Levels of moesin and myosin IIA are comparable in resting cells. 10 Ptpnff^mTCL of BMMs,V (me3 and me5) were loaded per well. Membrane was blotted against myosin IIA (upper panel) or moesin (lower panel). E. Bead-phagosomes were isolated from either WT or Ptpn6^{me} iBMMs at the indicated time points after the initiation of internalization, and presence of myosin IIA (upper panel) or moesin (lower panel) in phagosome lysates was assessed by Western blot analyses. Similar results were obtained in three independent experiments. F. Loading control for immunoprecipitations using phagosome lysates. G-H Immunoprecipitation against moesin (G) or myosin IIA (H) using phagosome lysates. Membrane was blotted against either moesin or myosin IIA (upper panels) or stripped and then blotted against pTyr residues to assess phosphorylation levels. (lower panel). Ratio of relative density was determined by densitometry relative to the upper panel in each case. 300 µg of phagosome lysates were used per condition. Similar results were obtained in three independent experiments



Figure 2.2. Moesin and myosin IIA are recruited to the phagosome and colocalize with SHP-1 in the phagocytic cup.

A-B. BMMs. WT or Ptpn6^{*me*} iBMMs were allowed to internalize serum-opsonized latex beads, fixed, and stained for moesin (*A*) or myosin IIA (*B*) at different time points after the initiation of internalization. Representative images of cells are shown at different time points. Bar 3 μ m. *C-D.* BMMs were allowed to internalize serum-opsonized latex beads, fixed, and stained for SHP-1 and moesin (*C*) or myosin IIA (*D*) at different time points after the initiation of internalization. Representative images of cells are shown at different time points. Bar 3 μ m. *C-D.* BMMs were allowed to cells are shown at different time points. Bar 3 μ m. *C-D.* BMMs were allowed to internalize serum-opsonized latex beads, fixed, and stained for SHP-1 and moesin (*C*) or myosin IIA (*D*) at different time points after the initiation of internalization. Representative images of cells are shown at different time points. Bar 3 μ m. *E-F.* Recruitment of moesin (*E*) or myosin IIA (*F*) was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance. *P* value < 0.05. (ANOVA) G-*H.* Colocalization of SHP-1 with moesin (*G*) or myosin IIA (H) was determined on at least 100 phagosomes for each condition and was determined by pixel to pixel colocalization, and analyzed by Mander's coefficients.

We first validated our proteomic data by ensuring that both myosin IIA and moesin immunoprecipitated with SHP-1 (and reciprocally) in total cell lysates from RAW264.7 cells in resting state and during the phagocytosis of zymosan (1 h) (Figure 2.1B and 2.1C). We then assessed the levels of myosin IIA and moesin in resting BMM and in WT and SHP-1 deficient (*Ptpn6^{me}* clones me3 and me5) iBMM. The levels of both proteins were comparable and were not affected by the absence of SHP-1 (Figure 2.1D). In contrast, the kinetics of moesin and myosin IIA recruitment to latex beads phagosomes were influenced by the absence of SHP-1 (Figure 2.1E), consistent with a role for this PTP in this process.

Moesin and myosin IIA are recruited to the phagosome and their recruitment is affected by SHP-1.

We next assessed the impact of SHP-1 on the levels of Tyr phosphorylation of moesin and myosin IIA present in phagosome extracts prepared from WT and *Ptpn6*^{me} iBMM. Both moesin and myosin IIA were immunoprecipitated from the phagosome extracts and pTyr levels were assessed by Western blot. Figure 1F shows the amount of both proteins in the input prior to IP. To verify if they were differentially phosphorylated in the absence of SHP-1 during phagocytosis, we calculated the relative amount of Tyr phosphorylated protein. To do so, we first normalized the registered density of either the target protein (moesin or myosin IIA) or the pTyr residues detected, to the WT TCL sample in each WB. We then calculated the ratio between normalized density of target protein versus the normalized density of pTyr residues. Absence of SHP-1 lead to an increase in pTyr residues in moesin, particularly after 2 h post-phagocytosis (Figure 2.1G). In the case of myosin IIA however, tyrosine

phosphorylation levels were actually lower in *Ptpn6^{me}* phagosomes, albeit the differences we observed were negligible (Figure 1H). While these results suggest that the phosphorylation of moesin is affected in absence of SHP-1, we do not discard the possibility that the regulation of the recruitment of both proteins might be independent of the phosphatase activity of SHP-1. Kinetics of recruitment of moesin and myosin IIA to phagosomes in presence or in absence of SHP-1 was confirmed by confocal immunofluorescence microscopy. We compared recruitment of both proteins at the indicated time points by feeding IgG-opsonized-polysterene beads to BMMs, WT and *Ptpn6^{me}* iBMMs at the indicated time points we assessed each proteins recruitment. Moesin was present in about 30% of the phagosomes at all time points both in BMM and WT iBMMs. In *Ptpn6^{me}* cells however, moesin was retained around the phagocytic cup, with 2/3 of phagosomes being positive for moesin recruitment (Figure 2.2A and 2.2E).

Myosin IIA was present in 20% of phagosomes in BMM and WT iBMM at 15 min post phagocytosis and it achieved a peak of about 60% at 2 h post phagocytosis. *Ptpn6^{me}* cells however would attain their peak of recruitment earlier (1h post phagocytosis) with a maximum of 60% positive phagosomes. Afterwards, myosin IIA was lost from phagosomes. (Figures 2.2B and 2.2F). We next evaluated by confocal immunofluorescence microscopy the co-localization of both myosin IIA and moesin with SHP-1 in BMMs fed with IgG-opsonized-polysterene beads. Pixel colocalization was assessed at the indicated time points. Because moesin is less abundant than SHP-1 we used the Mander's coefficient, which allows to compare the colocalization of moesin against SHP-1 and vice versa. Indeed, around 55% of the moesin present in the

phagocytic cup colocalized with SHP-1 at all-time points, whereas only about 40% of the SHP-1 present on phagosomes colocalize with moesin at 1 h post phagocytosis (Figures 2.2C and 2.2G). Concerning the colocalization of myosin IIA and SHP-1, we observed a colocalization at all time points, with a maximum of around 80% at the 2 h time point. (Figures 2.2D and 2.2H).

Absence of moesin or myosin IIA affects the phagocytic indexes and ratios, as well as SHP-1 recruitment to the phagosome

To assess the potential role(s) of moesin and myosin IIA in phagocytosis, we knocked down each protein by transfecting RAW 264.7 cells with specific siRNA, which resulted in a significant decrease in moesin and myosin IIA immunostaining (Fig. 2.3G and 2.3H). We also verified the effect of the specific siRNA by Western blot to ensure the effect seen was due to a decrease in the protein expression (Fig 2.3I and 2.3J) We then fed the cells with serum-opsonized zymosan, and at the indicated time points we assessed both the phagocytic ratio ϕR and the phagocytic index ϕI . For both moesin and myosin IIA siRNA-treated cells, phagocytosis was significantly impaired, compared to cells treated with non-targeting siRNA, with a decrease in both ϕR percentages and ♦I (Figures 2.3A, 2.3B, 2.3D and 2.3E). Attachment of particles was not impaired (data not shown) suggesting that this phagocytosis defect is due to an internalization defect. Knock-down of either moesin or myosin IIA also led to a significant impairment of SHP-1 recruitment to phagosomes (Fig 2.3C and 2.3F). Taken together, our results provide evidence that besides regulating formation of the phagocytic cup and internalization of particles, moesin and myosin IIA play a role in both phagocytosis and in the recruitment of SHP-1 to phagosomes.



Figure 2.3. Silencing of either moesin or myosin IIA affects phagosome index, ratio and SHP-1 recruitment to the phagosome.

RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (A-C) or myosin IIA (D-F) were allowed to internalize zymosan, and at various time points after the start of internalization, were fixed and either stained by Giemsa stain (A-B and D-E) or immunolabeled against SHP-1 (C, F). Phagocytosis ratio (A, D: number of cells with phagosomes) and phagocytic index (B, E: number of phagosome per cell) were determined in at least 300 cells per experiment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations of one representative triplicate. Asterisk denotes statistical significance. P value < 0.005. (t-Test) Presence of SHP-1 in phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy. Recruitment of SHP-1 after siRNA against either moesin (C) or myosin IIA (F) was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance. P value < 0.005. G-H. RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (G) or myosin IIA (H) were allowed to internalize serum-opsonized zymosan, fixed, and stained for SHP-1 at different time points after the initiation of internalization. Representative images of cells are shown at different time points. Bar 3 µm(I-J). Levels of moesin and myosin IIA decrease after siRNA treatment. 10

with non-targeting siRNA or specific siRNA against either moesin (I) or myosin IIA (J) were loaded per well. Membrane was blotted against myosin IIA (I) or moesin (J).

□g of TCL of

Moesin and myosin IIA participate in phagolysosome biogenesis

To evaluate the potential impact of both moesin and myosin IIA on the phagosome maturation process, we fed RAW 264.7 macrophages treated with either non-targeting siRNA, moesin siRNA, or myosin IIA siRNA with serum-opsonized zymosan, and at the indicated time points we assessed the phagosomal association of the endosomal markers EEA1 and Rab7 as well as the lysosomal marker LAMP1 by confocal immunofluorescence microscopy. We also determined the contribution of both moesin and myosin IIA to phagosome acidification using LysoTracker Red. Results shown in Fig 4 revealed that neither moesin nor myosin IIA are required for the recruitment of EEA1 and Rab 7 to phagosomes (Figure 2.4).

In contrast, quantification of the number of phagosomes positive for LysoTracker revealed that in cells treated with non-targeting siRNA, ~80% of phagosomes containing opsonized zymosan, were acidified after 1h post phagocytosis, whereas for both moesin or myosin IIA siRNA-treated cells, barely a 40% of phagosomes were acidified (Figures 2.7A and 2.7C respectively). Similarly, phagosomal recruitment of the lysosomal marker LAMP-1 was significantly reduced in RAW 264.7 cells treated with siRNA to either moesin or myosin IIA, compared to cells treated with non-targeting siRNA (Figure 2.7B and 2.7D respectively). Taken together, our results suggest that both moesin and myosin IIA participate in the phagosome maturation process.



Figure 2.4. Recruitment of early and late phagosome markers after moesin or myosin IIA silencing

A-D. RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (*A-B*) or myosin IIA (*C-D*) were allowed to internalize serum-opsonized zymosan, and recruitment of EEA-1 to phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy *E-H.* RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (*E-F*) or myosin IIA (*G-H*) were allowed to internalize serum-opsonized zymosan, and recruitment of Rab7 to phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy. Presence of either protein after treatment with siRNA against either moesin myosin IIA was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Two independent experiments were performed and the bars show the standard deviations of these experiments.

Moesin and myosin IIA regulate the recruitment of NOX2 to the phagosome

An important feature of the phagosome maturation process is the recruitment of NOX2 (gp91^{*phox*}), which generates ROS. Given the role of moesin and myosin IIA in phagosomal maturation, we hypothesized that absence of these proteins could affect phagosomal recruitment of NOX2 and production of ROS. First, we assessed the role of SHP-1 in this process. In *Ptpn6^{me}* iBMM, the kinetics of NOX2 recruitment to phagosomes was significantly altered compared to WT iBMM (Figure 2.5A and 2.5C), leading to an impaired generation of intraphagosomal ROS (Fig. 2.5C). In RAW 264.7 treated with siRNA to either moesin or myosin IIA, we also observed altered kinetics of NOX2 recruitment to phagosomes compared to cells treated with non-targeting siRNA (Fig 2.6A, 2.6B, 2.6D, 2.6E). However, generation of intraphagosomal ROS was significantly reduced only in RAW 264.7 cells treated with siRNA to myosin II (Fig 6 C and D). Taken together our results suggest that both SHP-1 and myosin IIA regulate the generation of phagosomal ROS.

Actin recruitment is impaired in absence of SHP-1, Moesin and Myosin

Considering our results regarding the acidification of phagosome both in absence of SHP-1 (C. P. Gomez *et al.*, 2012) and after silencing moesin or myosin, we decided to evaluate the recruitment of actin in these cells, since actin has been shown to interact with members of the families of both moesin (Marion *et al.*, 2011) and myosin (Gopaldass *et al.*, 2012)to regulate phago-lysosomal fusion or acidification. First we evaluated the recruitment of actin in WT or *Ptpn6*^{me} iBMMs, labeling the protein with phalloidin. We found that at 1h post phagocytosis, the phagocytic cups of Ptpn6me displayed a significantly lower recruitment of actin, compared to their WT counterparts

(Figures 2.8A and 2.8B). When we evaluated the recruitment of actin after silencing either moesin (Figures 2.8C and 2.8E) or myosin (Figures 2.8D and 2.8F) we found that the defect in actin recruitment at 1h post phagocytosis was similar to that observed in *Ptpn6^{me}* phagosomes, when comparing them to cells treated with non-targeting siRNA. Taken together, these results show that SHP-1, moesin and myosin affect the recruitment of actin to a similar extent



Figure 2.5. Acquisition of oxidative features is impaired in SHP-1-defective macrophages

A. WT or $Ptpn6^{me}$ iBMMs were allowed to internalize serum-opsonized latex beads, fixed, and stained for gp91^{*phox*}. Presence of gp91^{*phox*} was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance between cell lines. *P* value < 0.005. *B*. Bead-phagosomes were isolated from WT or Ptpn6^{*me*} iBMMs at the indicated time points after the initiation of internalization, and presence of gp91^{*phox*} in phagosome lysates was assessed by Western blot analyses. Similar results were obtained in three independent experiments. *C*. WT or *Ptpn6^{<i>me*} iBMMs were allowed to internalize serum-opsonized Si-COOH beads coated with OxyBURST® Green H2DCFDA, SE and Alexa FluorTM 633 NHS Ester. Oxidative burst was determined by flow cytometry through the OxyBurst Assay. Geometrical mean fluorescence was considered. Three independent experiments were independent experiments were independent experiments were obtained and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance between cell lines. *P* value < 0.0001.



Figure 2.6. Silencing of moesin or myosin IIA affects acquisition of oxidative features.

RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (*A*) or myosin IIA (*C*) were allowed to internalize serum-opsonized zymosan, fixed, and stained for gp91^{*phox*}. Presence of gp91^{*phox*} in phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy and determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance between cell lines. *P* value < 0.005. RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (*B*) or myosin IIA (*D*) were allowed to internalize serum-opsonized Si-COOH beads coated with OxyBURST® Green H2DCFDA, SE and Alexa FluorTM 633 NHS Ester. Oxidative burst was determined by flow cytometry through the OxyBurst Assay. Geometrical mean fluorescence was considered. Controls were stained against the appropriate protein and evaluated by confocal microscopy. Three independent experiments were performed and the standard deviations between experiments and the bars show the standard deviations between the appropriate protein and evaluated by confocal microscopy. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance between cell lines. *P* value < 0.05 (t-Test)



Figure 2.7. Acquisition of phagolysosomal features is impaired after silencing of moesin or myosin IIA

RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (*A*) or myosin IIA (*C*) were incubated 1 h with LT prior to internalization of serum-opsonized zymosan for the indicated time points and then fixed. Controls were stained against the appropriate protein. Presence of LT in phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy and was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (*B*) or myosin IIA (*D*) were allowed to internalize serum-opsonized zymosan for the indicated time points, fixed and stained against LAMP-1. Controls were stained against the appropriate protein. Presence of LAMP-1 in phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy and was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance. *P* value < 0.005 (t-Test).



Figure 2.8. Recruitment of Actin to the phagosome is impaired in SHP-1 deficient cells or after silencing of Moesin or Myosin

A. WT or Ptpn6me iBMMs were allowed to internalize serum-opsonized latex beads, fixed, and stained for actin. Representative images of cells are shown at different time points. Bar 3 μ m. B. Presence of actin was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance between cell lines. P value < 0.005. C-D. RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (C) or myosin (D) were allowed to internalize serum-opsonized zymosan for the indicated time points, fixed and stained for actin. Controls were stained against the appropriate protein. Presence of actin in phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy. Bar 3 μ m. E-F. Presence of either actin (E-F) was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments. Asterisk denotes statistical significance statistical and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance of either actin (E-F) was determined on at least 300 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance. P value < 0.005.

SHP-1, moesin, and myosin IIA regulate the microbicidal activity of macrophages

Given the impact of SHP-1, moesin, and myosin IIA on phagosome maturation, we assessed their possible role in regulating the microbicidal activity of macrophages. To address this issue, we infected WT or $Ptpn6^{me}$ iBMMs with with *E. coli* DH1 α , as previously described (Hamrick *et al.*, 2000). After infection, cells were lysed and diluted lysates were plated in agar plates. At 0 h post infection no significant difference was observed between the amount of CFUs obtained from either WT or $Ptpn6^{me}$ iBMMs, suggesting that these cells were equally able to internalize bacteria. However, $Ptpn6^{me}$ iBMMs showed a significantly lower capacity of clearing the bacterial infection when compared to their WT counterparts (Figure 2.8A). Similarly, we observed a significant reduction in the capacity of RAW 264.7 cells treated with siRNA to moesin and myosin IIA to clear *E. coli* compared to cells treated with non-targeting siRNA (Fig 8B and 2.8C). Collectively, these results indicate that SHP-1, moesin, and myosin IIA contribute to the microbicidal activity of macrophages.



Figure 2.9. SHP-1, moesin and myosin IIA affect the microbicidal activity of macrophages

A. WT or Ptpn6^{me} iBMMs were incubated, in duplicate, with E. coli in a ratio of 20 bacteria to 1 macrophage. After each time point, cells were washes and lysed. Lysates were diluted and plated. Macrophage bactericidal activity was evaluated by counting CFUs. Three dilutions per condition were evaluated. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance between time points. P value < 0.005 (t-Test). B-C. RAW 264.7 previously treated with siRNA against either moesin (B)or myosin IIA (C) incubated, in duplicate, with E. coli in a ratio of 20 bacteria to 1 macrophage. After each time point, cells were washes and lysed. Lysates were diluted and plated. Macrophage bactericidal activity was evaluated by counting CFUs. Three dilutions per condition were evaluated. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations between experiments. Asterisk denotes statistical significance between time points. P value < 0.05 (ANOVA). D. SHP-1 regulation of the phagolysosome biogenesis. During the formation of the phagosome (1), SHP-1 is recruited to the phagocytic cup by moesin and myosin IIA. In turn, SHP-1 regulates the acquisition of actin and gp91^{phox}. Upon phagosome interaction with late endosomes (2) or lysosomes (3), SHP-1 regulates the recruitment of markers Rab7 and LAMP-1 to the phagosome. SHP-1 also regulates the recruitment of moesin and myosin IIA to the phagosome throughout the organelle's maturation. Acquisition of late endosomal (2) and lysosomal (3) components via SHP-1 allows for the acidification of the phagosome as well as the initiation of ROS production, modulating the phagosome's capacity of degradation. EE: Early Endosome; LE: Late Endosome; LY: Lysosome: RE: Recycling Endosome.

Discussion

We previously reported that SHP-1 participates in phagolysosomal biogenesis by regulating the acquisition of lysosomal features and acidification (C. P. Gomez *et al.*, 2012). In the present study, through a proteomics approach, we identified moesin and myosin IIA as two proteins that interact with SHP-1 during phagocytosis. We found that SHP-1 is necessary for the recruitment of both proteins to phagosomes, and conversely, moesin or myosin IIA are also participating to the recruitment of SHP-1 to phagosomes. Similar to SHP-1, both moesin and myosin IIA contribute to phagolysosomal biogenesis process and to the acquisition of microbicidal features.

Phagolysosome biogenesis involves multiple signaling molecules which regulate the interactions between the phagosome and the cytoskeleton, as well as the early, late and recycling endocytic compartments (Desjardins *et al.*, 1994a, Desjardins *et al.*, 1994b, Desjardins *et al.*, 1997b, Flannagan *et al.*, 2012). This leads to the acidification of the phagosome and the sequential acquisition of an array of hydrolases, culminating in the generation of a highly hydrolytic environment (Haas, 2007). Given that SHP-1 participates in events associated to phagolysosome biogenesis and acidification, we sought to further investigate the underlying mechanism(s) through the identification of SHP-1-interacting proteins. Previous studies identified a number of SHP-1 substrates (Ren *et al.*, 2011), many of which are expressed in macrophages including PIR-B, SIRP α , Dok-1, SLP-76, Syk, Vav1, and BLK. Several of those SHP-1 substrates are present in the proteome of latex bead phagosomes (Boulais *et al.*, 2010), but their potential contribution to phagolysosome biogenesis and function and the role of SHP-1 in their phagosomal recruitment remain poorly understood. For instance, we recently

observed that recruitment of Dok-1 to phagosomes is independent of SHP-1 (C. P. Gomez et al., 2012) and that tyrosine phosphorylation of phagosome-associated Dok-1 was below detectable levels in both WT and SHP-1-deficient macrophages. These observations raised the possibility that SHP-1 acts indirectly on the phagosome maturation process, possibly as a scaffolding protein. Here, we identified both moesin and myosin IIA as SHP-1-interacting proteins during phagocytosis. Both proteins are associated to the cytoskeleton and as such regulate various basic cellular processes. Moesin is part of a group of related proteins known as ERM (ezrin, radixin, and moesin). These proteins interact with the plasma membrane and associate with structures such as filopodia and ruffling membranes at sites of interactions between the plasma membrane and F-actin (Ponuwei, 2016). Previous studies have highlighted the importance of phosphorylation in regulating the binding of ERM proteins with the cytoskeleton (Bretscher, 1999). Hence, a variety of kinases, including receptor tyrosine kinases were shown to activate ERM proteins through phosphorylation and, conversely, several phosphatases dephosphorylate and inactivate these proteins (Ponuwei, 2016). Our observation that moesin interacts with SHP-1 during phagocytosis and that its tyrosine phosphorylation is increased in phagosomes isolated from SHP-1-deficient macrophages suggests that this PTP may regulate the interaction of moesin with the actin cytoskeleton during phagocytosis and/or during the phagosome maturation process. Further studies will be necessary to investigate the role of pTyr on moesin in these processes. Myosin IIA is a key regulator of cell morphology and regulates various cellular processes by interacting with F-actin to generate actomyosin filaments. Studies based on pharmacological inhibitors suggested that myosin IIA is involved in

phagocytosis and F-actin assembly at the nascent phagosome (Yamauchi *et al.*, 2012). Similar to moesin, the activity of myosin IIA is regulated by kinases and phosphatases. However, phosphorylation of myosin IIA on Ser and Thr residues appears to be the predominant mode of regulation, suggesting that Tyr phosphorylation may not be the main mode of regulation. This is consistent with our observation that tyrosine phosphorylation of myosin IIA present in phagosome lysates is not increased in the absence of SHP-1.

Using RNAi, we obtained direct evidence that both moesin and myosin IIA are involved in phagocytosis and phagosome maturation. Our results show that silencing either moesin or myosin IIA in macrophages has a similar effect in phagosomal maturation to that observed in SHP-1-deficient cells, although with some differences such as the kinetics of Rab7 recruitment to phagosomes. Members of the families of both moesin and myosin IIA had been reported to have a regulatory role in the acidification of the phagosome thorough interactions with actin (Defacque *et al.*, 2000, Gopaldass *et al.*, 2012). As other actin-based motor proteins, myosin IIA has been previously shown to be required for phagosome formation and particle engulfment, both mediated by actin interactions, and it is critical for organelle distribution as well as Factin organization in other cell types (Araki, 2006, Pertuy *et al.*, 2014) and it has also been related to calcium-regulated collagen phagocytosis (Arora *et al.*, 2013). Our results indicate that similar to SHP-1, both moesin and myosin IIA are involved in phagosomal acidification.

NOX2-derived ROS are central to phagocyte biology, as they play a key role in phagosome functions including microbial killing and antigen cross presentation (Lam et al., 2010, Savina et al., 2006). The finding that SHP-1, moesin, and myosin IIA are all required for proper NOX2 recruitment and ROS production indicated that these proteins contribute to the generation of a microbicidal phagolysosome. Consistently, we observed that the ability of macrophages to kill E. coli was significantly reduced in the absence of either SHP-1, moesin, or myosin IIA. In line with our findings, a previous study showed that moesin knockout neutrophils displayed impaired microbial killing (Liu *et al.*, 2015). It is of interest that in contrast to the uptake of large particles, internalization of *E. coli* was not altered in the absence of either SHP-1, moesin, or This could be due to differences in requirements for cytoskeletal myosin IIA. rearrangements which are partly mediated by moesin and myosin IIA, or to differential requirements for SHP-1 for signaling pathways induced by distinct recognition and/or phagocytic receptors. Finally, it should be noted that SHP-1 is a negative regulator of the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in macrophages treated with either IFN- γ or the protozoan parasite Leishmania (Forget et al., 2001). As a consequence, in the absence of SHP-1 the protozoan parasite Leishmania was eliminated *in vitro* by macrophages through nitric oxide-dependent (and -independent) microbicidal mechanisms (Forget et al., 2001). This is in contrast to our results indicating that the bactericidal activity of macrophages is impaired in the absence of SHP-1, and correlates with an impaired production of phagosomal ROS.

In sum, our data suggest that SHP-1 achieves regulation of phagolysosome biogenesis at least in part through interactions with moesin and myosin IIA. Hence, ablation of SHP-1 would result in defects in the acquisition of maturation markers, and more importantly, in the mounting of the phagolysosomal response including acidification of the lumen and ROS production, and bacterial killing.

Acknowledgments

We thank Jessy Tremblay for expert assistance with confocal microscopy and flow cytometry.

Conflict of interest

The authors have no financial conflicts of interest

Author contributions

CPG designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper. AD designed experiments, analyzed data and wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Tables

Table 2.1. List of antibodies used in this study

IP: Immunoprecipitation; WB: Western Blot; IF: Imunofluorescence; H: Human, R: Rabbit; Dg: Dog; M:Mouse; B: Bovine; Mk: Monkey; ROS: Reactive Oxygen Species.

Antigen	Species	Reactivity	Applications	Reference	Source	Lot #
Phospho-Tyrosine (P-Tyr- 1000) MultiMab™	Mouse	All	IP (1:200) WB (1:2000)	8954	CST	0008
NMHC-IIA	Rabbit	H, R, Dg	IP (1:100) WB (1:5000)	M8064	Sigma	035M4774
	Rabbit	H, M, R, B	IF (1:500)	909801	Biolegend	B204023
	Rabbit	M,R, H	IP (1:70)	ab52490	Abcam	GR411930-11
Moesin	Rabbit	H, M, R, B	WB (1:1000)	3150	CST	0002
			IF (1:300)			
	Mouse	Н	WB (1:1000)	ab3254	Abcam	
SHP-1			IF (1:300)			GR224952-1
	Rabbit		IP (1.5mg/IP)	sc-287	Santa Cruz	
					Developmental	
LAMP-1	Rat	NA	IF (1:200)	1D4B	Studies Hybridoma	NA
					Bank	
EEA-1	Mouse	R, H, Dg,	IF (1:100)	610456	BD Transductions	89968
gp91 ^{phox}	Mouse	M, R	IF (1:100)	611415	BD Transductions	5205924
			WB (1:4000)			
Rab7	Rabbit	H, M, R, Mk	IF (1:200)	9367	CST	0001
Alexa Fluor® phalloidin		Actin	IF (1:300)	A12380	Invitrogen	43912A
Anti-rabbit or anti-mouse	Goat		WB (1:5000)	NA934 or	GE Healthcare	9636020
HRP				NA931		9621358
Alexa Fluor® Anti-rabbit	Goat			A11001 (488) or		1586138
(488 or 647)				A21244 (647)		99E1-1
Alexa Fluor [®] Anti-mouse	Goat		IF (1:500)	A11001	Invitrogen	1484573
(488)						
Alexa Fluor® Anti-rat (488)	Goat			A11006		1689880
Alexa Fluor® 633 NHS		NHS Ester	Oxyburst	A20005	Invitrogen	1737285
Ester (Succinimidyl Ester)			(0.01mg/ml)		mmuogen	
OxyBURST® Green H2DCFDA, SE		ROS	Oxyburst (0.05mg/ml)	D2935	Invitrogen	1705776
Table 2.2. Sequences of siRNA pools used in this study

siRNA Targets					
Name		Oligo Sequences (5'-3')	Source		
SMARTpool: ON-TARGETplus Mouse Myh9 (Myosin IIA)	А	GGGCUUAUCUACACCUAUU	Dharmacon (L-040013-00-0005)		
	В	UUGUAGAGCUGGUAGAGAA			
	С	AUAAGAACCUGCCCAUCUA			
	D	GCAGACAAGUACCUCUAUG			
SMARTpool: ON-TARGETplus Mouse Msn (Moesin)	А	CGGAUUAACAAGCGGAUCU			
	В	UUUCAGUAUUAGCGACUUA	Dharmacon		
	С	AGUUGGAAAUGGCUCGAAA	(L-044428-01-0005)		
	D	GAGAAGAUUGAGCGGGAGA			

Table 2.3. List of 8 of the 61 identified proteins in this study.

% of Protein Coverage is defined as the percentage of the database protein sequence covered by matching peptides.

