

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé:

**ÉTUDE PROTÉOMIQUE ET BIOINFORMATIQUE DU PHAGOSOME
DE LA DROSOPHILE**

Présenté par:

Jonathan Boulais

Pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pathologie et biologie cellulaire

Août, 2005

© Jonathan Boulais, 2005
Université de Montréal



W

4

U58

2006

V.005

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**ÉTUDE PROTÉOMIQUE ET BIOINFORMATIQUE DU PHAGOSOME
DE LA DROSOPHILE**

Présenté par:

Jonathan Boulais

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Pierre Thibault

Président du jury

Dr. Jacques Paiement

Membre du jury

Dr. Michel Desjardins

Directeur de recherche

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

La phagocytose est un processus d'internalisation de corps étranger retrouvée à travers les eucaryotes. Chez l'amibe unicellulaire *Dictyostelium discoideum*, la phagocytose est utilisée comme mécanisme de nutrition. Chez le mammifère, elle joue un rôle clé au niveau de l'immunité innée (la capacité de tuer directement les microorganismes) et de l'immunité acquise (une réponse immunitaire secondaire impliquant la production d'anticorps et de cellules cytotoxiques).

Plus précisément, il fut démontré que ce mécanisme de la phagocytose s'effectue par l'invagination de la membrane plasmique et du recrutement du réticulum endoplasmique sous la coupe phagocytaire, afin de former un phagosome. Par une série de fusion successive à travers la voie endo-lysosomale, le phagosome acquiert différentes protéines nécessaires à la mise en oeuvre de ses différentes fonctions. Ainsi, la maturation du phagosome permet entre autres la dégradation des particules internalisées à l'aide d'hydrolases variées.

Il s'ensuit que les peptides résultants de cette dégradation peuvent être apprêtés pour la présentation antigénique sur le CMH II et sur le CMH I, par la présentation-croisée, afin d'activer une réponse immunitaire adaptative. Ces caractéristiques définissent un rôle central du phagosome au sein des phagocytes professionnels permettant ainsi un lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise.

Dans ce contexte, il devient très intéressant de déterminer quelles sont les caractéristiques moléculaires de la voie phagocytaire qui apparaissent ou disparaissent au cours de l'évolution, dans le but d'associer les propriétés fonctionnelles à la réponse immunitaire acquise. La drosophile, contrairement aux mammifères, est un organisme dépourvu d'immunité acquise et se propose comme étant un modèle de choix pour établir les propriétés de la réponse immunitaire innée.

Pour ce faire, nous avons adapté la technique d'isolation de phagosomes par billes de latex, une approche initialement développée chez les cellules de souris, aux cellules de mouche à fruits *Drosophila melanogaster*. Dans le but subséquent de comparer à travers l'évolution différents protéomes de phagosomes isolés. La validation de cette méthode nous a révélé que les phagosomes isolés étaient d'une excellente pureté, puisqu'ils étaient dépourvus de contaminants nucléaires et de mitochondries.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué une analyse protéomique par spectrométrie de masse qui nous a permis d'identifier, à l'aide d'outils bioinformatique, 617 protéines associées aux phagosomes de la drosophile. De ce protéome, 17% seraient considérés comme inconnu. De plus, l'analyse bioinformatique des domaines transmembranaires nous a révélé que 80% du protéome de phagosome de la drosophile est dépourvue de domaine

transmembranaire, ce qui reflète le côté dynamique que se doit de posséder le phagosome lors de sa maturation au sein de la voie endo-lysosomale. Il faut toutefois noter que l'analyse par spectrométrie de masse pourrait défavoriser la détection de protéines transmembranaires et qu'en réalité notre pourcentage de protéines transmembranaires soit supérieur.

Enfin, cette étude protéomique et bioinformatique nous a permis de développer différents modèles moléculaires qui font état des fonctions hypothétiques associées au phagosome. Ces modèles regroupent : la fusion d'endosomes, l'exocytose, la fusion du réticulum endoplasmique, la traduction et le transport ciblé d'ARNm.

Mots clés : bioinformatique, drosophile, endosome, évolution, exocytose, immunité innée, phagocytose, protéomique, réticulum endoplasmique, traduction, transport d'ARNm.

SUMMARY

Phagocytosis is an internalisation process of foreign bodies that is found through out eukaryotes. In the unicellular amoeba *Dictyostellium discoideum*, phagocytosis is used as a nutritional mechanism. In mammals, it plays a key role at the level of innate immunity (capacity to kill microorganisms directly) and acquired immunity (a secondary, immune response involving the production of antibody and cytotoxic cells).

More precisely, it was shown that phagocytosis is carried out by the invagination of the plasma membrane and the recruitment of the endoplasmic reticulum under the phagocytic cup in order to form a phagosome. By a series of successive fusions through the endo-lysosomal pathway, the phagosome acquires various proteins necessary to the implementation of its various functions. Thus, the maturation of the phagosome allows the degradation of the particules internalized by the hydrolases.

The peptides resulting from this degradation can be processed for the antigenic presentation on the MHC II and, by the cross-presentation process on the MHC I, in order to activate an adaptive immune response. Theses characteristics place the phagosome at the center of professional phagocytes function and establish the link between the innate and the acquired immunity.

In this context, it becomes very interesting to determine what are the molecular characteristics of the phagocytic pathway which appear or disappear through evolution, in order to associate the functional properties associated with the acquired immunity response. *Drosophila*, as opposed to the mammals, is an organism deprived of acquired immunity and become a model of choice to determine the properties associated with the innate immunity.

First, we adapted the latex bead phagosomal isolation method initially developed for mouse macrophage cells to the macrophage cells of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The validation of this method revealed that the isolated phagosomes were of excellent purity, since they were deprived of nuclear and mitochondrial contaminants.

Secondly, we carried out a proteomic analysis using mass spectrometry and identified 617 proteins associated with the phagosomes of *drosophila*. Of this proteome analysis, 17% of proteins identified were of unknown functions. Moreover, a bioinformatic analysis of the transmembrane domains revealed that 80% of the phagosomal proteome of *drosophila* is deprived of transmembrane domain, which reflects the dynamic maturation process of the phagosome within the endo-lysosomal pathway. However, it must be considered that mass spectrometry analysis could disadvantage the detection of transmembrane proteins and that our transmembrane protein percentage could be higher than from our results.

Finally, these proteomic and bioinformatic analysis enabled the development of various models which presents hypothetical functions associated to the phagosome. These models regroup : the fusion of endosome, the exocytosis, the fusion of the endoplasmic reticulum, translation and the mRNA targeted transport.

Keywords : bioinformatics, drosophila, endosome, evolution, exocytosis, innate immunity, mRNA transport, phagocytosis, proteomic, endoplasmic reticulum, translation.

Table des matières

	Pages
Page titre.....	I
Identification du jury.....	II
Sommaire.....	III
Summary.....	VI
Table des matières.....	VI
Liste des tableaux.....	XIV
Liste des figures.....	XV
Liste des abréviations.....	XVII
Dédicace.....	XXII
Chapitre I : INTRODUCTION.....	1
1. LE CONCEPT ÉVOLUTIF DE LA PHAGOCYTOSE.....	1
2. LA NUTRITION PAR PHAGOCYTOSE CHEZ L'AMIBE <i>Dictyostelium discoideum</i>	2
2.1 Les récepteurs impliqués lors de la phagocytose chez <i>Dictyostelium</i> <i>discoideum</i>	
2.2 La maturation du phagosome chez <i>Dictyostelium discoideum</i>	
3. L' »ENGLOUTISSEMENT » DES CELLULES APOPTOTIQUES CHEZ <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
3.1 Le mécanisme de l'engloutissement des cellules apoptotiques chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	
3.2 L'engloutissement permet l'apoptose chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	
4. L'IMMUNITÉ INNÉE VERSUS L'IMMUNITÉ ACQUISE CHEZ LES ANIMAUX.....	10
4.1 La défense immunitaire chez <i>Drosophila melanogaster</i>	
4.2 La phagocytose chez <i>Drosophila melanogaster</i>	
4.3 Les récepteurs impliqués dans la phagocytose chez <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	
5. LA PHAGOCYTOSE À TRAVERS L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE DES MAMMIFÈRES.....	17

- 5.1 L'implication du réticulum endoplasmique dans la phagocytose
- 5.2 La phagocytose et la présentation-croisée chez les mammifères
- 5.3 La protéomique dans l'étude de la phagocytose

Chapitre II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	27
1. CULTURE CELLULAIRE.....	27
2. ISOLATION DE PHAGOSOMES À PARTIR DE LA LIGNÉE CELLULAIRE S2	27
3. VÉRIFICATION PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DE LA PURETÉ DES PHAGOSOMES ISOLÉS.....	29
3.1 Technique d'isolation de phagosome à l'aide de billes de latex	
3.2 Fixation des échantillons	
3.3 Osmification et imprégnation des membranes à l'acétate d'uranyl	
3.4 Déshydratation et enrobage dans l'épon	
4. PRÉPARATION D'UN LYSAT CELLULAIRE TOTAL (TCL).....	31
5. PRÉPARATION DE MEMBRANE TOTALE (TM).....	31
6. DOSAGE PROTÉIQUE PAR LA MÉTHODE EZQ.....	32
6.1 Préparation de la courbe standard, du TCL et des échantillons	
6.2 Préparation du papier d'essai et dosage	
7. IMMUNOBUVARDAGE COURT.....	33
7.1 Électrophorèse sur gel pré-coulé NuPAGE 12% bis-tris 1mm	
7.2 Transfert sur membrane de PVDF	
7.3 Hybridation des protéines avec les anticorps	
7.4 Anticorps utilisés	
8. PRÉPARATION D'UN GEL POUR L'ANALYSE PROTÉOMIQUE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	37
8.1 Électrophorèse sur gel pré-coulé Nu-PAGE 12% bis-tris 1mm	
8.2 Découpage des bandes	
9. TRAITEMENT DES DONNÉES PROTÉOMIQUES PAR BIOINFORMATIQUE.....	40
9.1 Digestion et spectrométrie de masse des échantillons	
9.2 L'identification de protéines par le logiciel Mascot	
9.3 La base de donnée relationnelle MySQL	
9.4 L'annotation de protéines par le langage de programmation Python	