Identified Proteins (of 61)	Accession Number	Molecular Weight	Unique peptides	% Protein Coverage
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 isoform a [Mus musculus]	gi 118130771 (+3)	68 kDa	39	75
Docking protein 1 [Mus musculus]	gi 148666630 (+3)	52 kDa	21	53
Gamma-actin [Mus musculus]	gi 809561 (+6)	41 kDa	8	36
Elongation factor 1-gamma [Mus musculus]	gi 110625979	50 kDa	8	19
Nonmuscle heavy chain myosin II-A [Mus musculus]	gi 17978023 (+2)	226 kDa	8	5.9
Nucleolin [Mus musculus]	gi 13529464 (+12)	77 kDa	8	12
Poly [ADP-ribose] polymerase 1 [Mus musculus]	gi 20806109 (+4)	113 kDa	5	6.9
Moesin [Mus musculus]	gi 70778915 (+1)	68 kDa	5	8.1

CHAPITRE 3: DISCUSSION

Ce projet de recherche avait pour objectif principal de mieux comprendre les interactions entre la protéine tyrosine phosphatase SHP-1 et ses possibles partenaires permettant la régulation de la biogenèse du phagolysosome chez les macrophages murins. Nous avions trois objectifs spécifiques. Le premier objectif était d'identifier les protéines interagissant avec SHP-1 au phagosome. Le second objectif était d'évaluer les cinétiques de recrutement des protéines identifiés en présence ou en absence de SHP-1. Finalement, le troisième objectif était d'étudier le rôle des protéines identifiés lors de la biogenèse du phagolysosome.

3.1 La myosine de type non musculaire IIA et la moésine interagissent avec SHP-1 lors de la phagocytose

Pour identifier les protéines ayant une interaction avec SHP-1 lors de la phagocytose, nous avons utilisé la technique de « pull-down », avec la protéine SHP-1 liée à une étiquette GST (GST-SHP-1 (C453S)), ce qui nous permettait d'augmenter le nombre d'interactions avec la SHP-1 comparé à une expérience similaire en utilisant la protéine sauvage. Parce que nous voulions évaluer si certaines interactions étaient enrichies après la phagocytose, nous avons initialement adhéré des iBMMs de type sauvage et nous avons soit gardé les cellules en état de repos, soit donnée du zymosan opsonisé avec du sérum de souris pendant une heure. Par la suite nous avons lysé les cellules et incubé ces lysats cellulaires totaux (TCL) avec la GST-SHP-1 (C453S). Nous avons confirmé la présence des protéines dans nos échantillons, suite au pull-down dans un gel de polyacrylamide avec marquage à l'argent. Après nous avons précipité le protéome avec l'acide trichloracétique (TCA) et envoyé pour analyse à la plateforme de découvertes en protéomique de l'institut de recherche cliniques de Montréal (IRCM).

Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel Scaffold3. Ce logiciel permet l'analyse des spectres détectés avec trois paramètres principaux : 1. Le seuil peptidique, c'est à dire, la probabilité minimale que le logiciel utilisera pour déterminer si le spectre détecté doit être considéré ou pas pour identifier un peptide ; 2. Le seuil protéique, c'est-à-dire la probabilité qu'une protéine est belle et bien présente dans

l'échantillon analysé et 3. Le nombre minimal de peptides utilisés pour identifier une protéine en particulier. Initialement, et avec un seuil peptidique de 50%, un seuil protéique de 99.9 % et un minimum d'un peptide par protéine, nous avons identifié 198 partenaires possibles. Cependant, pour limiter le nombre total des partenaires possibles ainsi que pour augmenter l'astringence de nos paramètres, nous avons augmenté le seuil peptidique à 95% ainsi que le nombre minimum de peptides par protéine à 5. Avec ces nouvelles conditions, nous avons réussi à diminuer le pool de partenaires possibles à 61. Un exemple des 8 protéines parmi les 61 possibles partenaires se trouve dans le tableau 2.3 de l'article. Nous avons aussi considéré le pourcentage de couverture pour chaque candidat, définit comme le pourcentage de la protéine dans la base de données qui est couverte par les peptides identifiés.

Nous avons fini l'épuration des derniers partenaires possibles en révisant la littérature. Il est important de noter que le premier candidat était toujours SHP-1 ellemême. Ceci n'est pas surprenant car il été déjà montré que SHP-1 est capable de s'autoréguler (A. Martin *et al.*, 1999, Ozawa *et al.*, 2007). Il est, toutefois, important de considérer que cette SHP-1 identifiée pourrait être d'origine endogène ou bien être, en partie, la GST-SHP-1 (C453S) que nous avons utilisée pour cette expérience. Parmi nos résultats, nous avons aussi identifié la protéine p62(DOK) aussi connue comme Dok-1. Encore une fois, cette interaction a été déjà décrite (Berg *et al.*, 1999) et plus récemment, nous avons démontré que Dok-1 était bel et bien recruté au phagosome (C. P. Gomez *et al.*, 2012). Ces résultats confirmaient que notre approche est valide car nous avons réussi à récupérer des partenaires de SHP-1 connus avec notre « pull-down ».

De manière intéressante, parmi nos résultats, nous avons identifié la protéine du nucléole, la nucléoline. Il a été montré que la nucléoline est régulée par la SHP-2 chez les cellules endothéliales du poumon (Lee *et al.*, 2010). SHP-2 et SHP-1 partageaient 55% de leur identité (Xu *et al.*, 2002). La nucléoline est une protéine hautement phosphorylée lors du cycle cellulaire et elle est trouvée dans la membrane cellulaire des macrophages. Récemment, une interaction entre la nucléoline et LAMP-1 a été démontré. (Barel *et al.*, 2010, Hirano *et al.*, 2005, Tajrishi *et al.*, 2011, Y. Wang *et al.*, 2011b). En tenant cela en considération, il serait intéressant d'investiguer l'interaction

possible de SHP-1 avec la nucléoline davantage, puisqu'elle pourrait jouer un rôle avec SHP-1 au niveau du noyau.

Un autre possible partenaire que nous avons identifié parmi nos échantillons, est la clathrine. Chez les macrophages, l'endocytose via des récepteurs Fc a été montré comme dépendant de la clathrine, et cette protéine est aussi associée aux phagosomes précoces et à la formation du phagosome (Tse *et al.*, 2003). L'élimination de la clathrine du phagosome, est suivi par le recrutement de la GTPase Rab5, ce qui permet, entre autres la communication avec des endosomes de recyclage (Kinchen *et al.*, 2008).

Parmi les autres partenaires identifiés nous avons considéré les protéines moésine et la myosine de type non musculaire IIA. Nous avons décidé d'étudier les interactions de SHP-1 avec ces deux protéines considérant la disponibilité des anticorps pour continuer notre étude, ainsi que la présence de ces deux protéines augmentées dans les lysats post phagocytose (4x pour la moésine et 2x pour la myosine). Ces deux protéines ont été déjà décrites comme étant présent aux phagosomes (Desjardins *et al.*, 1994a, Gopaldass *et al.*, 2012).

Nous avons procédé à valider les interactions par des immunoprecipitations contre la SHP-1, la moésine ou la myosine, respectivement, suivies des immunobuvardages de type Western contre chaque une des protéines, avec des TCL des cellules RAW 264.7, soit en état de repos, soit après un heure de phagocytose de particules de zymosan, opsonisées avec du sérum de souris. Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.1 de l'article. Tant la moésine que la myosine ont précipité avec SHP-1. En plus, quand nous avons effectué l'immunoprécipitation inverse, SHP-1 a précipité avec la moésine et la myosine de manière indépendante. Nos résultats sont aussi supportés par le fait que l'interaction entre la SHP-1 et la myosine a été déjà identifié, bien que chez les cellules B.(Baba *et al.*, 2003)

3.2 SHP-1 modifie les cinétiques de recrutement de la myosine de type non musculaire IIA et de la moésine

Nous avons évalué les niveaux de la moésine et de la myosine dans des TCL des BMMs fraichement différenciées ainsi que dans des iBMMs de type sauvage ou *Ptpn6^{me}*, afin de déterminer s'il y avait une différence dans les niveaux de base des partenaires possibles. Pour les deux protéines, leurs niveaux d'expression dans des TCL de cellules en repos restaient comparables, même en absence de SHP-1, indiquant que SHP-1 n'affecte pas l'expression de la moésine ni de la myosine. Ceci est important car si nous avions observé des différences d'expression de base, il aurait été difficile de déterminer si des éventuelles différences au niveau du phagosomes était dues à un défaut de recrutement ou aux niveaux d'expression initiales.

Quand nous avons évalué les niveaux de protéines dans les lysats de phagosomes des iBMMs de type sauvage ou *Ptpn6^{me}*, nous avons aperçu que les cinétiques de recrutement des deux protéines changeaient. En effet, dans les cellules de type sauvage, nous voyons que la myosine est recrutée progressivement aux phagosomes, et atteint un sommet à environ 2h post phagocytose. En absence de SHP-1, ce sommet est déplacé à 1h post phagocytose, et à 2h post phagocytoses la protéine semble être absente. Dans le cas de la moésine, nous observons un recrutement progressif, avec un maximum de recrutement autour de 1h post phagocytoses, et par la suite le niveau de moésine au phagosome reste constant. Par contre, en absence de SHP-1, la protéine continue à être accumulé, ce qui suggère un problème lors de la régulation du recrutement de la protéine au phagosome. Nos résultats suggèrent que la présence de SHP-1 est nécessaire pour la régulation du recrutement de la moésine et de la myosine au phagosome chez les macrophages murins.

Les cinétiques de recrutement de la moésine et de la myosine ont été vérifiées par immunofluorescence. Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.2 de l'article. Tel qu'aperçu par immunobuvardage, dans les BMMs ou dans les iBMMs de type sauvage, le recrutement de la moésine reste stable, avec environ 30% des phagosomes formés étant positives pour recrutement de la moésine à 15, 60 et 120 minutes post phagocytose. Par contre, en absence de SHP-1, nous observons que ce recrutement augmente de manière constante, atteignant un maximum d'environ 70% des phagosomes formés étant positifs pour le recrutement de la moésine à 120 minutes

post phagocytose. Dans le cas de la myosine, dans les BMMs ou dans les iBMMs de type sauvage nous observons un maximum de recrutement à 120 minutes avec environ 60% des phagosomes étant positives pour le recrutement de la myosine. En absence de SHP-1, le maximum de recrutement est atteint à 60 minutes post phagocytose, avec 57% des phagosomes étant positifs pour le recrutement de la myosine et en contraste avec les BMMs et les iBMMs de type sauvage, à 120 minutes le recrutement baisse à environ 40%. Ces résultats coïncidaient avec nos observations par immunobuvardage de type Western.

Il serait intéressant d'évaluer si cette régulation est dû à un défaut dans la capacité du phagosome de maintenir la myosine dans sa coupe ou plutôt un problème dans la voie de signalisation qui permettre le recrutement de la myosine à longue terme. Dans le cas de la moésine, les différences observées lors de son recrutement au phagosome, peuvent être dues à un défaut dans la capacité de libérer ou recycler la protéine. D'autres expériences seront nécessaires pour élucider quel processus est responsable des différences que nous avons rapportées.

Considérant que la protéine SHP-1 est une tyrosine phosphatase, nous avons décidé d'évaluer les niveaux de phosphorylation de la moésine et de la myosine. Au niveau des phagosomes, par immunoprécipitations contre chaque protéine, suivi d'immunobuvardages de type Western contre les résidus de tyrosine phosphorylés (pTyr), les résultats de ces expériences se trouvent dans la figure 2.1 de l'article. Parce que les niveaux de chaque protéine sont différents à chaque point post phagocytoses, nous avons décidé de calculer la quantité relative de protéine phosphorylée. Pour le faire, nous avons initialement normalisé les densités registrées de chaque protéine cible (soit moésine sois myosine) ou les sites pTyr détectés, contre la densité de l'échantillon correspondant aux TCL des iBMMs de type sauvage, considérant que ceci est le niveau de base. Après, nous avons calculé le ratio entre la densité normalisée de la protéine cible versus la densité normalisée de pTyr pour obtenir la quantité relative de protéine phosphorylée.

En absence de SHP-1, nous avons aperçu une augmentation de la phosphorylation des résidus Tyrosine de la moésine, particulièrement après 2h post

phagocytose. Dans le cas de la myosine, les différences que nous avons aperçues étaient négligeables. Nous avons essayé de faire l'immunoprécipitation inverse. Malheureusement, même si l'immunoprécipitation comme tel à bien fonctionnée, quand nous avons fait un immunobuvardage de type Western contre la moésine ou bien la myosine, nous ne les avons pas détectés. Ceci pourrait être dû à une saturation des billes de la part des autres protéines phosphorylés ou bien simplement que les niveaux de moésine et myosine précipitée sont au-dessous des niveaux de détection.

Parce que nous n'avons vu une augmentation de la phosphorylation de la myosine, nous considérons que l'interaction, ou au moins la liaison, de SHP-1 et la myosine pourrait être indépendant de l'activité phosphatase de SHP-1. Cependant, nous ne pouvons pas défausser la possibilité que l'activité phosphatase de SHP-1 pourrait avoir un rôle lors du recrutement au phagosome de la myosine, ou même de la moésine, à travers d'un autre partenaire. Il est important de noter que la SHP-1 pourrait aussi agir en tant que protéine d'échafaudage ; en effet, SHP-1 a été décrit comme faisant parti de complexes avec d'autres protéines pour la régulation des autres processus, comme l'activation des plaquettes et la survie des cellules T (Ma *et al.*, 2012, Paster *et al.*, 2015).

Ce serait intéressant d'évaluer le recrutement au phagosome de la moésine et de la myosine en absence de la SHP-1 active. Ceci pourrait être accompli soit en travaillant avec des BMMs ou iBMMs dérivées des souris *Ptpn6*^{mev}. Ces souris présentent une mutation dans le gène *Ptpn6* qui réduit l'activité catalytique de la protéine (Kozlowski *et al.*, 1993). Une autre approche serait d'utiliser une version tronquée de la SHP-1, la SHP-1 C/S ou la cystéine 453 a été remplacée par un sérine, ce qui la rend inactive (Timms *et al.*, 1998). Cette version tronquée de SHP-1 pourrait être insérée aux iBMMs *Ptpn6*^{me} par transduction virale pour établir une insertion stable qui permettra l'isolation des phagosomes pour répéter les immunoprecipitations montrés ici.

Finalement nous avons évalué la colocalisation de SHP-1 avec soit la moésine soit la myosine par immunofluorescence en considérant la colocalisation par pixel. Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.2 de l'article. Parce que la

moésine n'est pas aussi abondant que la SHP-1 chez les macrophages, nous avons analysé les résultats de colocalisation avec le coefficient de chevauchement de Mander (Dunn *et al.*, 2011), ce qui permet de comparer la colocalisation de SHP-1 avec la moésine et vice-versa, indépendamment.

Dans le cas de la moésine, nous avons observé une colocalisation au niveau de phagosome, avec SHP-1 d'environ 55% en tout temps, tandis que la SHP-1 atteint un 40% maximum de colocalisation avec la moésine, uniquement à 60 minutes post phagocytose. En ce qui concerne la myosine, considérant qu'il s'agit d'une protéine aussi abondant que la SHP-1, nous avons observé qu'autant de SHP-1 colocalise avec la myosine de la même façon que la myosine colocalise avec SHP-1, avec un 80% maximum de colocalisation à 120 minutes post phagocytose.

Nos résultats montrent que SHP-1 interagit avec la moésine et la myosine, au niveau de phagosome et que, de plus, elle est nécessaire pour leur recrutement au phagosome.

3.3 La myosine de type non musculaire IIA et la moésine affectent la biogenèse du phagolysosome

Parce que souvent les interactions entre protéines peuvent être réciproques, nous nous sommes demandé si le recrutement de SHP-1 pouvait être aussi affecté en absence de la moésine ou bien de la myosine. Pour évaluer cet effet nous avons utilisé la technique de l'ARN d'interférence (ARNi). Les séquences utilisées pour cette étude se trouvent dans le tableau 2.2 de l'article. Considérant que tant la moésine que la myosine ont des rôles importants lors des mouvements de la membrane cellulaire et dans la formation du phagosome (Araki, 2006, Defacque *et al.*, 2000, Swanson *et al.*, 1999), nous avons décidé initialement d'évaluer si le taux de phagocytose (le pourcentage des cellules qui forment des phagosomes) ou bien l'index de phagocytose (le nombre de phagosome par cellule) était affecté par la diminution de l'expression d'une de ces protéines. Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.3 de l'article.

Les deux paramètres, le taux et l'index de phagocytose, étaient affectés significativement quand soit la moésine soit la myosine étaient éteints, et l'effet était évident tout au longue des cinétiques évaluées. En effet, dans le cas de la moésine, le taux de phagocytose est diminué significativement, mais suit une tendance similaire à celle observé chez les macrophages traités avec l'ARNi non spécifique. Par contre, dans le cas de la myosine, le taux de phagocytose reste bas de façon constante, sans jamais dépasser le 30%, en comparaison avec les macrophages traités avec l'ARNi non spécifique qui achèvent un taux de phagocytose d'environ 80% après 120 minutes post phagocytose. De sa part, l'index de phagocytose suite au traitement de ARNi contre la moésine ou la myosine, diminue en comparaison aux macrophages traités avec l'ARNi non spécifique, avec un maximum de 1.3 particules par cellule pour le traitement contre moésine et 0.8 particules par cellule pour le traitement contre la myosine, comparées à un maximum de 1.9 particules par cellule suite au traitement non spécifique.

Parce que nous n'avons pas observé une différence lors de l'attachement des particules, nous considérons que les différences observées sont plutôt dues à l'internalisation des particules. Une façon de déterminer si tel est le cas serait d'évaluer des cinétiques d'internalisation de particules fluorescentes, par vidéo microscopie, pour regarder l'internalisation des particules en temps réel, ou bien par microscopie confocale de balayage (CLSM) qui est considéré comme une méthode fiable pour déterminer la localisation des particules en relation à la membrane cellulaire et permettre de différencier entre les particules complétement internalisés et celles dans le milieu extracellulaire (Thiele *et al.*, 2001).

Par la suite nous avons évalué le recrutement de SHP-1 dans les macrophages traités avec l'ARNi contre la moésine, la myosine ou bien avec l'ARNi non spécifique. Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.3 de l'article. Nous avons observé que dans les premières étapes de la phagocytose, le recrutement de SHP-1 n'est pas affectée quand la moésine ou la myosine étaient éteints. Par contre, à 60 et 120 minutes post phagocytose, le recrutement de SHP-1 est diminué en absence des deux protéines de manière très significative, même s'il suit une tendance similaire à celle observé chez les macrophages traités avec l'ARNi non spécifique qui achèvent un maximum de recrutement tel que décrit auparavant (C. P. Gomez *et al.*, 2012).

Il convient de noter que, parce que nous évaluons les pourcentages de recrutement des protéines au phagosome, par phagosome et non par cellule, les différences observées lors du recrutement ne sont pas expliquées par les différences observées par le taux et ratio de phagocytose.

Considérant la diminution du recrutement de SHP-1 après les traitements de ARNi contre la moésine et la myosine, nous nous sommes demandés si, suite à ces traitements, l'acquisition des marqueurs de maturation serait aussi affectée tout comme nous l'avons rapporté en absence de SHP-1. Nous avons alors évalué le recrutement du marqueur des endosomes précoces, EEA-1 ; la GTPase Rab 7, un régulateur du trafic tardif endocytaire ; et le marqueur lysosomale, LAMP-1. Les résultats de ces expériences se trouvent dans les figures 2.4 et 2.7 de l'article.

EEA-1 est nécessaire pour l'interaction avec la PI3P et donc pour la fusion homotypique des endosomes précoces (Mills *et al.*, 1998, Mills *et al.*, 2001). Tel qu'observé en absence de SHP-1, suite aux traitements d'ARNi contre la moésine ou la myosine, nous n'avons pas vu une différence lors du recrutement d'EEA-1 au phagosome. Ceci pourrait indiquer que la fusion avec des endosomes précoces n'est pas affectée par SHP-1. Il serait intéressant d'évaluer le recrutement de la GTPase Rab5 au phagosome, car cette GTPase est connu par son rôle effecteur lors de l'amarrage des endosomes avec des autres vésicules (Christoforidis *et al.*, 1999). Ceci pourrait confirmer que la fusion des endosomes précoces avec les phagosomes n'est pas affectée par l'absence de SHP-1, ou bien de la moésine ou la myosine.

Nous avons montré auparavant qu'en absence de SHP-1 le recrutement de Rab7 au phagosome diminue de manière significative. Par contre, suite aux traitements d'ARNi contre la moésine ou la myosine, nous n'avons pas vu un tel effet. Cependant, il est important de remarquer que même si la présence de SHP-1 est diminué suite aux traitements d'ARNi, la protéine n'est pas tout à fait absente des phagosomes. Il se peut que la quantité de SHP-1 présente aux phagosomes en absence de la moésine ou de la myosine soit suffisante pour permettre le recrutement de Rab7 de façon typique.

Finalement, en ce qui concerne LAMP-1, nous avons rapporté précédemment qu'en absence de SHP-1, l'on observe un délai au niveau du recrutement du marqueur

lysosomal LAMP-1. Des résultats similaires ont été obtenues suite aux traitements d'ARNi contre la moésine ou la myosine. En effet, dans le cas de la moésine, le recrutement de LAMP-1 à 60 et 120 minutes post phagocytose diminue significativement, comparé aux résultats obtenus chez les macrophages traités avec l'ARNi non spécifique ; de sa part, un traitement d'ARNi contre la myosine a pour effet de diminuer les guantités de LAMP-1 tout au longue de notre cinétique. Parce que il a été démontré que l'activité de certaines kinases de type Src est essentielle pour la fusion des phagosomes avec les lysosomes et que SHP-1 régule plusieurs membres de cette famille (Majeed et al., 2001, Somani et al., 1997), nous considérons que l'absence de la moésine ou de la myosine ne permet pas de recruter suffisamment de SHP-1 aux phagosomes afin qu'elle puisse permettre la fusion avec des lysosomes, évident pour les différences observées lors du recrutement de LAMP-1. Dans des études précédents, l'inhibition de la myosine avec la blebbistatine, diminue l'expression de LAMP-1 (CD107a) dans la surface des granules lytiques chez les cellules NK stimulés avec PMA/ionomycine, suggérant un rôle de la myosine lors du recrutement de LAMP-1 à la membrane des granules (Andzelm et al., 2007). Ceci pourrait expliquer pourquoi le traitement avec l'ARNi contre la myosine a un effet plus marqué sur le recrutement de LAMP-1 que celui observé avec le traitement d'ARNi contre la moésine.

Une des protéines identifiées dans l'interactome de SHP-1 était la clathrine. En général, le cargo dépende de clathrine peut être recyclé de retour à la surface cellulaire vie la voie de recyclage rapide régule par les GTPases Rab4 et Rab35 (Grant *et al.*, 2009). Nous n'avons pas évalué le recrutement d'aucun marqueur de recyclage lors de cette étude, mais il serait intéressant de le faire, car peut être un défaut lors du recyclage en absence de SHP-1 pourrait aussi expliquer l'accumulation de la moésine dans les phagosomes des macrophages *Ptpn6^{me}*. Un autre indice qui supporte l'intérêt d'évaluer la voie de recyclage en absence de SHP-1 est le fait que récemment, une interaction entre la moésine et la GTPase Rab11, connue par son rôle de régulation des endosomes de recyclage, a été démontrée (Ramel *et al.*, 2013).

Parce qu'en absence de SHP-1 nous avons observé un délai de l'acquisition de LAMP-1, qui corrélait avec un défaut lors de l'acidification des phagosomes, nous avons décidé d'évaluer ce paramètre suite aux traitements d'ARNi contre la moésine ou la

myosine, à l'aide de la sonde acidotropique, LysoTracker (LT). Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.7 de l'article. En effet, chez les cellules traitées avec l'ARNi non spécifique, nous observons une acidification des phagosomes qui atteint un maximum d'environ 80% de phagosomes acidifiés après 60 minutes post phagocytose. En contraste, en absence de la moésine ou de la myosine, seulement 40% des phagosomes étaient positives pour le recrutement de LAMP-1. En absence de SHP-1 nous avons observé que le recrutement de LAMP-1 à 60 minutes post phagocytose était d'environ 45%. Ces résultats confirment d'avantage notre hypothèse qu'une absence de SHP-1 a pour effet d'affecter les interactions entre les phagosomes précoces et les lysosomes. En plus, nos résultats coïncident avec des études précédentes qui montraient un rôle de la moésine ou de la myosine lors de l'acidification des phagosomes (Defacque *et al.*, 2000, Gopaldass *et al.*, 2012).

Parce que ces régulations pourraient avoir lieu à travers des interactions avec l'actine, nous avons décidé d'évaluer le recrutement de cette protéine, avec un marquage de phalloidin, dans les cellules *Ptpn6^{me}*, ainsi que celles traitées avec l'ARNi contre la moésine ou la myosine. Chez les cellules WT ainsi que chez celles traitées avec l'ARNi non spécifique, nous observons un maximum de recrutement de l'actine à 60 minutes post phagocytose, avec environ 70% des phagosomes positives pour cette protéine. Par contre, en absence de SHP-1 ou quand la moésine ou la myosine sont éteintes, les niveaux d'actine demeurent stables tout au long de la cinétique de maturation des phagosomes, avec un recrutement au phagosome de moins de 40%. Un défaut dans les dynamiques de la polymérisation de l'actine pourrait expliquer les différences que nous avons reportés au niveau de l'acidification des phagosomes.

L'actine peut être nucléé *de novo* dans les membranes des phagosomes précoces, et il a été démontré que ce processus peut stimuler ou inhiber la fusion avec des lysosomes. De plus, le processus de maturation du phagolysosome implique des mécanismes d'attachement et d'amarrage entre organelles, et ces mécanismes ont besoins de l'actine filamenteuse ainsi que de la participation de Rab7 et de son effecteur RILP (Liebl *et al.*, 2009, Luzio *et al.*, 2007). Parce que la plupart des études des dynamiques de l'actine sont faites dans des cinétiques beaucoup plus rapides que celle que nous avons évalué, il serait intéressant d'évaluer le processus de « flashing »

de l'actine en absence de SHP-1. Parce que la technique typiquement utilisé pour évaluer ce processus implique des cellules transfectées avec un plasmide codant pour l'actine soit avec une étiquette GFP, soit avec le peptide LifeAct® (Riedl et al., 2008, Yam et al., 2004), nous pourrions introduire ces plasmides dans les macrophages *Ptpn6^{me}* par transduction viral. Nous avons aussi accès au laboratoire à des souris LifeAct, qui permettent l'étude de dynamiques de la F-actine (Riedl et al., 2010). Jusqu'à très récemment, le traitement des BMMs avec l'ARNi n'a pas été optimisé au laboratoire et les taux des transfections étaient très bas. Toutefois, de plus en plus, différents groupes ont mis au point des protocoles standardisés pour ce traitement (Jensen et al., 2014, Troegeler et al., 2014). Nous pourrions alors traiter des BMMs provenant de souris LifeAct avec de l'ARNi contre SHP-1 et y étudier la maturation des phagosomes. Par contre, contrairement à l'utilisation de cellules déficientes en SHP-1, nous ne pourrions exclure la possibilité que le traitement aux ARNi contre la SHP-1 puisse dépléter complètement la cellule de cette protéine, et que des quantités de SHP-1 sous un seuil de détection soit encore présente. Toutefois, cette expérience pourrait donner encore plus d'indices quant à la nature des interactions entre SHP-1, ses partenaires d'interactions, et l'actine.

L'acquisition de l'oxydase NADPH est un évènement important lors de la maturation du phagosome. Ce complexe protéique possède des composantes cytoplasmiques ainsi que membranaires. Plusieurs des protéines dont le recrutement au phagosome est altéré en absence de SHP-1 se trouvent au niveau des membranes cellulaires. Nous avons donc étudié le recrutement de la partie membranaire de la NADPH, le flavochrome, avec un marquage par immunofluorescence de la sous-unité gp91^{phox}. Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.5 de l'article. Chez les iBMMs WT, nous observons un fort recrutement à 15 minutes post phagocytose, et ce recrutement diminue avec le temps. Ces données correspondent aux cinétiques observées dans notre laboratoire chez d'autres lignées de macrophages lors de la phagocytose et lors d'une infection (Arango Duque *et al.*, 2013, Lodge *et al.*, 2006a). Cependant, quand nous avons évalué la même cinétique chez les cellules *Ptpn6^{me}*, nous observons un recrutement qui augmente progressivement, de manière quasi inverse à celle observé chez les iBMMs WT. En effet, à 15 minutes post

phagocytose, seulement 20% des phagosomes des iBMMs *Ptpn6^{me}* étaient positifs pour gp91^{phox}, comparés à ceux des iBMMs WT qui avaient plus de 60% de leurs phagosomes positifs pour cette protéine. Nous avons confirmé ces résultats par immunobuvardage de type Western de lysats de phagosomes isolés à différents temps post phagocytose.