- 9.5 Détermination des domaines transmembranaires par le modèle hidden Markov (HMM)
- 9.6 Alignement peptidique
- 9.7 Détermination de la liste protéique du phagosome et modélisation moléculaire

Chapitre III : RÉSULTATS	47
1. VALIDATION DE LA PURETÉ DE LA TECHNIQUE D'ISOLATION DE PHAGOSOMES.....	47
1.1 Présence de noyaux intacts dans le PNS « Post Nuclear Supernatant »	
1.2 Pureté de l'isolation de phagosomes	
2. ANALYSES BIOINFORMATIQUE.....	51
2.1 Protéome du phagosome de la drosophile	
2.2 Alignement peptidique	
2.3 Domaine transmembranaire prédit par le modèle TMHMM 2.0	
2.4 Modélisation moléculaire : l'exocytose	
2.5 Modélisation moléculaire : la fusion d'endosome	
2.6 Modélisation moléculaire : la fusion du réticulum endoplasmique et la traduction	
2.7 Le transport d'ARNm	
 Chapitre IV : DISCUSSION	 67
- Pureté des préparations de phagosomes isolés à l'aide de billes de latex.....	68
- Analyse protéomique par spectrométrie de masse des préparations de phagosomes de la drosophile.....	70
- Analyses bioinformatiques de l'alignement peptidique.....	72
- Analyses bioinformatiques des domaines transmembranaires.....	73
- Modélisation moléculaire.....	74
- Le recrutement du réticulum endoplasmique lors de la phagocytose.....	75
- La traduction au niveau du phagosome	77
- Le transport ciblé d'ARNm au niveau du phagosome	79
 Chapitre V : CONCLUSION	 83
Chapitre VI : BIBLIOGRAPHIE	86
Remerciements	94

Liste des tableaux

Tableau 1 : Pourcentage du nombre de domaine transmembranaire prédit par le modèle TMHMM 2.0 pour les protéines identifiées du protéome du phagosome de la drosophile.

Liste des figures

Chapitre I :

- Figure 1 : Voies de signalisations de Toll et *Imd* (*immune deficiency*) dans le contrôle de l'expression de peptides antimicrobiens.
- Figure 2 : Voies de signalisations de Toll et *Imd* (*immune deficiency*) dans le contrôle de l'expression de peptides antimicrobiens.
- Figure 3 : Phagosome virtuel reconstitué à partir des protéines identifiées par protéomique
- Figure 4 : Modèle membranaire de la phagocytose.
- Figure 5 : Modèle de la présentation-croisée au niveau du phagosome.
- Figure 6 : Schéma relationnel de la base de donnée protéomique.

Chapitre III :

- Figure 7 : Image de l'intégrité des membranes nucléaires.
- Figure 8 : Image de la pureté des phagosomes isolés.
- Figure 9 : Immunobuvardage contre les protéines Lamin Dm0 et Rab7.
- Figure 10 : Alignement peptidique de la protéine Calnexine.
- Figure 11 : Modèle moléculaire de l'exocytose au niveau du phagosome de la drosophile.
- Figure 12 : Immunobuvardage envers la protéine Sec8 d'une cinétique de phagocytose.
- Figure 13 : Modèle moléculaire de la fusion d'endosome, de microdomaines lipidiques (en vert foncé) et des systèmes de dégradation/détoxification au niveau du phagosome de la drosophile.
- Figure 14 : Immunobuvardage d'une cinétiques de phagocytose envers les protéines Rab5 et Rab7.

Figure 15 : Modèle moléculaire de la fusion du réticulum endoplasmique et de la traduction au niveau du phagosome de la drosophile.

Figure 16 : Immunobuvardage envers les protéines Calnexine et CG7359 (homologue de Sec22) d'une cinétique de phagocytose.

Figure 17 : Modèle moléculaire du transport d'ARNm au niveau du phagosome de la drosophile.

Liste des abréviations

a :	Sous-unité a de la v-ATPase Vo
A :	Site d'entrée des ARNt-aminoacyl
ADN :	Acide désoxyribonucléique
α -Actn :	alpha-actinin
Ank :	Ankyrin
AP :	Adaptor Protein complexe
ARF :	ADP-ribosylation factor
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomale
Arp :	Actin-related protein homologue
Bip et GRP :	Glucose-regulated protein precursor
CABP1 :	Calcium-binding protein
CAP1 :	Adenyl cyclase-associated protein
Ced-12 :	ELMO orthologue
CG1691 :	IGF-II mRNA-binding protein orthologue
CG2852 :	Rotamase orthologue
CG2918 :	Member of the Hsp70 family
CG2970 :	Stomatin-like protein 2 orthologue
CG3151 :	RNA-binding protein HuD orthologue
CG3265 :	End-binding protein 1
CG3305 :	Lamp-1 orthologue
CG3415 :	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 orthologue
CG4422 :	Rab GDI alpha orthologue
CG5077 :	Oxysterol binding protein-like 8 orthologue
CG5170 :	Vigilin orthologue
CG5474 :	TRAP- β orthologue
CG5830 :	Nuclear LIM interactor-interacting factor 1 orthologue
CG6259 :	Syntaxin family 7 orthologue
CG6606 :	RAB11 family interacting protein 2 orthologue
CG6692 :	Cathepsin L orthologue
CG6838 :	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein orthologue
CG6946 :	hnRNP H orthologue
CG7144 :	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase orthologue
CG7176 :	Isocitrate dehydrogenase orthologue
CG7185 :	Cleavage and polyadenylation specific factor 6 orthologue
CG7359 :	Vesicle trafficking protein SEC22b orthologue
CG8014 :	DnaJ homolog subfamily C member 13 orthologue
CG8243 :	Stromal membrane-associated protein orthologue
CG8947 :	Homolog of Sarcophaga 26

CG8983 :	Disulfide-isomerase A3 precursor orthologue
CG9000 :	Zinc metalloproteinase, STE24 homologue
CG9035 :	Translocon-associated protein, delta subunit orthologue
CG9373 :	Myelin basic protein expression factor 2 orthologue
CG9748 :	DEAD-box protein 3
CG9998 :	Splicing factor U2AF 50 kDa subunit
CG10686 :	RAP-55 orthologue
CG10691 :	Prohibitin orthologue
CG10882 :	SEC24-related orthologue
CG11208 :	2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase orthologue
CG11785 :	Transmembrane protein Tmp21 precursor orthologue
CG12070 :	Prosaposin orthologue
CG12749 :	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
CG13887 :	BCR-associated protein Bap31 orthologue
CG17450 :	Splicing factor 45 orthologue
CG18811 :	GPI-anchored orthologue
CG31048 :	Presenilin binding protein orthologue
CG31249 :	CGI-99 orthologue
CG32423 :	RNA-binding protein RBMS3 orthologue
CG33113 :	Reticulon-1 orthologue
CG18572 :	Protéine CAD
CG32758 :	Sorting nexin 27 orthologue
CG33303 :	Ribophorin I orthologue
chi :	Chickadee
CRC :	Calreticuline
Crk :	Ced-2
CSP :	Cystein String Protein
Dcr-1 :	Dicer-1
dDyn :	Dynamamin
DDX :	DEAD box protein
dFMR1 :	Fragile X mental retardation syndrome related protein
DM2-MMP :	Matrix metalloproteinase 2
Dmp68 :	ATP-dependent RNA helicase P62
DSHB :	Developmental studies hybridoma bank
E :	Ubiquitin-activating enzyme
EEA :	Early endosome antigen
EF :	Elongation factor
eIF :	Elongation initiation factor
ER :	Endoplasmic reticulum
Erp :	Protein disulfide isomerase precursor
FBS :	Sérum foetal de bovin
FLNa :	Filamin a