L'absence de la moésine et de la myosine ont aussi mené à des modifications au niveau des cinétique de recrutement de gp91^{phox} aux phagosomes lors de la phagocytose. Suite à un traitement avec des ANRi non-spécifiques, le recrutement de gp91^{phox} aux phagosomes est comparable aux cellules WT, avec un maximum de recrutement d'environ 70% à 15 minutes post phagocytose. Par contre, quand les cellules étaient traitées avec l'ARNi contre la moésine, nous observons un recrutement d'à peine 40% à 15 minutes post phagocytose. Pour sa part, le traitement d'ARNi contre la myosine a aussi diminué le recrutement de la gp91^{phox} aux phagosomes avec environ 30% des phagosomes positifs pour cette protéine. Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.6 de l'article.

Nous nous sommes demandés si la diminution du recrutement de gp91^{phox} aurait un effet dans la production de ROS dans nos cellules. Pour évaluer ce paramètre, nous avons mesuré la magnitude et la duration de la réponse oxydative à l'intérieur du phagosome, avec la molécule Oxyburst, comme décrit par l'équipe de Podinovskia (Podinovskaia et al., 2013).Les résultats de cette expérience se trouvent dans les figures 5 et 6 de l'article. En absence de SHP-1 les cellules semblaient incapables de monter une réponse oxydative. Typiquement la production de ROS augmente de façon très rapide pour diminuer ensuite, d'où l'expression « burst ». Tel qu'attendu, les iBMMs WT montraient une augmentation en la magnitude de leur réponse, mesuré par l'augmentation de la fluorescence détectée, atteignant un maximum d'intensité à environ 60 minutes post phagocytose. Par contre, en absence de SHP-1, la production de ROS est quatre fois plus bas que celle observée chez les cellules WT depuis le début de la cinétique et cette production n'augmente pas du tout lors de la phagocytose. Tenant compte nos résultats avec la gp91phox, nous considérons que les iBMMs WT acquièrent la gp91^{phox} très tôt lors de la phagocytose, à travers des premiers évènements d'échange de membrane à la surface cellulaire. Cette acquisition permet

aux phagosomes d'initier une réponse oxydative rapidement. La gp91^{phox} peut aussi être trouvée chez des endosomes de recyclage (Casbon *et al.*, 2009). Nous émettons l'hypothèse qu'en absence de SHP-1, les phagosomes n'ont uniquement pas accès à la gp91^{phox} qu'à travers leurs échanges avec les endosomes de recyclage, et cet échange à lieu trop tard dans le processus pour que les vacuoles puissent initier la réponse oxydative.

manière intéressant, une étude récente avait démontré que les De oligodendrocytes fraichement isolés de souris postnataux *Ptnp6^{me}*, produisent plus de ROS de manière constitutive, compare aux oligodendrocytes des souris WT (Gruber et al., 2015). Par contre, en général les cellules de la microglie et les macrophages dérives des monocytes peuvent être fonctionnellement très différents (London et al., 2013). Il faut tenir en compte aussi que contrairement à notre étude, le groupe de Gruber a seulement montré un point dans le temps, et probablement le plus important, ce groupe explique que leurs données de fluorescence étaient normalisées uniquement par rapport aux échantillons des cellules WT. Nous nous sommes aperçu que l'auto florescence cellulaire Ptnp6^{me} est beaucoup plus élevé que celle des cellules WT, ce qui pourrait donner un niveau de fluorescence beaucoup plus élevé en absence de SHP-1 sans être réellement représentative de la fluorescence produite par la production de ROS. Pour éviter cette interprétation erronée, nous avons soustraite les données d'auto fluorescence de chaque ligne cellulaire, de manière que seulement la fluorescence émise par la molécule d'Oxyburst état tenue en compte pour nos interprétations.

Nous nous sommes concentrés par la suite sur la production de ROS par les cellules traitées avec l'ARNi contre la moésine ou la myosine. Les résultats de cette expérience se trouvent dans la figure 2.6 de l'article. Parce que il a été montré que la moésine interagit avec des composants de la NADPH oxydase (Wientjes *et al.*, 2001), et considérant nos résultats précédents avec gp91^{phox}, nous nous attendions à observer une différence dans la production de ROS, cependant, ce n'était pas le cas. En effet, nous n'avons pas enregistré de différences significatives entre les cellules traitées avec l'ARNi contre la moésine et celles traitées avec l'ARNi non spécifique. Nous émettons l'hypothèse que la production de ROS n'est pas alors affecté par l'absence de la

moésine, car les cellules ont néanmoins une quantité suffisant de SHP-1 recrutée aux phagosomes pour permettre la réponse oxydative.

Dans le cas du traitement d'ARNi contre la myosine, nous avons observé une différence significative dans la production de ROS à 30 et 60 minutes post phagocytose, comparé à la production de ROS chez les cellules traitées avec l'ARNi non spécifique, quoique les différences n'étaient pas aussi marquées que celles observés en absence de SHP-1. Ceci suggère que l'absence de myosine peut causer un phénotype similaire, si non égale à celui observé en absence de la phosphatase. Il y a eu des rapports d'interactions des chaines légères et lourdes de la myosine avec la NADPH, hors du contexte de la phagocytose (Kuratani *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2016). Ceci suggère que peut-être la myosine pourrait agir comme intermédiaire pour le recrutement ou la fusion des différentes vésicules, contenant la gp91^{phox}.

Parce que la NADPH oxydase est formé de plusieurs sous-unités et des études précédents ont montré des rôles différentiels entre ces sous-unités (Schaper *et al.*, 2003), il serait intéressant d'évaluer le recrutement des autres sous-unités au phagosome en absence de SHP-1. En plus, considérant l'énorme différence observée au niveau de la production de ROS en absence de SHP-1, nous considérons que des interactions autres que celles avec la moésine et la myosine soient responsables de l'ablation de la production de ROS chez les iBMMs *Ptpn6*^{me}.

Comme nous avons vu un défaut dans l'acidification des phagosomes ainsi que lors de la production de ROS en absence de SHP-1, nous nous sommes demandés si ce défaut avait pour effet de diminuer la capacité bactéricide des macrophages. Pour répondre à cette question, nous avons infecté des iBMMs WT ou *Ptpn6^{me}* avec *E. coli* de la souche DH1 α . Suite à la lyse des cellules, nous avons semé les échantillons pour évaluer la survie bactérienne, représentée par les unités formatrices de colonies (CFU). Les résultats de cette expérience se trouvent la figure 2.8 de l'article.

Nous n'avons pas vu une différence significative dans le temps 0 d'infection, ce qui suggère qu'il n'avait pas un problème lors de l'internalisation des bactéries entre les iBMMs WT et *Ptpn6^{me}*. Par contre, 4 heures après l'infection, en absence de SHP-1 les cellules montraient une capacité bactéricide diminuée, avec une différence d'au moins

un log lors de la survie de bactéries. Il a été montré qu'une déficience en SHP-1 cause un hyper activation du système immunitaire chez les embryions des poissons zèbre, ce qui a comme effet une diminution lors de la capacité de contrôler une infection bactérienne avec *Salmonella typhimurium* ou *Mycobacterium marinum* (Kanwal et al., 2013), ce qui supporte un rôle pour SHP-1 lors du contrôle des infections bactériennes Gram négatives. Considérant que les réponses aux bactéries Gram négatives peuvent êtres extrêmement différents à celles déclenchées par des bactéries Gram positives (Hessle *et al.*, 2000, Tietze *et al.*, 2006), il serait intéressant d'évaluer la survie des bactéries comme *Staphylococcus aureus*, en absence de SHP-1.

Quand nous avons évalué la survie bactérienne chez les cellules traitées avec l'ARNi contre la moésine ou la myosine nous avons encore une fois observé qu'il n'y avait pas de différence lors de l'internalisation initiale des bactéries. Ceci contraste avec nous résultats précédents par rapport au ratio phagocytique. Cependant, il faut tenir compte que les bactéries, en plus d'être vivants au lieu d'être des particules inertes, sont de plus petite taille que les particules que nous avons utilisées pour mesurer le ratio phagocytique. Il a été démontré que la taille des particules et des organismes phagocytés peut affecter le ratio de phagocytoses des cellules (Leclerc *et al.*, 2012).

En revanche, 4 heures après l'infection, les cellules traitées avec l'ARNi contre la moésine ou la myosine ont montré une capacité diminuée d'élimination de l'infection comparé aux cellules traitées avec l'ARNi non spécifique et celles traitées uniquement avec le véhicule de transfection (mock). Il a été montré que la moésine interagit avec TLR4, un récepteur connu des LPS (lontcheva *et al.*, 2004). Nous considérons alors que l'absence de la moésine mène pas seulement à une diminution lors du recrutement de SHP-1 au phagosome mais aussi à un défaut dans le complexe d'initiation de la signalisation via LPS, ce qui a comme effet une réduction dans la capacité des cellules d'éliminer l'infection bactérienne. De sa part, certains membres de la superfamille des myosines sont des cibles connues d'*E.coli* pour échapper la phagocytose, via une nucléation de l'actine (lizumi *et al.*, 2007). Nous avons déjà démontré que les dynamiques d'actine sont affectés en absence de la myosine et ceci, avec la diminution du recrutement de SHP-1 au phagosome, pourrait expliquer la réduction observée dans

la capacité des cellules à éliminer l'infection bactérienne suite au traitement d'ARNi contre la myosine.

Nous proposons que la SHP-1 pourrait réguler la biogenèse à différents points du processus et en partie à travers de ses interactions avec la moésine et la myosine de type non musculaire IIA. Un modèle récapitulatif se trouve dans la figure 2.8 de l'article. En effet, SHP-1 permettrait le recrutement de la moésine et de la myosine à la coupe phagocytique lors de la formation du phagosome (1), ce qui affecterait aussi l'acquisition de l'actine ainsi que de la gp91^{phox}. En outre, SHP-1 aura aussi un rôle lors de la production de ROS. Ensuite, lors des interactions du phagosome précoce avec les endosomes tardifs (2) et les lysosomes (3), SHP-1 continuera à réguler le recrutement de la moésine et de la myosine au phagosome, ainsi que le recrutement de Rab7 et LAMP-1, ayant en plus un effet lors de l'acidification du phagosome et par conséquent, lors de la capacité de dégradation du phagosome. En revanche, la moésine et la myosine at fecteraient aussi le maintien de SHP-1 au phagosome.

Parce que nous n'avons pas réussi à reproduire complètement le phénotype des phagosomes des cellules *Ptpn6^{me}* avec des traitements d'ARNi contre la moésine ou la myosine il serait intéressant d'évaluer des autres partenaires de SHP-1 identifiés dans l'interactome de la protéine.

De plus, nous n'avons pas évalué le recrutement des Rho GTPases au phagosome. Plusieurs études ont démontré des mécanismes de phagocytose contrôlés par cette famille de protéines, dont des mécanismes impliqués dans la formation de vacuoles parasitophores (Aguilera *et al.*, 2009, Caron *et al.*, 1998). L'inhibition de la moésine a eu des effets similaires au blocage des voies de signalisation des Rho GTPases lors de la maturation du phagosome, avec des taux d'acidification significativement plus bas que ceux observés dans des cellules contrôles (Erwig *et al.*, 2006) ; considérant nos résultats avec la moésine, il serait intéressant d'évaluer le recrutement de cette famille des protéines en absence de SHP-1.

CONCLUSION

Cette étude montre de nouvelles interactions de SHP-1 qui permettent la régulation de la biogénèse du phagolysosome. En effet, c'est la première fois que des interactions entre la SHP-1 et les protéines myosine de type non musculaire IIA et moésine ont été démontrés, non seulement chez les macrophages, mais surtout, au niveau du phagosome. Nous avons identifié ces interactions par spectrométrie de masse et nous les avons confirmés autant par immunoprécipitation que par immunofluorescence. En plus, nous avons caractérisé les cinétiques de recrutement au phagosome des partenaires de SHP-1 par immunofluorescence.

Nous avons évalué le rôle de la moésine et de la myosine avec des traitements d'ARNi spécifique contre ces deux protéines, et nous avons montré que ces traitements avaient un effet lors du recrutement des marqueurs de maturation tardifs au phagosome ainsi que lors de l'acidification de l'organelle et de la production de ROS. Bien que ses traitements aient eu un effet comparable à celui observé en absence de SHP-1, nous avons aussi montré que l'inhibition de ces nouveaux partenaires ne réplique pas complétement le phénotype phagosomal observé en absence de SHP-1, ce qui suggère que d'autres interactions avec SHP-1 sont nécessaires pour atteindre pleinement la régulation de la maturation du phagosome.

C'est avec ces données que nous supportons l'hypothèse que SHP-1 interagit avec la moésine et la myosine pour participer à la biogénèse du phagolysosome. Les interactions avec la moésine et la myosine seront aussi nécessaires pour maintenir SHP-1 dans la coupe phagocytique, permettant à la phosphatase de réguler la maturation du phagosome. En plus, nous avons montré que l'ablation de SHP-1, de la moésine ou bien de la myosine, réduit la capacité des macrophages à éliminer une infection bactérienne. Nos résultats permettent de mieux comprendre le processus de la biogénèse du phagolysosome.

Nous ignorons encore si l'effet de SHP-1 dans la biogenèse du phagolysosome est due à son activité phosphatase ; d'autres études répondront à cette question.

Références

- Abram CL, Roberge GL, Pao LI, Neel BG & Lowell CA (2013) Distinct roles for neutrophils and dendritic cells in inflammation and autoimmunity in motheaten mice. *Immunity* 38(3):489-501.
- Abu-Dayyeh I, Shio MT, Sato S, Akira S, Cousineau B & Olivier M (2008) *Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. *PLoS Negl Trop Dis* 2(12):e305.
- Aderem A & Underhill DM (1999a) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.
- Aderem A & Underhill DM (1999b) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.
- Aguilera M, Salinas R, Rosales E, Carminati S, Colombo MI & Beron W (2009) Actin dynamics and Rho GTPases regulate the size and formation of parasitophorous vacuoles containing Coxiella burnetii. *Infect Immun* 77(10):4609-4620.
- Akira S & Hemmi H (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85(2):85-95.
- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Alexandrov K, Horiuchi H, Steele-Mortimer O, Seabra MC & Zerial M (1994) Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *Embo J* 13(22):5262-5273.
- Almeida MT, Mesquita FS, Cruz R, Osorio H, Custodio R, Brito C, Vingadassalom D, Martins M, Leong JM, Holden DW, Cabanes D & Sousa S (2015) Src-dependent tyrosine phosphorylation of nonmuscle myosin heavy chain-IIA restricts Listeria monocytogenes cellular infection. J Biol Chem 290(13):8383-8395.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J & Mustelin T (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117(6):699-711.
- Alvarez de Celis H, Gomez CP, Descoteaux A & Duplay P (2015) Dok proteins are recruited to the phagosome and degraded in a GP63-dependent manner during Leishmania major infection. *Microbes Infect* 17(4):285-294.
- Amit I, Winter DR & Jung S (2016) The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. *Nat Immunol* 17(1):18-25.
- Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM, Mortensen OH, Fukada T, Del Vecchio R, Tonks NK & Moller NP (2004) A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J* 18(1):8-30.
- Andrejewski N, Punnonen EL, Guhde G, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Hartmann D, von Figura K & Saftig P (1999) Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem* 274(18):12692-12701.
- Andzelm MM, Chen X, Krzewski K, Orange JS & Strominger JL (2007) Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J Exp Med* 204(10):2285-2291.
- Aoki K, Didomenico E, Sims NA, Mukhopadhyay K, Neff L, Houghton A, Amling M, Levy JB, Horne WC & Baron R (1999) The tyrosine phosphatase SHP-1 is a negative regulator of osteoclastogenesis and osteoclast resorbing activity: increased resorption and osteopenia in me(v)/me(v) mutant mice. *Bone* 25(3):261-267.
- Araki N (2006) Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Front Biosci* 11:1479-1490.

- Arango Duque G, Fukuda M & Descoteaux A (2013) Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. *J Immunol* 190(4):1737-1745.
- Areschoug T & Gordon S (2009) Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 11(8):1160-1169.
- Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y & Kawaguchi Y (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467(7317):859-862.
- Arora PD, Wang Y, Bresnick A, Dawson J, Janmey PA & McCulloch CA (2013) Collagen remodeling by phagocytosis is determined by collagen substrate topology and calcium-dependent interactions of gelsolin with nonmuscle myosin IIA in cell adhesions. *Mol Biol Cell* 24(6):734-747.
- Arpin M, Chirivino D, Naba A & Zwaenepoel I (2011) Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell adhesion & migration* 5(2):199-206.
- Baba T, Fusaki N, Shinya N, Iwamatsu A & Hozumi N (2003) Myosin is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase (SHP-1) after mIgM cross-linking. *Biochem Biophys Res Commun* 304(1):67-72.
- Barel M, Meibom K & Charbit A (2010) Nucleolin, a shuttle protein promoting infection of human monocytes by Francisella tularensis. *PLoS One* 5(12):e14193.
- Baruzzi A, Caveggion E & Berton G (2008) Regulation of phagocyte migration and recruitment by Srcfamily kinases. Cell Mol Life Sci 65(14):2175-2190.
- Ben-Aissa K, Patino-Lopez G, Belkina NV, Maniti O, Rosales T, Hao JJ, Kruhlak MJ, Knutson JR, Picart C & Shaw S (2012) Activation of moesin, a protein that links actin cytoskeleton to the plasma membrane, occurs by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding sequentially to two sites and releasing an autoinhibitory linker. *J Biol Chem* 287(20):16311-16323.
- Beresford N, Mulhearn D, Szczepankiewicz B, Liu G, Johnson ME, Fordham-Skelton A, Abad-Zapatero C, Cavet JS & Tabernero L (2009) Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. *J Antimicrob Chemother* 63(5):928-936.
- Beresford N, Patel S, Armstrong J, Szoor B, Fordham-Skelton AP & Tabernero L (2007) MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. *Biochem J* 406(1):13-18.
- Berg KL, Siminovitch KA & Stanley ER (1999) SHP-1 Regulation of p62DOK Tyrosine Phosphorylation in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 274(50):35855-35865.
- Betapudi V (2010) Myosin II motor proteins with different functions determine the fate of lamellipodia extension during cell spreading. *PLoS One* 5(1):e8560.
- Betapudi V (2014) Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins. *Frontiers in chemistry* 2:45.
- Blanchetot C, Chagnon M, Dube N, Halle M & Tremblay ML (2005) Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. *Methods* 35(1):44-53.
- Blanchette J, Racette N, Faure R, Siminovitch KA & Olivier M (1999) *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-γ;-triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology* 29(11):3737-3744.
- Blander JM & Medzhitov R (2004) Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors. *Science* 304(5673):1014-1018.
- Bliska JB, Guan KL, Dixon JE & Falkow S (1991) Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential Yersinia virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4):1187-1191.

- Bloemink MJ & Geeves MA (2011) Shaking the myosin family tree: biochemical kinetics defines four types of myosin motor. Seminars in cell & developmental biology 22(9):961-967.
- Blom AM, Hallstrom T & Riesbeck K (2009) Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. *Mol Immunol* 46(14):2808-2817.
- Boehm T (2012) Evolution of vertebrate immunity. *Curr Biol* 22(17):R722-732.
- Bohdanowicz M, Cosío G, Backer JM & Grinstein S (2010) Class I and class III phosphoinositide 3kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes. *The Journal of Cell Biology* 191(5):999-1012.
- Bohmer FD & Friedrich K (2014) Protein tyrosine phosphatases as wardens of STAT signaling. *Jak-Stat* 3(1):e28087.
- Booth JW, Trimble WS & Grinstein S (2001) Membrane dynamics in phagocytosis. Semin Immunol 13(6):357-364.
- Botelho RJ, Tapper H, Furuya W, Mojdami D & Grinstein S (2002) FcγR-mediated phagocytosis stimulates localized pinocytosis in human neutrophils. *J Immunol* 169(8):4423-4429.
- Bouchard P, Zhao Z, Banville D, Dumas F, Fischer EH & Shen SH (1994) Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C. *J Biol Chem* 269(30):19585-19589.
- Boulais J, Trost M, Landry CR, Dieckmann R, Levy ED, Soldati T, Michnick SW, Thibault P & Desjardins M (2010) Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* 6:423.
- Bourdeau A, Dube N & Tremblay ML (2005) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol* 17(2):203-209.
- Bretscher A (1999) Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* 11(1):109-116.
- Brown GD (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 6(1):33-43.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J & van Deurs B (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11(2):467-480.
- Cai Y, Biais N, Giannone G, Tanase M, Jiang G, Hofman JM, Wiggins CH, Silberzan P, Buguin A, Ladoux B & Sheetz MP (2006) Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys J* 91(10):3907-3920.
- Cantalupo G, Alifano P, Roberti V, Bruni CB & Bucci C (2001) Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *Embo J* 20(4):683-693.
- Cardoso CM, Jordao L & Vieira OV (2010) Rab10 regulates phagosome maturation and its overexpression rescues Mycobacterium-containing phagosomes maturation. *Traffic* 11(2):221-235.
- Caron E & Hall A (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282(5394):1717-1721.
- Carreno S, Kouranti I, Glusman ES, Fuller MT, Echard A & Payre F (2008) Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J Cell Biol* 180(4):739-746.
- Casbon AJ, Allen LA, Dunn KW & Dinauer MC (2009) Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome B localizes to the plasma membrane and Rab11-positive recycling endosomes. *J Immunol* 182(4):2325-2339.
- Chakravortty D & Hensel M (2003) Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect* 5(7):621-627.

- Chaurasiya SK & Srivastava KK (2009) Downregulation of protein kinase C-alpha enhances intracellular survival of Mycobacteria: role of PknG. *BMC microbiology* 9:271.
- China B, Sory MP, N'Guyen BT, De Bruyere M & Cornelis GR (1993) Role of the YadA protein in prevention of opsonization of Yersinia enterocolitica by C3b molecules. *Infect Immun* 61(8):3129-3136.
- Chong ZZ & Maiese K (2007) The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol* 22(11):1251-1267.
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD & Zerial M (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397(6720):621-625.
- Classen A, Lloberas J & Celada A (2009) Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods in molecular biology* 531:29-43.
- Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM & Adelstein RS (2004) Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem* 279(40):41263-41266.
- Cox D, Berg JS, Cammer M, Chinegwundoh JO, Dale BM, Cheney RE & Greenberg S (2002) Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol* 4(7):469-477.
- Cox D & Greenberg S (2001) Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol* 13(6):339-345.
- Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL & DeFranco AL (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. J Exp Med 186(7):1027-1039.
- D'Ambrosio D, Hippen KL, Minskoff SA, Mellman I, Pani G, Siminovitch KA & Cambier JC (1995) Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by FcγRIIB1. Science 268(5208):293-297.
- Davis AS, Vergne I, Master SS, Kyei GB, Chua J & Deretic V (2007) Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes. *PLoS Pathog* 3(12):e186.
- Defacque H, Egeberg M, Habermann A, Diakonova M, Roy C, Mangeat P, Voelter W, Marriott G, Pfannstiel J, Faulstich H & Griffiths G (2000) Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *Embo J* 19(2):199-212.
- Deretic V & Fratti RA (1999) Mycobacterium tuberculosis phagosome. Mol Microbiol 31(6):1603-1609.
- Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ & Desjardins M (2005) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol* 7(9):1263-1270.
- Descoteaux A & Matlashewski G (1989) c-fos and tumor necrosis factor gene expression in Leishmania donovani-infected macrophages. *Mol Cell Biol* 9(11):5223-5227.
- Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G & Huber LA (1994a) Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* 269(51):32194-32200.
- Desjardins M & Descoteaux A (1997a) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 185(12):2061-2068.
- Desjardins M, Huber LA, Parton RG & Griffiths G (1994b) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124(5):677-688.
- Desjardins M, Nzala NN, Corsini R & Rondeau C (1997b) Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* 110 (Pt 18):2303-2314.

- Diakowski W, Grzybek M & Sikorski AF (2006) Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 44(4):231-248.
- Dieckmann R, Gueho A, Monroy R, Ruppert T, Bloomfield G & Soldati T (2012) The balance in the delivery of ER components and the vacuolar proton pump to the phagosome depends on myosin IK in Dictyostelium. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11(10):886-900.
- Dieudonné-Vatran A, Krentz S, Blom AM, Meri S, Henriques-Normark B, Riesbeck K & Albiger B (2009) Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* Bind the Complement Inhibitor C4b-Binding Protein in a PspC Allele-Dependent Fashion. *The Journal of Immunology* 182(12):7865-7877.
- Doyle SE, O'Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, Suzuki S, Suzuki N, Modlin RL, Yeh WC, Lane TF & Cheng G (2004) Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* 199(1):81-90.
- Drecktrah D, Knodler LA, Ireland R & Steele-Mortimer O (2006) The mechanism of Salmonella entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* 7(1):39-51.
- Dubois MJ, Bergeron S, Kim HJ, Dombrowski L, Perreault M, Fournes B, Faure R, Olivier M, Beauchemin N, Shulman GI, Siminovitch KA, Kim JK & Marette A (2006) The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat Med* 12(5):549-556.
- Duclos S, Diez R, Garin J, Papadopoulou B, Descoteaux A, Stenmark H & Desjardins M (2000) Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Cell Science* 113(19):3531-3541.
- Dumas JJ, Merithew E, Sudharshan E, Rajamani D, Hayes S, Lawe D, Corvera S & Lambright DG (2001) Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol Cell* 8(5):947-958.
- Dunn KW, Kamocka MM & McDonald JH (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American journal of physiology. Cell physiology* 300(4):C723-742.
- Ehlers MR (2000) CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* 2(3):289-294.
- Erbacher A, Gieseke F, Handgretinger R & Müller I (2009) Dendritic cells: Functional aspects of glycosylation and lectins. *Human Immunology* 70(5):308-312.
- Ernst JD (2000) Bacterial inhibition of phagocytosis. Cell Microbiol 2(5):379-386.
- Erwig LP & Henson PM (2007) Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol* 171(1):2-8.
- Erwig LP, McPhilips KA, Wynes MW, Ivetic A, Ridley AJ & Henson PM (2006) Differential regulation of phagosome maturation in macrophages and dendritic cells mediated by Rho GTPases and ezrinradixin-moesin (ERM) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(34):12825-12830.
- Eskelinen EL (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular* aspects of medicine 27(5-6):495-502.
- Eskelinen EL, Tanaka Y & Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13(3):137-145.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA & Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405(6782):85-90.
- Fairn GD & Grinstein S (2012) How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* 33(8):397-405.
- Fang FC (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Micro* 2(10):820-832.

- Feng Y, Press B & Wandinger-Ness A (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131(6 Pt 1):1435-1452.
- Fievet B, Louvard D & Arpin M (2007) ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773(5):653-660.
- Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL & Lowell CA (2000) Fcγ receptormediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. J Exp Med 191(4):669-682.
- Flannagan RS, Cosio G & Grinstein S (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Micro* 7(5):355-366.
- Flannagan RS, Jaumouille V & Grinstein S (2012) The cell biology of phagocytosis. Annual review of pathology 7:61-98.
- Forget G, Siminovitch KA, Brochu S, Rivest S, Radzioch D & Olivier M (2001) Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *European Journal of Immunology* 31(11):3185-3196.
- Foster TJ (2005) Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol 3(12):948-958.
- Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D & Eck MJ (2010) The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(11):802-814.
- Frank C, Burkhardt C, Imhof D, Ringel J, Zschornig O, Wieligmann K, Zacharias M & Bohmer FD (2004) Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J Biol Chem* 279(12):11375-11383.
- Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S & Deretic V (2001) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 154(3):631-644.
- Fu Y & Galan JE (1998) The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 27(2):359-368.
- Garcia-Garcia E & Rosales C (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J* Leukoc Biol 72(6):1092-1108.
- Gazi U & Martinez-Pomares L (2009) Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214(7):554-561.
- Gessner JE, Heiken H, Tamm A & Schmidt RE (1998) The IgG Fc receptor family. Ann Hematol 76(6):231-248.
- Glass CK (2015) Genetic and genomic approaches to understanding macrophage identity and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(4):755-762.
- Golomb E, Ma X, Jana SS, Preston YA, Kawamoto S, Shoham NG, Goldin E, Conti MA, Sellers JR & Adelstein RS (2004) Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* 279(4):2800-2808.
- Gomez CP, Tiemi Shio M, Duplay P, Olivier M & Descoteaux A (2012) The Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 Regulates Phagolysosome Biogenesis. *J Immunol* 189(5):2203-2210.
- Gomez MA, Contreras I, Halle M, Tremblay ML, McMaster RW & Olivier M (2009) *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* 2(90):ra58.
- Gopaldass N, Patel D, Kratzke R, Dieckmann R, Hausherr S, Hagedorn M, Monroy R, Kruger J, Neuhaus EM, Hoffmann E, Hille K, Kuznetsov SA & Soldati T (2012) Dynamin A, Myosin IB and Abp1 couple phagosome maturation to F-actin binding. *Traffic* 13(1):120-130.
- Gordon AH, Hart PD & Young MR (1980) Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286(5768):79-80.