G6P :	Glucose-6-phosphatase
G6PD :	6-phosphogluconate dehydrogenase : decarboxylating
GAL3 :	Galactoside-binding lectin
GAPDH :	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDI :	GDP dissociation inhibitor
GILT :	γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase
GRB2 ASH :	Growth-factor receptor-bound protein 2
GRP78 :	Glucose-regulated protein 78 kDa
H :	Hydrolases
HB :	Homogenisation buffer
hnRNP :	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HSC71 :	Heat-shock cognate protein 71 kDa
HRP :	Peroxydase de raifort
HSP :	Heat-shock protein
hts :	Hu-li Tai Shao
HTML :	Hyper Text Markup Language
Ig :	Immunoglobuline
IGF :	Insulin-like growth factor 2 : zipcode-binding protein 1
Khc :	Kinesin heavy chain
Kst :	β -spectrin heavy chain
Lam :	Lamin Dm0
LAMP :	Lysosome-associated membrane protein
Lap :	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein
Lark :	RNA-binding protein lark
LB :	Bille de latex
LGP110 :	Lysosomal membrane glycoprotein 110 kDa
LIMP :	Lysosomal integral-membrane protein
MAP :	Microtubule Associated Protein
mbc :	DOCK180 orthologue
Met :	Methionine
MHC ou CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
β -MPP :	Mitochondrial processing peptidase beta subunit
MPS :	Macrophage-specific protein
Myo-2 :	Myosin heavy chain : non-muscle
MySQL :	Structured query language
N :	Noyau
NAC :	Nascent-polypeptide-associated complex
NDK :	Nucleoside diphosphate kinase
nonAdiss :	No-on-transient A protein

NSF :	N-ethylmaleimide-sensitive factor
p/p :	Poids/poids
p/v :	Poids/volume
P450R :	NADPH--cytochrome P450 reductase
P :	Site d'entré des ARNt-peptidyl
PABP :	Poly(A)-binding protein
Par-1 :	Proteinase-activated receptors
Pax :	Paxillin
PBS :	Tampon phosphate salin
PDI :	Protein-disulphide isomerase
PGM :	Phosphoglucomutase
PNS :	Post nuclear supernatent
PVDF :	Fluorure de polyvinylidene
Rab :	Ras-related GTP-binding protein
Ral, Ras et Rho :	Ras-related GTP-binding protein
RAFT:	Microdomaine lipidique ou radeau lipidique
RE :	Réticulum endoplasmique
RH03206p :	Epoxide hydrolase 1 orthologue
Rin :	Rasputin
ROP :	Syntaxin binding protein 1 orthologue
RpL :	Ribosomal protein (large subunit)
rpm :	Rotation par minute
RPMPN :	Réseau de protéomique de Montréal
RPN :	Ribophorin
S :	Sverberg
SCAR :	Suppressor of cAMP receptor
Sec :	Sous-unité du complexe de l'exocyst
Sec2 :	Petite GTPase
Sec22 :	V-SNARE
Sec61 :	Translocon
SIL1 :	Chaperone du réticulum endoplasmique
SNAP :	Soluble NSF-attachment proteins
SOD :	Superoxide dismutase
SPC25 :	Probable microsomal signal peptidase 25 kDa subunit
Squid :	RNA-binding protein squid (HNRNP 40)
SRP :	Signal recognition protein
Syb :	Synaptobrevin
Syx7 :	Syntaxin 7
TAP :	Antigen peptide transporter
TCP :	T-complex locus
TCL :	Lysat cellulaire totaux
Ti :	Titanium

TM :	Membrane totale
TMHMM :	Transmembrane hidden Markov model
TMP21 :	Transmembrane trafficking protein 21 kDa
TPX2 :	Targeting protein for XKLP2 (Xenopus kinesin-like protein 2)
TRAIL :	Tumour-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAP :	Translocon-associated protein
TSG101 :	Tumor suppressor protein 101
Ub :	Ubiquitin
Upf1 :	Regulator of nonsense transcripts 1 homolog
usnp :	SNAP-29 orthologue
UTR :	Untranslated region
v/v :	Volume/volume
V :	Volts
Vo et V ₁ :	Sous-unité de la v-ATPase.
VAP :	VAMP-associated protein
V-ATPase :	Vacuolar ATP synthase
VDAC :	Voltage dependent anion-selective channel protein
x :	Grossissement
ZC :	Zip code

À papa et maman, ti-bro, Méli, Sylvain et messieurs
Ament, Gossard, McCready et Vedder pour m'avoir
accompagné, motivé et soutenu continuellement

INTRODUCTION

1. Le concept évolutif de la phagocytose

La phagocytose est le processus cellulaire permettant l'internalisation et la destruction de corps étrangers. D'un point de vue évolutif, la phagocytose est considérée comme un simple processus de nutrition que l'on retrouve à partir des protozoaires jusqu'aux métazoaires primitifs (Hickman et al., 2001). Chez les unicellulaires, tels que les amibes, l'absence d'un système digestif est entièrement compensée par la cellule même. Les corps nutritifs retrouvés dans l'environnement de ces unicellulaires sont phagocytés, puis dégradés en nutriments essentiels, afin de permettre leur utilisation aux diverses fonctions cellulaires de l'amibe.

À l'opposé toutefois, les organismes pluricellulaires évolués ont développé un système digestif composé d'organes spécialisés qui procurent nutriments et minéraux sous formes assimilables aux autres organes du corps. De ce fait, nous croyons que la fonction nutritive de la phagocytose que l'on retrouvait chez les unicellulaires fut intégrée au système immunitaire à travers le développement des cellules phagocytaires professionnelles. Dès lors, la phagocytose fut impliquée dans l'élimination des corps étrangers, des corps apoptotiques et des débris cellulaires; un rôle clé au coeur de l'interaction entre l'immunité innée et adaptative.

2. La nutrition par phagocytose chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*

Les amibes sont des organismes phylogénétiquement diversifiés qui représentent une vaste portion des protozoaires. Elles sont surtout retrouvées au niveau du sol des forêts et se nourrissent par phagocytose de bactéries et de levures (Steinert et al., 2003). Le fait que ces organismes primitifs se nourrissent par phagocytose fut fort utile dans l'étude du processus de la phagocytose, puisqu'il est démontré que la phagocytose, chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* tout comme chez les vertébrés, s'effectue selon les quatre principales étapes suivantes: (a) la reconnaissance et la liaison de la particule à la surface cellulaire par une interaction ligand-récepteur, (b) l'activation de voie de signalisation qui engendre le recrutement de protéines impliquées dans la régulation de la polymérisation de F-actine, (c) la polymérisation d'actine sous la coupe phagocytaire qui permet l'internalisation de la particule par l'extension de pseudopodes et (d) l'élimination du revêtement d'actine à la surface du phagosome naissant, suivi de fissions et fusions à travers le système endo-lysosomal, engendrent un phagolysosome mature et compétent (Rupper et Cardelli, 2001).

À partir de cette description, il s'avère que la phagocytose chez *Dictyostelium*, malgré son utilisation à des fins nutritives, ressemble fortement à celle retrouvée chez les phagocytes professionnels (macrophages et neutrophiles) des vertébrés (Leippe, 1999). D'autant plus qu'il fut démontré que la phagocytose chez *Dictyostelium* nécessite le recrutement, sous la coupe phagocytaire, du

réticulum endoplasmique (Muller-Taubenberger et al., 2001); un mécanisme également identifié chez la souris (Gagnon et al., 2002).

Par ailleurs, des similitudes sont aussi présentes au niveau des mécanismes de polymérisation d'actine dans la formation du phagosome. Autant chez les amibes que chez les vertébrés, la régulation de la phagocytose s'effectue entre autre, par des membres de la famille des WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein); une famille impliquée dans la régulation de la polymérisation des filaments d'actine (Rupper et Cardelli, 2001). De plus, la phagocytose par l'entremise du récepteur Fc retrouvée chez les neutrophiles ainsi que les macrophages ressemble beaucoup à celui de *Dictyostelium*. Ce processus implique, pour ces deux modèles, des membres de la famille Rho (RhoA, Rac1 et Cdc42) et Ras (Rap1) (Caron et Hall, 1998; Massol et al., 1998; Seastone et al., 1999; Dumontier et al., 2000).

Cependant, une simple divergence est remarquée au niveau mécanistique de la phagocytose entre l'amibe *Dictyostelium* et les mammifères. En effet, l'implication de la PI 3-kinase et des récepteurs tyrosine kinase sont importants lors de la phagocytose chez les leucocytes (Ninomiya et al., 1994), sans être le cas chez *Dictyostelium* (Buczynski et al., 1997).

2.1 Les récepteurs impliqués lors de la phagocytose chez *Dictyostelium discoideum*

Jusqu'à présent, quelques récepteurs ont été démontrés pour être impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion des particules lors de la phagocytose. La protéine transmembranaire Phg1p semble impliquée dans la reconnaissance de différents ligands qui ne sont pas encore spécifiquement connus (Cornillon et al., 2000). Bien auparavant, Vogel et ses collègues proposèrent que deux systèmes de reconnaissance soient responsables de l'internalisation des particules chez *Dictyostelium*. La première classe de récepteurs de type lectine possède une forte affinité envers les portions terminales riches en glucose des lipopolysaccharides (LPS) bactériens, tandis que la seconde est classifiée comme étant non spécifique selon la variété de ses interactions hydrophobiques (Vogel et al., 1980).

2.2 La maturation du phagosome chez *Dictyostelium discoideum*

Lors de leur entrée dans la cellule sous forme de phagosomes précoces, les particules internalisées ne sont pas instantanément dégradées. La fonctionnalité dégradante du phagosome est acquise par une série de fusions et fissions à travers le système endo-lysosomal de la cellule phagocytaire. Pour se faire, des endosomes échangent partiellement au phagosome les mécanismes protéiques nécessaires à la dégradation. On considère alors le phagosome comme étant un organelle dont le protéome varie à travers le temps et qui « mature » selon un processus linéaire.

Chez *Dictyostelium*, c'est la GTPase Rab7 qui régule : l'internalisation des particules et fluides, la fusion endosomale, ainsi que les interactions entre le phagosome précoce et le système endosomal (Rupper et al., 2001a). De cette façon, le phagosome s'enrichi de protéases et d'enzymes lysosomales (cathepsine D, α -mannosidase, β -glucosidase, cystéine protéinase, etc.) afin de dégrader les divers composants internalisés (Souza et al., 1997; Clarke et al., 2002).

Cependant, Rab7 ne semble pas impliqué dans l'acidification du phagosome. L'acidification s'effectue par le recrutement des pompes à protons V-ATPase (Rupper et al., 2001b) et permet entre autre de dégrader les particules internalisées, en plus d'activer les enzymes hydrolytiques qui participent à ce processus de dégradation. Des études portant sur l'acidification démontrent que suite à 15 minutes d'internalisation de billes de latex, le phagosome atteint une acidité maximale de 5,0. Après 50 à 60 minutes de maturation, le contenant du phagosome se neutralise pour maintenir un pH de 6,0 (Rupper et al., 2001a). Ce changement de pH s'expliquerait par la dégradation de la particule, en plus du recyclage des pompes V-ATPase lors de la maturation (Clarke et al., 2002).

3. L' « englobissement » des cellules apoptotiques chez *Caenorhabditis elegans*

Chez les organismes pluricellulaires, la phagocytose est employée à des fins qui surpassent la simple fonction nutritive retrouvée chez *Dictyostelium*. Évidemment, la formation des tissus chez ces organismes est accompagnée d'un processus d'élimination des cellules endommagées ou non-désirées que l'on

appelle apoptose ou mort cellulaire programmée. Pour le nématode *Caenorhabditis elegans*, tout comme les autres métazoaires, ce processus d'apoptose s'effectue à travers quatre étapes distinctes : (a) la détermination de la mort cellulaire, (b) la mort cellulaire, (c) la reconnaissance et l'internalisation par phagocytose et (d) la dégradation de la cellule apoptotique à l'intérieur du phagocyte (Mangahas et Zhou, 2005).

Toutefois, il est important de savoir que l'élimination des corps apoptotiques ne s'effectue pas par phagocytose conventionnelle. En effet, l'engloutissement des corps apoptotiques qui sont composés d'antigènes du soi n'élicitent aucune réponse inflammatoire, ce qui n'est pas le cas lors de l'élimination des pathogènes par phagocytose (Aderem et Underhill, 1999). Ces cellules en mort programmée pourraient donc être éliminées par un mécanisme différent de la phagocytose. Le terme « engloutissement » fut alors proposé comme descriptif du processus d'élimination de ces cellules (Ellis et al., 1991).

En éliminant les cellules excédentaires ou dommageables à l'organisme, l'apoptose se veut nécessaire aux divers aspects du développement tissulaire et de l'homéostasie qui incluent : l'élimination des structures avec fonctions transitoires, le remodelage tissulaire et la morphogenèse, l'ajustement du nombre cellulaire et l'élimination des cellules endommagées ou immunitaires pouvant être néfastes à l'organisme.

Fort heureusement, la phagocytose des cellules apoptotiques s'effectue avant le relâchement dans le milieu extracellulaire des composés intracellulaires dommageables. De cette façon, l'organisme évite : les dommages tissulaires, l'inflammation, l'auto-immunité et facilite le remodelage tissulaire.

Chez *C. elegans* toutefois, les phagocytes professionnels impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques sont absents. Pour pallier à cette absence, ce sont les différentes cellules avoisinantes qui se chargent d'engloutir les cellules apoptotiques, par exemple : l'hypoderme, les muscles pharyngés et la gaine cellulaire des gonades (Reddien et Horvitz, 2004). Les récentes études portant sur l'engloutissement des corps apoptotiques chez *C. elegans*, ont permis d'identifier les mécanismes moléculaires qui contrôlent la reconnaissance, ainsi que l'élimination de ces cellules. Jusqu'à présent, ces mécanismes, en plus des voies de signalisation de la mort programmée, se sont avérés être conservés à travers les métazoaires.

3.1 Le mécanisme de l'engloutissement des cellules apoptotiques chez *Caenorhabditis elegans*

Hedgecock et ses collègues (Hedgecock et al., 1983) furent les premiers à identifier les sept mutations récessives qui limitent l'engloutissement des cellules apoptotiques. Ces mutations réparties en voies parallèles et redondantes sont définies comme étant les gènes *ced-1*, *ced-6*, *ced-7* et *ced-2*, *ced-5*, *ced-10*, *ced-12* (cell death abnormal).

ced-7 est un transporteur ABC impliqué dans la reconnaissance des corps apoptotiques en compagnie de *ced-1*, un récepteur « scavenger » (SREC), tandis que *ced-6*, un adaptateur, transmet le signal provenant du récepteur *ced-1*.

Le groupe *ced-2* (CrkII), *ced-5* (DOCK180), *ced-12* (ELMO1) et *ced-10* (Rac) a été proposé pour expliquer la voie de signalisation qui contrôle l'extension du cytosquelette sous la membrane plasmique lors de l'englobement des cellules apoptotiques (Fig.1) (Reddien et al., 2001).

Cependant, le récepteur primaire qui régule le groupe *ced-2*, *ced-5* et *ced-12* reste à identifier. Toutefois, le récepteur PSR-1 (récepteur de phosphatidylsérine) et des intégrines seraient des candidats potentiels (Albert et al., 2000; Wang et al., 2003). D'autant plus, qu'il est reconnu que l'enclenchement de la mort programmée engendre une translocation de phosphatidylsérine (PS) vers le côté extracellulaire de la membrane plasmique (Ren et Savill, 1998).

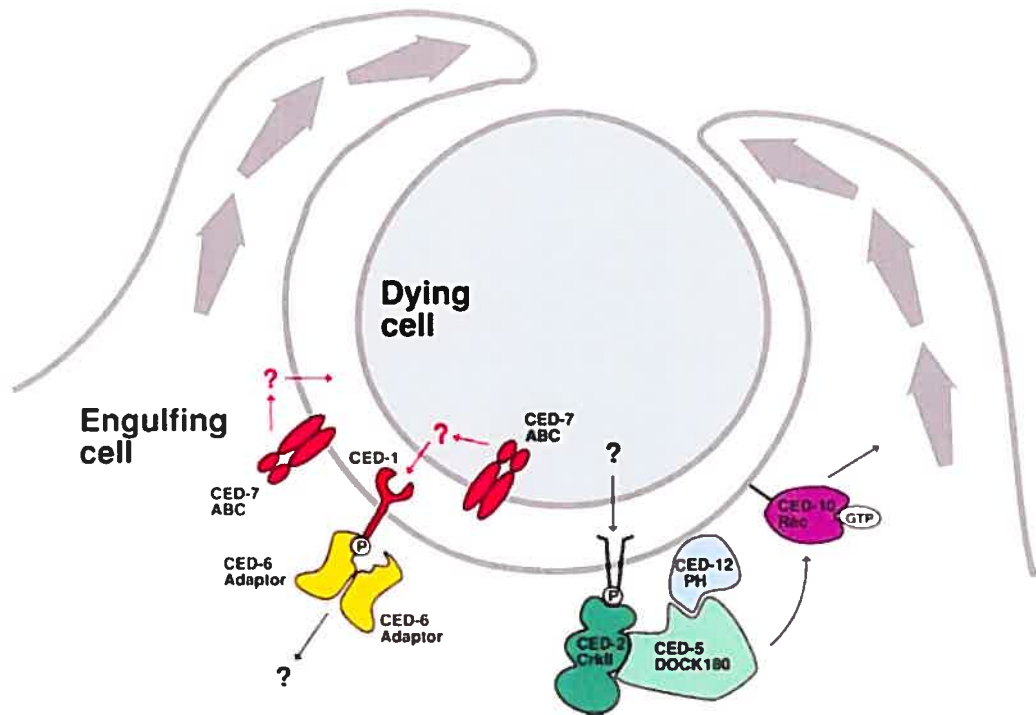


Fig. 1. Modèle moléculaire de l'englobement des cellules apoptotiques chez *C. elegans*. D'un côté, *Ced-1* reconnaît le signal indiquant l'état apoptotique de la cellule à phagocytée et se lie directement avec *ced-6*. *Ced-6* s'homodimérise et traduit le signal provenant de *ced-1* à une cible encore inconnue. De l'autre côté, un second récepteur inconnu se phosphoryle et active *ced-2*. *Ced-2* et *ced-12* se lient à *ced-5* près de la membrane plasmique et ce complexe facilite alors l'échange de GTP à *ced-10*. *Ced-10* peut alors engendrer une réorganisation du cytosquelette d'actines afin d'intérioriser la cellule apoptotique. Schéma tiré de Reddien et Horvitz (2004).

3.2 L'englobement promeut l'apoptose chez *Caenorhabditis elegans*

Bien que la phagocytose soit impliquée dans l'élimination des cellules apoptotiques, des évidences ont démontré qu'elle pouvait aussi promouvoir l'apoptose (Reddien et al., 2001; Marin-Teva et al., 2004). Les cellules en mort programmée précoce possèdent trois options : une progression rapide vers une apoptose complète, être englobées sans toutefois progresser vers la mort programmée ou effectuer un retour à un état cellulaire normal et survivre.