- Gordon S, Plüddemann A & Martinez Estrada F (2014) Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews* 262(1):36-55.
- Gordon S & Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5(12):953-964.
- Goyette G, Boulais J, Carruthers NJ, Landry CR, Jutras I, Duclos S, Dermine JF, Michnick SW, LaBoissiere S, Lajoie G, Barreiro L, Thibault P & Desjardins M (2012) Proteomic characterization of phagosomal membrane microdomains during phagolysosome biogenesis and evolution. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11(11):1365-1377.
- Grant BD & Donaldson JG (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(9):597-608.
- Green MC & Shultz LD (1975) Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J Hered* 66(5):250-258.
- Greenberg S (1995) Signal transduction of phagocytosis. Trends in Cell Biology 5(3):93-99.
- Gruber RC, LaRocca D, Minchenberg SB, Christophi GP, Hudson CA, Ray AK, Shafit-Zagardo B & Massa PT (2015) The control of reactive oxygen species production by SHP-1 in oligodendrocytes. *Glia* 63(10):1753-1771.
- Gutierrez MG, Mishra BB, Jordao L, Elliott E, Anes E & Griffiths G (2008) NF-kB activation controls phagolysosome fusion-mediated killing of *Mycobacteria* by macrophages. *The Journal of Immunology* 181(4):2651-2663.
- Gutzman JH, Sahu SU & Kwas C (2015) Non-muscle myosin IIA and IIB differentially regulate cell shape changes during zebrafish brain morphogenesis. *Dev Biol* 397(1):103-115.
- Haas A (2007) The phagosome: compartment with a license to kill. Traffic 8(4):311-330.
- Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D & Chimini G (2000) ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2(7):399-406.
- Hamrick TS, Havell EA, Horton JR & Orndorff PE (2000) Host and bacterial factors involved in the innate ability of mouse macrophages to eliminate internalized unopsonized Escherichia coli. *Infect Immun* 68(1):125-132.
- Harrison RE, Bucci C, Vieira OV, Schroer TA & Grinstein S (2003) Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23(18):6494-6506.
- Hauck CR, Gulbins E, Lang F & Meyer TF (1999) Tyrosine phosphatase SHP-1 Is involved in CD66mediated phagocytosis of Opa52-Expressing *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* 67(10):5490-5494.
- Heinonen KM, Bourdeau A, Doody KM & Tremblay ML (2009) Protein tyrosine phosphatases PTP-1B and TC-PTP play nonredundant roles in macrophage development and IFN-γ signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(23):9368-9372.
- Heissler SM & Sellers JR (2016) Various Themes of Myosin Regulation. J Mol Biol 10.1016/j.jmb.2016.01.022.
- Herre J, Gordon S & Brown GD (2004a) Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol* 40(12):869-876.
- Herre J, Marshall AS, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Reis e Sousa C, Gordon S & Brown GD (2004b) Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 104(13):4038-4045.
- Herre J, Willment JA, Gordon S & Brown GD (2004c) The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Crit Rev Immunol* 24(3):193-203.

- Hessle C, Andersson B & Wold AE (2000) Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun* 68(6):3581-3586.
- Hirano K, Miki Y, Hirai Y, Sato R, Itoh T, Hayashi A, Yamanaka M, Eda S & Beppu M (2005) A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J Biol Chem* 280(47):39284-39293.
- Huang Z-Y, Hunter S, Kim M-K, Indik ZK & Schreiber AD (2003) The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fcγ receptors FcγRIIB and FcγRIIA. *J Leukoc Biol* 73(6):823-829.
- Hunter T (2009) Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current Opinion in Cell Biology* 21(2):140-146.
- Husebye H, Aune MH, Stenvik J, Samstad E, Skjeldal F, Halaas O, Nilsen NJ, Stenmark H, Latz E, Lien E, Mollnes TE, Bakke O & Espevik T (2010) The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* 33(4):583-596.
- Hutagalung AH & Novick PJ (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 91(1):119-149.
- Huynh KK, Eskelinen E-L, Scott CC, Malevanets A, Saftig P & Grinstein S (2007a) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *Embo J* 26(2):313-324.
- Huynh KK & Grinstein S (2007b) Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3):452-462.
- Huynh KK, Kay JG, Stow JL & Grinstein S (2007c) Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology* 22:366-372.
- Iizumi Y, Sagara H, Kabe Y, Azuma M, Kume K, Ogawa M, Nagai T, Gillespie PG, Sasakawa C & Handa H (2007) The enteropathogenic E. coli effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe* 2(6):383-392.
- Imbuluzqueta E, Gamazo C, Ariza J & Blanco-Prieto MJ (2010) Drug delivery systems for potential treatment of intracellular bacterial infections. *Front Biosci* 15:397-417.
- Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A & Van Dyke TE (2004) Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun* 72(4):2312-2320.
- Iwasaki A & Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327(5963):291-295.
- Jensen K, Anderson JA & Glass EJ (2014) Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation. *Vet Immunol Immunopathol* 158(3-4):224-232.
- Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, Olkkonen VM & Neefjes J (2007) Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betall spectrin. *J Cell Biol* 176(4):459-471.
- Johnson SA, Pleiman CM, Pao L, Schneringer J, Hippen K & Cambier JC (1995) Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol* 155(10):4596-4603.
- Jung HS, Burgess SA, Billington N, Colegrave M, Patel H, Chalovich JM, Chantler PD & Knight PJ (2008) Conservation of the regulated structure of folded myosin 2 in species separated by at least 600 million years of independent evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(16):6022-6026.
- Kanwal Z, Zakrzewska A, den Hertog J, Spaink HP, Schaaf MJ & Meijer AH (2013) Deficiency in hematopoietic phosphatase ptpn6/Shp1 hyperactivates the innate immune system and impairs control of bacterial infections in zebrafish embryos. *J Immunol* 190(4):1631-1645.

- Kawai T & Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5):373-384.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E & Aebersold R (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74(20):5383-5392.
- Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S & Pawson T (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 18(7):4209-4220.
- Kinchen JM & Ravichandran KS (2008) Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(10):781-795.
- Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, Nagata S & Matsuda M (2008) Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453(7192):241-245.
- Knutson KL, Hmama Z, Herrera-Velit P, Rochford R & Reiner NE (1998) Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. J Biol Chem 273(1):645-652.
- Koonin EV & Krupovic M (2015) Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nature reviews. Genetics* 16(3):184-192.
- Kotsias F, Hoffmann E, Amigorena S & Savina A (2013) Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells. *Antioxidants & redox signaling* 18(6):714-729.
- Kozicky LK & Sly LM (2015) Phosphatase regulation of macrophage activation. Semin Immunol 27(4):276-285.
- Kozlowski M, Mlinaric-Rascan I, Feng GS, Shen R, Pawson T & Siminovitch KA (1993) Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J Exp Med* 178(6):2157-2163.
- Krendel M & Mooseker MS (2005) Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology* 20:239-251.
- Kruger JM, Fukushima T, Cherepanov V, Borregaard N, Loeve C, Shek C, Sharma K, Tanswell AK, Chow CW & Downey GP (2002) Protein-tyrosine phosphatase MEG2 is expressed by human neutrophils. Localization to the phagosome and activation by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 277(4):2620-2628.
- Kumar H, Kawai T & Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 30(1):16-34.
- Kuratani M, Kanzaki K, Yanaka N, Matsunaga S & Wada M (2012) Myosin Heavy Chain Expression and Oxidative Modifications in Diabetic Rat Hearts. *Open Journal of Applied Sciences* 2(4):8.
- Lahmar Q, Keirsse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E & Van Ginderachter JA (2016) Tissueresident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 1865(1):23-34.
- Lam GY, Huang J & Brumell JH (2010) The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Seminars in immunopathology* 32(4):415-430.
- Leclerc L, Rima W, Boudard D, Pourchez J, Forest V, Bin V, Mowat P, Perriat P, Tillement O, Grosseau P, Bernache-Assollant D & Cottier M (2012) Size of submicrometric and nanometric particles affect cellular uptake and biological activity of macrophages in vitro. *Inhalation toxicology* 24(9):580-588.

- Lee YH, Mungunsukh O, Tutino RL, Marquez AP & Day RM (2010) Angiotensin-II-induced apoptosis requires regulation of nucleolin and Bcl-xL by SHP-2 in primary lung endothelial cells. *J Cell Sci* 123(Pt 10):1634-1643.
- Li X, Rydzewski N, Hider A, Zhang X, Yang J, Wang W, Gao Q, Cheng X & Xu H (2016) A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation. *Nat Cell Biol* 10.1038/ncb3324.
- Liebl D & Griffiths G (2009) Transient assembly of F-actin by phagosomes delays phagosome fusion with lysosomes in cargo-overloaded macrophages. *J Cell Sci* 122(Pt 16):2935-2945.
- Liese J, Schleicher U & Bogdan C (2008) The innate immune response against Leishmania parasites. *Immunobiology* 213(3-4):377-387.
- Lim WA & Pawson T (2010) Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell* 142(5):661-667.
- Liu X, Yang T, Suzuki K, Tsukita S, Ishii M, Zhou S, Wang G, Cao L, Qian F, Taylor S, Oh MJ, Levitan I, Ye RD, Carnegie GK, Zhao Y, Malik AB & Xu J (2015) Moesin and myosin phosphatase confine neutrophil orientation in a chemotactic gradient. *J Exp Med* 212(2):267-280.
- Lodge R & Descoteaux A (2005) Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania. Clin Immunol* 114(3):256-265.
- Lodge R & Descoteaux A (2006a) Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. *Eur J Immunol* 36(10):2735-2744.
- Lodge R, Diallo TO & Descoteaux A (2006b) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol* 8(12):1922-1931.
- London A, Cohen M & Schwartz M (2013) Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:34.
- Louvet-Vallee S (2000) ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 92(5):305-316.
- Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC & Pryor PR (2003) Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* 20(2):141-154.
- Luzio JP, Pryor PR & Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8):622-632.
- Ma P, Cierniewska A, Signarvic R, Cieslak M, Kong H, Sinnamon AJ, Neubig RR, Newman DK, Stalker TJ & Brass LF (2012) A newly identified complex of spinophilin and the tyrosine phosphatase, SHP-1, modulates platelet activation by regulating G protein-dependent signaling. *Blood* 119(8):1935-1945.
- Majeed M, Caveggion E, Lowell CA & Berton G (2001) Role of Src kinases and Syk in Fcγ receptormediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *Journal of Leukocyte Biology* 70(5):801-811.
- Maravillas-Montero JL & Santos-Argumedo L (2012) The myosin family: unconventional roles of actindependent molecular motors in immune cells. *J Leukoc Biol* 91(1):35-46.
- Marches O, Covarelli V, Dahan S, Cougoule C, Bhatta P, Frankel G & Caron E (2008) EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol* 10(5):1104-1115.
- Marion S, Hoffmann E, Holzer D, Le Clainche C, Martin M, Sachse M, Ganeva I, Mangeat P & Griffiths G (2011) Ezrin promotes actin assembly at the phagosome membrane and regulates phagolysosomal fusion. *Traffic* 12(4):421-437.

- Martin A, Tsui HW, Shulman MJ, Isenman D & Tsui FW (1999) Murine SHP-1 splice variants with altered Src homology 2 (SH2) domains. Implications for the SH2-mediated intramolecular regulation of SHP-1. *J Biol Chem* 274(31):21725-21734.
- Martin KR, Xu Y, Looyenga BD, Davis RJ, Wu CL, Tremblay ML, Xu HE & MacKeigan JP (2011) Identification of PTPsigma as an autophagic phosphatase. *J Cell Sci* 124(Pt 5):812-819.
- Martinez FO & Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6:13.
- Medzhitov R & Janeway C, Jr. (2000) Innate immunity. N Engl J Med 343(5):338-344.
- Medzhitov R & Janeway CA, Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296(5566):298-300.
- Meyer T, Uher T, Schwartz P & Buchwald AB (1998) Tyrosine Phosphorylation of Moesin in Arachidonic Acid-Stimulated Human Platelets. *J Thromb Thrombolysis* 6(2):117-124.
- Mills IG, Jones AT & Clague MJ (1998) Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Current Biology* 8(15):881-884.
- Mills IG, Urbe S & Clague MJ (2001) Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *Journal of Cell Science* 114(10):1959-1965.
- Minton K (2013) Animal models: unravelling the motheaten phenotype. Nat Rev Immunol 13(5):306.
- Miró-Julià C, Roselló S, Martínez VG, Fink DR, Escoda-Ferran C, Padilla O, Vázquez-Echeverría C, Espinal-Marin P, Pujades C, García-Pardo A, Vila J, Serra-Pagès C, Holmskov U, Yélamos J & Lozano F (2011) Molecular and Functional Characterization of Mouse S5D-SRCRB: A New Group B Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily. *The Journal of Immunology* 186(4):2344-2354.
- Moleirinho S, Tilston-Lunel A, Angus L, Gunn-Moore F & Reynolds PA (2013) The expanding family of FERM proteins. *Biochem J* 452(2):183-193.
- Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH & Ponnambalam S (2005) Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 182(1):1-15.
- Nakamura F, Amieva MR & Furthmayr H (1995) Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J Biol Chem* 270(52):31377-31385.
- Nathan C & Shiloh MU (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16):8841-8848.
- Neel BG & Tonks NK (1997) Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology* 9(2):193-204.
- Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E & Aebersold R (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75(17):4646-4658.
- Ofek I, Goldhar J, Keisari Y & Sharon N (1995) Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 49:239-276.
- Olazabal IM, Caron E, May RC, Schilling K, Knecht DA & Machesky LM (2002) Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis. *Curr Biol* 12(16):1413-1418.
- Olivier M, Gregory DJ & Forget G (2005) Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(2):293-305.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P & Mann M (2006) Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127(3):635-648.