Cette dernière option fut observée chez *C. elegans* lors d'une activité réduite de la caspase ced-3 (Hoepfner et al., 2001). Malgré l'implication directe de ced-3 dans l'établissement primaire de la mort programmée, les cellules qui entrent en apoptose peuvent toujours revenir à un état cellulaire normal et éviter la mort. Ce retour serait donc dépendant du degré d'activation de la caspase 3 qui engendre les sous-programmes apoptotiques, tels que : la dégradation d'ADN, la réduction cellulaire et l'émission des marqueurs membranaires nécessaires à l'élimination des cellules apoptotiques. Cependant, un des facteurs pouvant limiter ce retour, serait l'engloutissement par les cellules adjacentes des cellules marquées. Une faible activité de la caspase ced-3 engendrerait suffisamment de marqueurs membranaires pouvant stimuler l'engloutissement, sans avoir préalablement déclancher le processus complet de la mort programmée. L'engloutissement par les cellules adjacentes activerait alors l'exécution à terme de l'apoptose (Mallat et al., 2005). Il s'avère alors que le processus d'engloutissement assure une dégradation ciblée des futures cellules apoptotiques, afin d'éviter les dommages tissulaires, l'inflammation et l'auto-immunité qui pourraient être encourus, suite à une mort programmée extracellulaire (Savill et al., 2002).

4. L'immunité innée versus l'immunité acquise chez les animaux

Les vertébrés luttent contre les organismes infectieux, par l'entremise de leur défense immunitaire qui comprend deux systèmes : l'immunité innée et

l'immunité acquise. L'immunité innée est utilisée comme première ligne de défense et repose sur des facteurs préencodés nécessaires à la reconnaissance et l'élimination rapide des microorganismes. D'autre part, l'immunité acquise produit par réarrangement somatique des récepteurs qui reconnaissent des antigènes spécifiques et qui engendre le développement d'une mémoire immunologique (Lavine et Strand, 2002).

Les insectes, quant à eux, ne possèdent qu'une immunité innée complexe et très efficace, sans toutefois posséder d'immunité adaptative, puisque aucune évidence ne démontre la présence d'une immunité adaptative analogue à celle retrouvée chez les mammifères. Aucun anticorps n'est produit, aucun réarrangement somatique des gènes n'a lieu, aucune mémoire immunologique n'est présente et de ce fait, le système de présentation antigénique par le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) est complètement absent (Vilmos et Kurucz, 1998). En fait, l'immunité adaptative n'apparaît seulement qu'à partir des Gnathostomes (poisson pourvu de mâchoire), un sous-groupe de métazoaires auquel tous les vertébrés sont catalogués (Irving et al., 2004; Desjardins, 2003).

4.1 La défense immunitaire chez *Drosophila melanogaster*

Chez la mouche à fruits *Drosophila melanogaster*, la défense immunitaire se manifeste selon trois mécanismes. Premièrement, la réponse humorale génère et libère dans l'hémolymphe des peptides antimicrobiens. Deuxièmement, il s'ensuit une réponse cellulaire par phagocytose ou encapsulation du pathogène et

troisièmement, la phénoloxydase permet le dépôt de mélanine qui est perçu comme un mécanisme de cicatrisation, par l'accumulation d'un pigment noir au niveau de la blessure et du pathogène (Hultmark, 2003).

Bref, il est possible de discerner que l'ensemble de cette réponse antimicrobienne s'effectue selon une forte relation entre l'immunité humorale et cellulaire. Pour se faire, la drosophile possède un système circulatoire dont le sang, appelé hémolymphe, qui circule dans l'espace extracellulaire "hemocoel", permet la distribution des médiateurs et des effecteurs, notamment les hémocytes et les peptides antimicrobiens. Lors d'une infection, la défense cellulaire s'exécute entre autre, par l'entremise de la forte activité phagocytaire des plasmatocytes qui patrouillent l'hémolymphe. Si l'infection persiste et devient systémique, la réponse humorale se manifeste par l'induction de synthèse de peptides antimicrobiens provenant de l'organe nommé "fat body" (l'équivalent du foie des mammifères).

4.2 La phagocytose chez *Drosophila melanogaster*

Par l'absence d'une immunité acquise, la drosophile s'est avérée comme étant le modèle par excellence pour étudier avec spécificité l'immunité innée. Bien qu'il fut possible d'effectuer d'énormes progrès dans la caractérisation de la réponse humorale, la réponse cellulaire demeure cependant peu connue chez *Drosophila melanogaster*. Évidemment, la phagocytose des microorganismes joue un rôle clé dans la défense immunitaire chez cette mouche à fruits. Il fut d'ailleurs

démontré que des larves dépourvues d'hémocytes deviennent clairement plus sensibles aux infections que la norme (Braun et al., 1998).

De plus, l'injection *in vivo* de billes de latex dans l'hémocoel de drosophile inhibe la phagocytose des hémocytes. Les billes de latex sont phagocytées par les hémocytes, mais des bactéries ajoutées après les billes de latex ne le sont pas. Ce faisant, cette inhibition de la phagocytose augmente de façon significative la susceptibilité aux infections de l'animal (Elrod-Erickson et al., 2000).

De façon primordiale, la phagocytose chez la drosophile participe aussi à l'élimination des cellules apoptotiques (Zhou et al., 2004). Croquemort, un membre de la famille des CD36, est un récepteur exprimé chez les hémocytes et qui fut démontré pour être impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques (Franc et al., 1996). Cependant, l'absence de Croquemort ne limite en rien la capacité phagocytaire des hémocytes envers différentes bactéries (Franc et al., 1999). Un autre récepteur, Draper, semble aussi impliqué dans la phagocytose des cellules en mort programmée (Manaka et al., 2004).

4.3 Les récepteurs impliqués dans la phagocytose chez *Drosophila melanogaster*

Pour être efficace, il est impératif que l'immunité innée puisse discerner entre un pathogène (non-soi) et ses propres cellules (soi), afin d'éviter d'endommager l'hôte. Janeway proposa que cette reconnaissance s'effectuait par l'entremise de

récepteurs (PRR ou « pattern recognition receptor ») qui reconnaissent des motifs hautement conservés et largement distribués chez le pathogène (PAMP ou « pathogen associated membrane pattern ») (Janeway, Jr., 1989).

À l'opposé des immunoglobulines (Igs), l'expression de ces PRR n'est pas induite en réponse à un pathogène spécifique, mais envers une large classe de pathogènes telles que les bactéries Gram négatif ou positif et/ou les levures (Franc et White, 2000).

Certains de ces récepteurs signalent la présence de pathogènes afin d'engendrer une réponse immunitaire ciblée (ex. : synthèse de peptides antimicrobiens), tandis que d'autres agissent à titre de récepteurs impliqués dans l'élimination par phagocytose ou endocytose de pathogènes.

En utilisant la technique d'interférence par ARN, le groupe d'Ezekowitz a pour sa part ciblé un groupe de 34 gènes directement impliqués dans la phagocytose. Ceux-ci comprennent des protéines qui participent au développement des hémocytes, au transport vésiculaire, à la régulation de l'actine, en plus d'un récepteur transmembranaire (Ramet et al., 2002). Ce récepteur que l'on nomme Peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) est impliqué dans la phagocytose des bactéries Gram négatif, sans cependant reconnaître les bactéries Gram positif ; de plus, il active en amont la voie de signalisation de l'*imd* qui, une fois activée, engendre la phosphorylation et le clivage du facteur de transcription

Relish, un membre de la famille des NF- κ B (Brennan et Anderson, 2004). En se translocant au noyau, Relish active alors plusieurs gènes dont celui du peptide antimicrobien diptéricine ; un effecteur agissant contre les bactéries Gram négatif, voir Fig.2. En plus de PGRP-LC, il y a aussi le récepteur « scavenger » dSR-CI, tout comme le récepteur scavenger de classe A des mammifères (Pearson et al., 1995) qui sont reconnus pour leur affinité assez large envers les ligands polyanioniques. Cette caractéristique lui permet donc de reconnaître autant les bactéries Gram positif et négatif. Il fut d'ailleurs démontré que ce récepteur est un PRR qui participe de 20 à 30 % à l'activité globale de la reconnaissance bactérienne des hémocytes (Ramet et al., 2001).