- Ozawa T, Nakata K, Mizuno K & Yakura H (2007) Negative autoregulation of Src homology region 2domain-containing phosphatase-1 in rat basophilic leukemia-2H3 cells. *International Immunology* 19(9):1049-1061.
- Paling NR & Welham MJ (2002) Role of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 (Src homology phosphatase-1) in the regulation of interleukin-3-induced survival, proliferation and signalling. *Biochem J* 368(Pt 3):885-894.
- Palm NW & Medzhitov R (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunological Reviews 227(1):221-233.
- Pankiv S, Alemu EA, Brech A, Bruun JA, Lamark T, Overvatn A, Bjorkoy G & Johansen T (2010) FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol* 188(2):253-269.
- Park H, Ishihara D & Cox D (2011) Regulation of tyrosine phosphorylation in macrophage phagocytosis and chemotaxis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 510(2):101-111.
- Paster W, Bruger AM, Katsch K, Gregoire C, Roncagalli R, Fu G, Gascoigne NR, Nika K, Cohnen A, Feller SM, Simister PC, Molder KC, Cordoba SP, Dushek O, Malissen B & Acuto O (2015) A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *Embo J* 34(3):393-409.
- Peiser L, De Winther MP, Makepeace K, Hollinshead M, Coull P, Plested J, Kodama T, Moxon ER & Gordon S (2002a) The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses. *Infect Immun* 70(10):5346-5354.
- Peiser L, Mukhopadhyay S & Gordon S (2002b) Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14(1):123-128.
- Pereira-Leal JB & Seabra MC (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 313(4):889-901.
- Pertuy F, Eckly A, Weber J, Proamer F, Rinckel JY, Lanza F, Gachet C & Leon C (2014) Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood* 123(8):1261-1269.
- Pixley FJ & Stanley ER (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 14(11):628-638.
- Pluddemann A, Mukhopadhyay S & Gordon S (2011) Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol Rev* 240(1):11-24.
- Podinovskaia M, VanderVen BC, Yates RM, Glennie S, Fullerton D, Mwandumba HC & Russell DG (2013) Dynamic quantitative assays of phagosomal function. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* 102:Unit 14 34.
- Ponuwei GA (2016) A glimpse of the ERM proteins. Journal of biomedical science 23:35.
- Pore D & Gupta N (2015) The ezrin-radixin-moesin family of proteins in the regulation of B-cell immune response. *Crit Rev Immunol* 35(1):15-31.
- Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M & Spang A (2010) Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* 141(3):497-508.
- Ramachandran IR, Song W, Lapteva N, Seethammagari M, Slawin KM, Spencer DM & Levitt JM (2011) The Phosphatase Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 is an intrinsic central regulator of dendritic cell function. *The Journal of Immunology* 10.4049/jimmunol.1001675.
- Ramel D, Wang X, Laflamme C, Montell DJ & Emery G (2013) Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nat Cell Biol* 15(3):317-324.

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

Ravetch JV & Kinet JP (1991) Fc receptors. Annu Rev Immunol 9:457-492.

- Ren L, Chen X, Luechapanichkul R, Selner NG, Meyer TM, Wavreille A-S, Chan R, Iorio C, Zhou X, Neel BG & Pei D (2011) Substrate specificity of protein tyrosine phosphatases 1B, RPTPα, SHP-1, and SHP-2. *Biochemistry* 10.1021/bi1014453:null-null.
- Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M & Wedlich-Soldner R (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature methods* 5(7):605-607.
- Riedl J, Flynn KC, Raducanu A, Gartner F, Beck G, Bosl M, Bradke F, Massberg S, Aszodi A, Sixt M & Wedlich-Soldner R (2010) Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nature methods* 7(3):168-169.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y, Hu Y, Tan Z, Stokes M, Sullivan L, Mitchell J, Wetzel R, Macneill J, Ren JM, Yuan J, Bakalarski CE, Villen J, Kornhauser JM, Smith B, Li D, Zhou X, Gygi SP, Gu TL, Polakiewicz RD, Rush J & Comb MJ (2007) Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131(6):1190-1203.
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y & Zerial M (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122(5):735-749.
- Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, Janssen L, Houben D, Janssen H, Zwart W & Neefjes J (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* 185(7):1209-1225.
- Roy CR (2002) The Dot/Icm transporter of *Legionella pneumophila*: a bacterial conductor of vesicle trafficking that orchestrates the establishment of a replicative organelle in eukaryotic hosts. *Int J Med Microbiol* 291(6-7):463-467.
- Russell D, VanderVen BC, Glennie S, Mwandumba H & Heyderman RS (2009) The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. *Nat Rev Immunol* 9(8):594-600.
- Rybicka JM, Balce DR, Chaudhuri S, Allan ER & Yates RM (2012) Phagosomal proteolysis in dendritic cells is modulated by NADPH oxidase in a pH-independent manner. *Embo J* 31(4):932-944.
- Sanchez-Mejorada G & Rosales C (1998) Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* 63(5):521-533.
- Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiach S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S & Green DR (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450(7173):1253-1257.
- Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, Lennon-Dumenil AM, Seabra MC, Raposo G & Amigorena S (2006) NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126(1):205-218.
- Schaper M, Leib SL, Meli DN, Brandes RP, Tauber MG & Christen S (2003) Differential effect of p47phox and gp91phox deficiency on the course of Pneumococcal Meningitis. *Infect Immun* 71(7):4087-4092.
- Schramek D, Sendoel A, Segal JP, Beronja S, Heller E, Oristian D, Reva B & Fuchs E (2014) Direct in vivo RNAi screen unveils myosin IIa as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas. *Science* 343(6168):309-313.
- Scianimanico S, Desrosiers M, Dermine JF, Meresse S, Descoteaux A & Desjardins M (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.
- Scott CC, Botelho RJ & Grinstein S (2003) Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol* 193(3):137-152.
- Seto S, Tsujimura K & Koide Y (2011) Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic* 12(4):407-420.
- Shinde SR & Maddika S (2016) PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylating Rab7. *Nature communications* 7:10689.
- Short B & Barr FA (2004) Membrane fusion: caught in a trap. Curr Biol 14(5):R187-189.
- Shultz LD & Green MC (1976) Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. II. Depressed immune competence and elevated serum immunoglobulins. *J Immunol* 116(4):936-943.
- Smutny M, Cox HL, Leerberg JM, Kovacs EM, Conti MA, Ferguson C, Hamilton NA, Parton RG, Adelstein RS & Yap AS (2010) Myosin II isoforms identify distinct functional modules that support integrity of the epithelial zonula adherens. *Nat Cell Biol* 12(7):696-702.
- Sobota A, Strzelecka-Kiliszek A, Gladkowska E, Yoshida K, Mrozinska K & Kwiatkowska K (2005) Binding of IgG-opsonized particles to FcγR is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation. *The Journal of Immunology* 175(7):4450-4457.
- Soldati T & Schliwa M (2006) Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(12):897-908.
- Solinet S, Mahmud K, Stewman SF, Ben El Kadhi K, Decelle B, Talje L, Ma A, Kwok BH & Carreno S (2013) The actin-binding ERM protein Moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex. *J Cell Biol* 202(2):251-260.
- Somani A-K, Bignon JS, Mills GB, Siminovitch KA & Branch DR (1997) Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 272(34):21113-21119.
- Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat Rev Mol Cell Biol 10(8):513-525.
- Stoker AW (2005) Protein tyrosine phosphatases and signalling. J Endocrinol 185(1):19-33.
- Strzelecka-Kiliszek A, Kwiatkowska K & Sobota A (2002) Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by FcγR. *J Immunol* 169(12):6787-6794.
- Strzelecka A, Kwiatkowska K & Sobota A (1997) Tyrosine phosphorylation and Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Letters* 400(1):11-14.
- Stuart LM, Boulais J, Charriere GM, Hennessy EJ, Brunet S, Jutras I, Goyette G, Rondeau C, Letarte S, Huang H, Ye P, Morales F, Kocks C, Bader JS, Desjardins M & Ezekowitz RA (2007) A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature* 445(7123):95-101.
- Stuart LM & Ezekowitz RA (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* 8(2):131-141.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J & Russell DG (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263(5147):678-681.
- Su L, Zhao Z, Bouchard P, Banville D, Fischer EH, Krebs EG & Shen SH (1996) Positive effect of overexpressed protein-tyrosine phosphatase PTP1C on mitogen-activated signaling in 293 cells. *J Biol Chem* 271(17):10385-10390.
- Su MW, Yu CL, Burakoff SJ & Jin YJ (2011) Targeting Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1) into lipid rafts inhibits CD3-induced T cell activation. *The Journal of Immunology* 166(6):3975-3982.
- Sun Q, Westphal W, Wong KN, Tan I & Zhong Q (2010) Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(45):19338-19343.
- Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(8):639-649.

- Swanson JA & Hoppe AD (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 76(6):1093-1103.
- Swanson JA, Johnson MT, Beningo K, Post P, Mooseker M & Araki N (1999) A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci* 112 (Pt 3):307-316.
- Tajrishi MM, Tuteja R & Tuteja N (2011) Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & integrative biology* 4(3):267-275.
- Takeda K & Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. International Immunology 17(1):1-14.
- Takeuchi O & Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 140(6):805-820.
- Tautz L, Critton DA & Grotegut S (2013) Protein tyrosine phosphatases: structure, function, and implication in human disease. *Methods in molecular biology* 1053:179-221.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD & Gordon S (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23:901-944.
- Thi EP, Lambertz U & Reiner NE (2012) Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog* 8(3):e1002551.
- Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP & Walter E (2001) Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release* 76(1-2):59-71.
- Tietze K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K & Nonnenmacher C (2006) Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of periodontal research* 41(5):447-454.
- Timms JF, Carlberg K, Gu H, Chen H, Kamatkar S, Nadler MJS, Rohrschneider LR & Neel BG (1998) Identification of major binding proteins and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 18(7):3838-3850.
- Tonks NK (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(11):833-846.
- Tonks NK, Diltz CD & Fischer EH (1988) Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem* 263(14):6722-6730.
- Traves PG, Pardo V, Pimentel-Santillana M, Gonzalez-Rodriguez A, Mojena M, Rico D, Montenegro Y, Cales C, Martin-Sanz P, Valverde AM & Bosca L (2014) Pivotal role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the macrophage response to pro-inflammatory and anti-inflammatory challenge. *Cell death* & *disease* 5:e1125.
- Tridandapani S & Anderson C (2005) Regulation of phagocytosis by FcγRIIb and phosphatases. *Molecular mechanisms of phagocytosis*, Rosales C (Édit.) Springer Science, Mexico Vol 1. p 11.
- Troegeler A, Lastrucci C, Duval C, Tanne A, Cougoule C, Maridonneau-Parini I, Neyrolles O & Lugo-Villarino G (2014) An efficient siRNA-mediated gene silencing in primary human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Immunol Cell Biol* 92(8):699-708.
- Trost M, Bridon G, Desjardins M & Thibault P (2010) Subcellular phosphoproteomics. *Mass Spectrom Rev* 29(6):962-990.
- Trost M, English L, Lemieux S, Courcelles M, Desjardins M & Thibault P (2009) The phagosomal proteome in interferon-γ-activated macrophages. *Immunity* 30(1):143-154.
- Tsan M-F & Baochong Gao (2007) Review: Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research* 13(1):6-14.
- Tse SM, Furuya W, Gold E, Schreiber AD, Sandvig K, Inman RD & Grinstein S (2003) Differential role of actin, clathrin, and dynamin in Fc gamma receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *J Biol Chem* 278(5):3331-3338.

- Tsui FW, Martin A, Wang J & Tsui HW (2006) Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1. *Immunol Res* 35(1-2):127-136.
- Tsui HW, Siminovitch KA, de Souza L & Tsui FW (1993) Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* 4(2):124-129.
- Underhill DM & Goodridge HS (2012) Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 12(7):492-502.
- Underhill DM & Ozinsky A (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20:825-852.
- Ungar D & Hughson FM (2003) SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:493-517.
- Vakevainen M, Greenberg S & Hansen EJ (2003) Inhibition of phagocytosis by Haemophilus ducreyi requires expression of the LspA1 and LspA2 proteins. *Infect Immun* 71(10):5994-6003.
- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M & Peters PJ (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129(7):1287-1298.
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H & Fang FC (2000) Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med* 192(2):227-236.
- Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J & Deretic V (2005) Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11):4033-4038.
- Verhoven B, Schlegel RA & Williamson P (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 182(5):1597-1601.
- Verschoor CP, Puchta A & Bowdish DM (2012) The macrophage. *Methods in molecular biology* 844:139-156.
- Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS & Horwitz AR (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(11):778-790.
- Vieira OV, Botelho RJ & Grinstein S (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* 366(Pt 3):689-704.
- Vieira OV, Bucci C, Harrison RE, Trimble WS, Lanzetti L, Gruenberg J, Schreiber AD, Stahl PD & Grinstein S (2003) Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 23(7):2501-2514.
- Vikis HG & Guan KL (2004) Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. *Methods in molecular biology* 261:175-186.
- Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ & Descoteaux A (2009) The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog* 5(10):e1000628.
- Wang W, Liu L, Song X, Mo Y, Komma C, Bellamy HD, Zhao ZJ & Zhou GW (2011a) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation. *Journal of Cellular Biochemistry* 112(8):2062-2071.
- Wang Y, Mao M & Xu JC (2011b) Cell-surface nucleolin is involved in lipopolysaccharide internalization and signalling in alveolar macrophages. *Cell biology international* 35(7):677-685.
- West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR & Watts C (2004) Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305(5687):1153-1157.

- Wientjes FB, Reeves EP, Soskic V, Furthmayr H & Segal AW (2001) The NADPH oxidase components p47(phox) and p40(phox) bind to moesin through their PX domain. *Biochem Biophys Res Commun* 289(2):382-388.
- Wu Y, Tibrewal N & Birge RB (2006) Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in Cell Biology* 16(4):189-197.
- Wynn TA, Chawla A & Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496(7446):445-455.
- Xiong D, Du Y, Wang HB, Zhao B, Zhang H, Li Y, Hu LJ, Cao JY, Zhong Q, Liu WL, Li MZ, Zhu XF, Tsao SW, Hutt-Fletcher LM, Song E, Zeng YX, Kieff E & Zeng MS (2015) Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(35):11036-11041.
- Xu F, Xu MJ, Zhao R, Guerrah A, Zeng F & Zhao ZJ (2002) Tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are associated with distinct tyrosine-phosphorylated proteins. *Exp Cell Res* 272(1):75-83.
- Yam PT & Theriot JA (2004) Repeated cycles of rapid actin assembly and disassembly on epithelial cell phagosomes. *Mol Biol Cell* 15(12):5647-5658.
- Yamauchi S, Kawauchi K & Sawada Y (2012) Myosin II-dependent exclusion of CD45 from the site of Fcgamma receptor activation during phagocytosis. *FEBS Lett* 586(19):3229-3235.
- Yang J, Liu L, He D, Song X, Liang X, Zhao ZJ & Zhou GW (2003) Crystal structure of human proteintyrosine phosphatase SHP-1. *Journal of Biological Chemistry* 278(8):6516-6520.
- Yu X, Lu N & Zhou Z (2008) Phagocytic receptor CED-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells. *PLoS Biol* 6(3):e61.
- Zhang J, Somani AK & Siminovitch KA (2000) Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol* 12(4):361-378.
- Zhang ZY (2002) Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42:209-234.
- Zhang ZY (2005) Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches. *Biochim Biophys Acta* 1754(1-2):100-107.
- Zhao R, Fu X, Li Q, Krantz SB & Zhao ZJ (2003) Specific interaction of protein tyrosine phosphatase-MEG2 with phosphatidylserine. *J Biol Chem* 278(25):22609-22614.
- Zhou MJ & Brown EJ (1994) CR3 (Mac-1, αMβ 2, CD11b/CD18) and FcγRIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for FcγRIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol* 125(6):1407-1416.