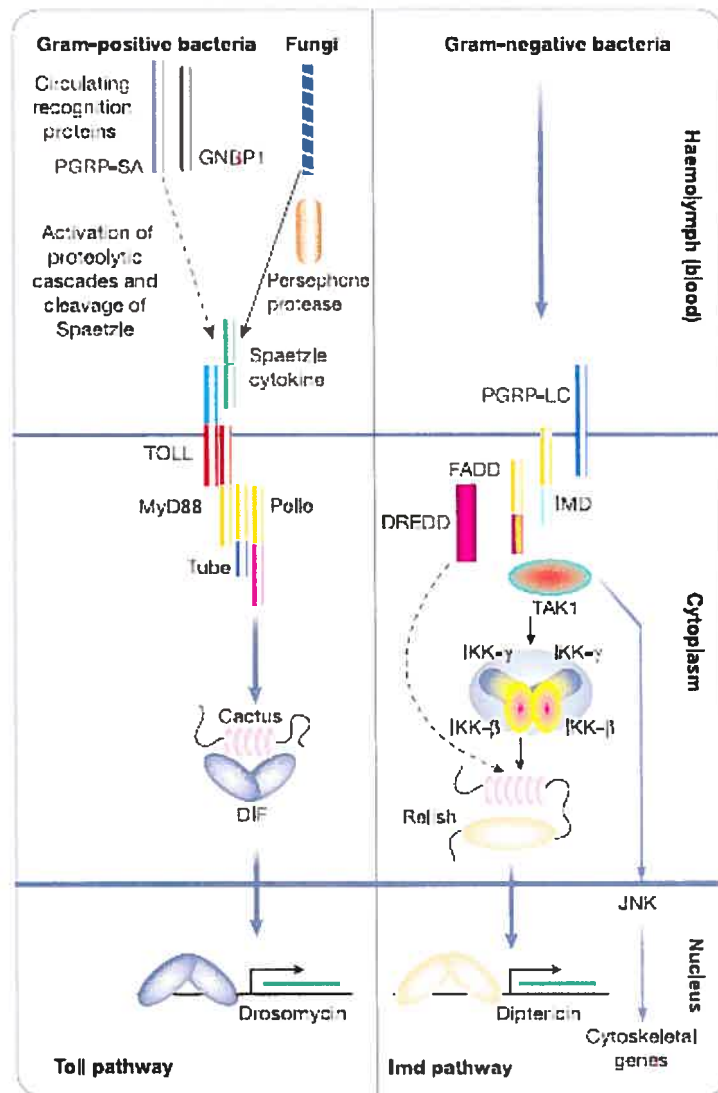


Fig. 2. Voies de signalisations de Toll et *Imd* (*immune deficiency*) dans le contrôle de l'expression de peptides antimicrobiens. Les domaines de mort sont en jaune et les domaines TIR sont rouges. Pour la voie de l'Imd, il est possible d'observer le récepteur PGRP-LC qui active cette voie de signalisation et qui se termine par la translocation de Relish au noyau pour activer la synthèse du peptide antimicrobien diptéricine. Schéma tiré de Hoffmann (2003).

5. La phagocytose à travers l'immunité adaptative des mammifères

Les mammifères possèdent le système immunitaire le plus évolué des animaux et leur immunité se divise en deux branches : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Malgré la présence de ce nouveau type d'immunité, le processus de la phagocytose est tout aussi impliqué dans l'internalisation et la dégradation des pathogènes qu'au niveau de l'engloutissement des cellules apoptotiques.

Toutefois, les phagocytes professionnels, tels que les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques, présentent une variété beaucoup plus large de récepteurs (Aderem et Underhill, 1999; Stuart et Ezekowitz, 2005). Ces récepteurs sont évidemment couplés à des voies de signalisation distinctes, qui suite à leur activation, enclenchent aussi un réarrangement dynamique du cytosquelette et d'un remodelage de membranes à la surface cellulaire. Cela a pour effet, de permettre l'extension des pseudopodes, d'internaliser le pathogène et d'entamer sa dégradation, suite à la formation d'un phagosome et de sa maturation à travers la voie endo-lysosomale.

Cependant, le rôle de la phagocytose à l'intérieur de l'immunité des mammifères ne se limite pas qu'à la nutrition ou la dégradation de particules, car il s'avère beaucoup plus fonctionnel. En effet, la capacité primaire de dégrader les parasites par l'entremise de l'acidité et des enzymes hydrolytiques du phagosome,

est mise à la contribution de l'immunité adaptative qui utilise les divers fragments du parasite générés au profit de la machinerie de présentation antigénique et ce, pour les deux types de CMH.

Par conséquent, la phagocytose n'est plus un simple mécanisme majeur de l'immunité innée, mais un processus clé reliant l'immunité adaptative à l'immunité innée chez les mammifères. C'est donc par sa participation au niveau de la présentation antigénique que le phagosome des vertébrés se distingue de celui des invertébrés.

5.1 L'implication du réticulum endoplasmique dans la phagocytose

Metchnikoff proposa un modèle simple dans lequel la phagocytose s'effectuerait à partir d'une extension de la membrane plasmique autour d'une particule, pour ainsi former la membrane d'un tout nouveau phagosome. Toutefois, des évidences ont démontré que certains phagocytes possèdent un appétit si grand qu'ils peuvent phagocyter des particules aussi volumineuses que leur propre taille (Cannon et Swanson, 1992).

De ce fait, il semble contradictoire que ces phagocytes puissent utiliser l'ensemble de leur membrane plasmique dans la formation de phagosomes naissants. Néanmoins, il fut proposé qu'un renouvellement rapide de la membrane plasmique s'effectuerait à partir d'une source endomembranaire, et que cette

source proviendrait d'une exocytose focale d'endosomes de recyclage près du site de phagocytose (Hackam et al., 1998).

En parallèle, Garin et ses collègues utilisèrent la technique du gel 2D couplée à la spectrométrie de masse, afin d'identifier les protéines impliquées lors de la phagocytose de billes de latex et d'établir les différentes fonctions pouvant être associées au phagosome (Garin et al., 2001). Contre toute attente, cette étude révéla, entre autre, la forte présence de protéines provenant du réticulum endoplasmique dont les chaperones Calnexine et calréticuline (voir figure 3).

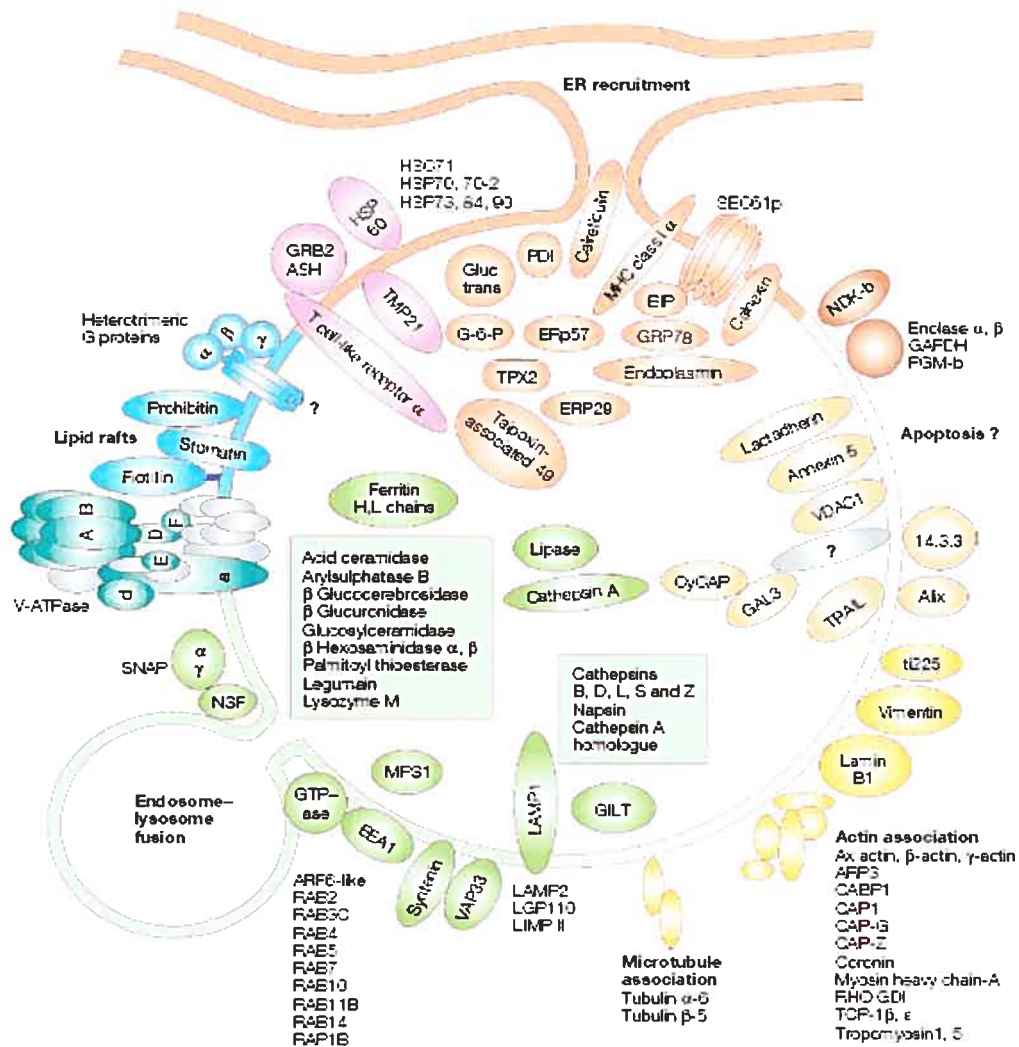


Fig. 3. Phagosome virtuel reconstitué à partir des protéines identifiées par protéomique (Desjardins, 2003). Les couleurs représentent les différentes fonctions associées au phagosome. ARF6, ADP ribosylation factor; ARP, actin-related protein homologue; CABP1, calcium-binding protein; CAP1, adenylyl cyclase-associated protein; EEA, early endosome antigen; ER, endoplasmic reticulum; Erp, Protein disulfide isomerase precursor; G6P, glucose-6-phosphatase; GAL3, galactoside-binding lectin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GDI, GDP dissociation inhibitor; GILT, γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase; GRB2 ASH, growth-factor receptor-bound protein 2; GRP78, glucose-regulated protein 78 kDa; HSC71, heat-shock cognate protein 71 kDa; HSP, heat-shock protein; LAMP, lysosome-associated membrane protein; LGP110, lysosomal membrane glycoprotein 110 kDa; LIMP, lysosomal integral-membrane protein; MPS, macrophage-specific protein; NDK, nucleoside diphosphate kinase; NSF, N-ethylmaleimide-sensitive factor; PDI, protein-disulphide isomerase; PGM, phosphoglucomutase; RAB, ras-related GTP-binding

protein; SNAP, soluble NSF-attachment proteins; TCP, T-complex locus; TMP21, transmembrane trafficking protein 21 kDa; TPX2, targeting protein for XKLP2 (*Xenopus* kinesin-like protein 2); TRAIL, tumour-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; VAP33, VAMP-associated protein; V-ATPase, vacuolar ATP synthase; VDAC, voltagedependent anion-selective channel protein. Schéma tiré de Desjardins (2003).

À partir de ces données, le groupe de Desjardins démontra que le réticulum endoplasmique est recruté sous la coupe phagocytaire lors de la formation d'un phagosome naissant et qu'ainsi, le réticulum endoplasmique participe à la phagocytose en tant que seconde source endomembranaire (voir figure 4) (Gagnon et al., 2002). De plus, il fut récemment démontré que la SNARE du réticulum endoplasmique ERS24/Sec22b est directement impliquée dans la fusion du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique, lors de la phagocytose de particules de plus de $0,8\mu\text{m}$ (Becker et al., 2005).

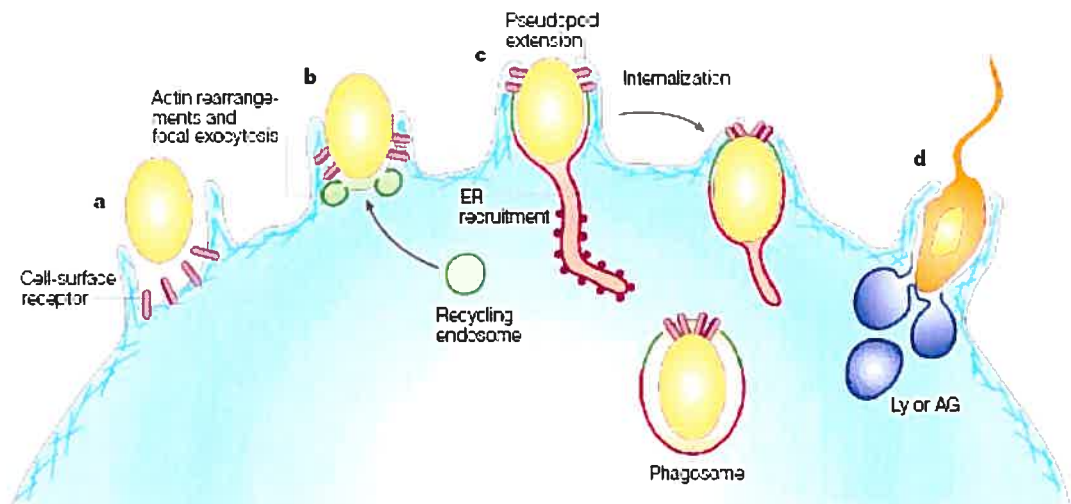


Fig. 4. Modèle membranaire de la phagocytose. Deux sources de membranes seraient impliquées dans la formation d'un nouveau phagosome: les endosomes de recyclage et le réticulum endoplasmique. Schéma tiré de Desjardins (2003).

5.2 La phagocytose et la présentation-croisée chez les mammifères

Le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace envers les différents agents infectieux nécessite l'apprêtement de leurs antigènes et leurs présentations à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA), tels que les cellules dendritiques et les macrophages (Guermontprez et al., 2002). Pour les pathogènes extracellulaires, les antigènes sont générés suite à leur dégradation par l'entremise des enzymes hydrolytiques du phagosome. Ces antigènes sont ensuite assemblés et montés sur les CMH de classe II provenant de la voie endo-lysosomale pour être présentés aux cellules T CD4⁺.

À l'opposé, les antigènes provenant de pathogènes intracellulaires sont dégradés à l'aide du protéasome cytoplasmique, apprêtés sur les CMH de classe I du réticulum endoplasmique et finalement présentés aux cellules T CD8⁺. Sachant que le phagosome est constitué en partie de membrane provenant du réticulum endoplasmique, Houde et ses collègues ont démontré que le phagosome est une organelle apte à la présentation-croisée (Houde et al., 2003).

Ce modèle vient simplifier le modèle de présentation-croisée pré-établi en proposant que le phagosome possède l'ensemble des capacités moléculaires nécessaires au transport par rétrotranslocation (Sec61), à la dégradation par le protéasome (ubiquitination et immuno-protéasome) et à la translocation (via le complexe TAP), afin d'apprêter et présenter des antigènes sur les CMH de classe I (voir figure 5).

Cette nouvelle fonction attribuée au phagosome situe le processus de la phagocytose dans une position beaucoup plus fondamentale au niveau de la réponse immune chez les mammifères. De ce fait, la phagocytose serait un point majeur à reconsidérer dans le développement de futurs traitements, majoritairement au niveau de la sollicitation d'une présentation antigénique supérieure, puisqu'il fut montré que cette présentation-croisée par la phagocytose de billes de latex s'avère 10 000 fois plus efficace qu'une présentation sans phagocytose (Kovacsovic-Bankowski et al., 1993).

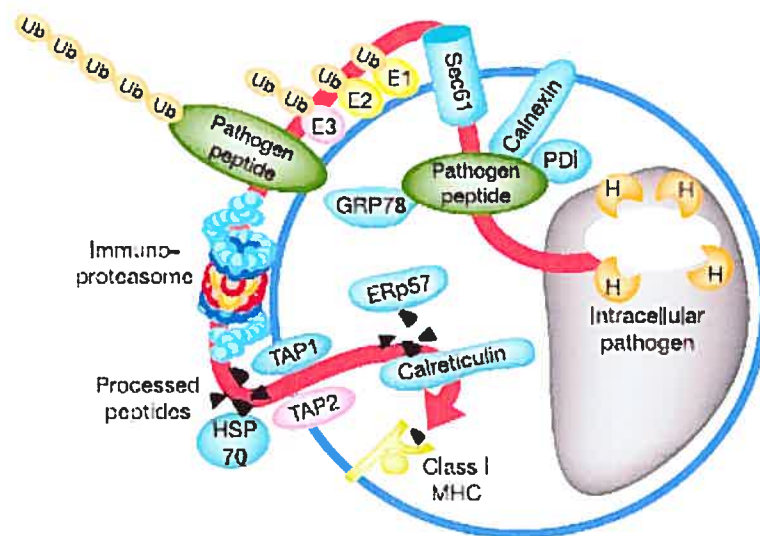


Fig. 5. Modèle de la présentation-croisée au niveau du phagosome. Le pathogène est d'abord dégradé par les enzymes hydrolytiques, ce qui génère des antigènes peptidiques pouvant être transportés vers le cytoplasme par le translocon Sec61. Les peptides sont ensuite ubiquitinés et dégradés par l'immuno-protéasome. Les antigènes provenant de l'immuno-protéasome sont ensuite retransportés dans le phagosomes pour être apprêtés et présentés sur les CMH de classe I. E, ubiquitin-activating enzyme; ERp57, Protein disulfide isomerase A3 precursor; GRP78, glucose-regulated protein 78 kDa; H, hydrolases; HSP, heat-shock protein; MHC, complexe majeur d'histocompatibilité; PDI, protein-disulphide isomerase; Sec61,

translocon; TAP, Antigen peptide transporter; Ub, ubiquitin. Schéma tiré de Houde et al. (2003).

5.3 La protéomique dans l'étude de la phagocytose

L'application de la protéomique de haut débit à l'étude de la phagocytose, a constitué une avancée majeure dans notre compréhension de la maturation du phagosome. Plus précisément, elle s'est avérée fortement inspirante dans le développement d'hypothèses fonctionnelles et novatrices à propos de la phagocytose. Certaines de ces hypothèses ont été validées par des essais de biochimie et biologie cellulaire. Par exemple, à partir d'identification protéiques préliminaires de spectrométrie de masse, il a été démontré que le réticulum endoplasmique est recruté lors de la formation de phagosomes naissants (Gagnon et al., 2002).

C'est d'ailleurs par l'entremise de l'implication du réticulum endoplasmique dans la formation de phagosome naissant, qu'il fut montré que la phagocytose participe intimement, par la présentation-croisée, à la réponse immunitaire adaptative et ce, à partir des deux types de présentation antigénique, soit les CMH de classe I et II (Houde et al., 2003).

Dans une perspective évolutive, il est nécessaire de visualiser la phagocytose comme un mécanisme primitif nutritionnel auquel s'est ajouté, à travers l'évolution, des mécanismes lui permettant entre autre d'interagir conjointement avec la machinerie de présentation antigénique. Le protéome

nécessaire à la fonctionnalité primitive de dégradation du phagosome retrouvé chez *Dictyostelium discoideum*, demeure sensiblement le même à travers l'échelle évolutive des espèces animales et constitue ce que l'on identifie comme étant le « bloc primitif fixe » de la phagocytose.

Cependant, le protéome qui a trait aux fonctionnalités plus évoluées du phagosome, s'avère beaucoup plus complexe et chaque nouvelle fonction rencontrée est visualisée comme un bloc supplémentaire venant s'ajouter au « bloc primitif fixe ». Il devient alors impératif d'identifier et qualifier ces nouveaux blocs fonctionnels à travers l'échelle évolutive, afin d'établir les différentes fonctions associées au phagosome. Pour se faire, il sera nécessaire d'identifier le « bloc primitif fixe » chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, pour ensuite le soustraire aux différents protéomes des espèces plus évoluées telles que la mouche à fruits *Drosophila melanogaster* et la souris *Mus musculus*.

Dans ce travail, la mouche à fruits *Drosophila melanogaster* fait l'objet d'une étude biochimique, protéomique et bioinformatique approfondie ayant pour but de qualifier le protéome du phagosome de cette espèce. Les résultats obtenus permettront d'identifier quelles est la nature des machines moléculaires retrouvées sur cet organelle. De plus, il nous sera possible de déterminer si certains des groupes de protéines retrouvés au niveau du phagosome de la drosophile sont unique à cette espèce ou aussi retrouvés sur les phagosomes de mammifères. La suite de ces travaux se traduira par une étude évolutive comparative comprenant

l'amibe *Dictyostelium discoïdum*, la mouche à fruits *Drosophila melanogaster* et la souris *Mus musculus*. Cette étude subséquente, nous permettra de différencier et d'identifier les protéines du phagosome uniques à l'immunité adaptative et à l'immunité innée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire non-adhérente S2 est dérivée d'une culture primaire tardive (20 à 24 heures) d'embryons de *Drosophila melanogaster*. Cette lignée fut donnée gracieusement par le Dr. Alan R. Ezekowitz (Laboratory of Developmental Immunology, Department of Pediatrics, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts). Les cellules S2 ont été cultivées dans du milieu Schneider (Sigma) avec 10% de FBS inactivé à la chaleur et 1% de pénicilline et streptomycine. Dans des flacons sans aération, les cellules étaient cultivées à 25°C sans CO₂ dans des flacons de 225 cm². Après cinq jours de cultures ou lorsque les cellules atteignaient une confluence de 8 X 10⁶ cellules/ml, celles-ci étaient repiquées afin d'atteindre une concentration cellulaire d'environ 2 X 10⁶ cellules/ml.

2. Isolation de phagosomes des cellules S2

La technique d'isolation de phagosome repose principalement sur la densité plus faible du latex qu'une solution de sucrose (sucrose (p/p) + 3,0 mM Imidazole) de plus de 10 %. Il est donc possible de faire phagocyter des billes de latex à des phagocytes, de briser ces cellules et d'isoler les phagosomes avec une grande pureté des autres constituants cellulaire par centrifugation sur gradient de sucrose.

Pour se faire, des cellules S2 à confluences étaient centrifugés à 1500 rpm (rotor GH 3.8 Beckman) pendant cinq minutes. Les surnageants étaient éliminés et les culots de cellules étaient resuspendus avec du milieu Schneider frais. Pour débiter le « pulse », des billes de latex estapor microsphere 0,8 μm (dilution 1 :100) étaient ajoutées dans le milieu de culture. Les cellules étaient ensuite incubées à 25°C sans CO₂ avec une légère agitation pendant le temps désiré (temps de « pulse ») puis déposées sur glace pour stopper la phagocytose et la maturation des phagosomes. Pour éliminer les billes de latex non-phagocytées, les cellules étaient lavées trois fois avec du PBS 1X froid pour drosophile (NaCl 52 mM, KCl 40 mM, D-glucose 10 mM, sucrose 100 mM, MgSO₄ 1,2 mM, MgCl₂ 1,2 mM, CaCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 2 mM et KH₂PO₄ 0.37 mM, pH 6,7) avec des centrifugations à 1500 rpm (rotor GH 3.8 Beckman) pendant cinq minutes à 4°C. Si un temps de « chase » était envisagé, les cellules étaient resuspendues dans du milieu Schneider frais et réincubées avec une légère agitation à 25°C sans CO₂ selon le temps de « chase » prévu. Sinon, les cellules étaient exposées à un tampon de lyse hypotonique froid (10mM Hepes pH 7,0, 2 mM MgCl₂, 6 mM β -mercaptoéthanol et inhibiteur de protéase (complete 1X - Roche)) pendant deux minutes puis lysées avec une seringue 22 G1/2 tout en s'assurant que les noyaux colorés au bleu de toluidine restent intacts lorsque observés au microscope optique. L'homogénat résultant était soumis à une centrifugation de 2000 rpm pendant cinq minutes à 4°C pour obtenir le PNS (« post nuclear supernatant »). Le PNS était mélangé à une solution de sucrose 62 % avec inhibiteur de protéase (complete 1X) afin d'obtenir un mélange de 40 % puis déposé sur un coussin de sucrose 62 % dans un

tube d'ultra-centrifugeuse SW-41 en polypropylène. Le gradient était ensuite complété en ajoutant consécutivement par-dessus le sucrose 40 % : le sucrose 35 %, le sucrose 25 % et le sucrose 10 %. Les tubes étaient ensuite équilibrés avec du sucrose 10 % avant d'être centrifugés à 24 000 rpm (rotor SW-41 Ti Beckman) pendant une heure à 4°C. Les phagosomes étaient alors récupérés à l'interface des sucres 10 et 25 %, transférés dans un autre tube d'ultra-centrifugeuse SW-41, puis les tubes étaient complétés avec du PBS 1X froid pour drosophile. Une seconde centrifugation de 15 000 rpm (rotor SW-41 Ti Beckman) était effectuée pendant 15 minutes à 4°C. Par la suite, le surnageant était éliminé et le culot resuspendu avec du tampon Laemmli 1X. Les protéines solubilisées dans le Laemmli 1X étaient ensuite dosées par la méthode EZQ (voir méthode point 6).

3. Vérification par microscopie électronique de la pureté des phagosomes isolés

3.1 Phagocytose

Méthode identique à celle du point 2, mais avec quelques modifications. Des cellules n'ayant pas phagocytées ont été resuspendues dans une solution 1:1 de tampon de lyse et de cacodylate 0,2 M, puis conservées à 4°C. Les phagosomes isolés ont aussi été récupérés dans une solution 1:1 de tampon de lyse et de cacodylate 0,2 M et conservés à 4°C.

3.2 Fixation des échantillons

Les échantillons étaient tous centrifugés cinq minutes à 15 000 rpm à 4°C. Les surnageants furent éliminés et les culots ont été lavés deux fois avec une solution tampon de cacodylate 0,1M avec des centrifugations de 1500 rpm (rotor GH 3.8 Beckman) pendant 5 minutes à 4°C. Les culots respectifs étaient ensuite fixés avec une solution de glutaraldéhyde 2,5 %, 0,1M cacodylate pendant la nuit à 4°C.

3.3 Osmification et imprégnation des membranes à l'acétate d'uranyl

Par la suite, les culots étaient osmifiés avec une solution d'osmium OsO_4 1 %, cyanure férrique de potassium 1,5% et cacodylate 0,1M pendant 1 heure à 4°C, puis lavés trois minutes dans du cacodylate 0,1M et trois fois cinq minutes avec une solution de Maléate-NaOH 0,05M pH 6,0 à 4°C. Les membranes des échantillons furent ensuite imprégnées d'acétate d'uranyl 2%, maléate 0,125M pendant une heure à 4°C.

3.4 Déshydratation et enrobage dans l'épon

S'ensuivait trois lavage au Maléate-NaOH 0,05M pH 6,0 pendant 10 minutes à 4°C et d'une déshydratation en série en exposant 10 minutes à de l'éthanol 70%, 10 minutes à de l'éthanol 90 % et trois fois 10 minutes à de l'éthanol 100%. Enfin, les échantillons étaient enrobés dans de l'épon pour qu'ils soient ensuite découpés et observés au microscope électronique.

4. Préparation d'un lysat cellulaire total (TCL)

Des cellules S2 à confluence était centrifugé à 1500 rpm (rotor GH 3.8 Beckman) pendant 5 minutes à 4°C. Le culot de cellules était resuspendu avec 1 ml de tampon de lyse hypotonique (10mM Hepes pH 7,0, 2 mM MgCl₂, 6 mM β-mercaptoéthanol et inhibiteur de protéase (complete 1X)) froid et incubé deux minutes pour laisser turgescer les cellules. Les cellules étaient ensuite brisées avec une seringue 22 G1/2 en vérifiant au microscope optique. Un volume de Laemmli 2X était ajouté à un volume de lysat cellulaire pour obtenir un TCL brut. Enfin, le lysat brut était soniqué (Sonifier 450), afin de dégrader l'ADN.

5. Préparation de membrane totale (TM)

Des cellules S2 à confluence était centrifugés (rotor GH 3.8 Beckman) à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules étaient ensuite lavées trois fois avec du PBS 1X pour drosophile avec des centrifugations à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les culots étaient resuspendus avec un tampon de lyse hypotonique, puis les cellules étaient brisées avec une seringue 22 G1/2. Le lysat cellulaire était ensuite centrifugé à 2000 rpm (rotor GH 3.8 Beckman) pendant 5 minutes à 4°C et le surnageant était combiné à une solution de sucrose HB (homogenisation buffer - sucrose 8,5 %) (p/p). L'échantillon était ensuite déposé sur un coussin de sucrose 62 % dans un tube en propylène d'ultra-centrifugeuse. Les tubes étaient équilibrés avec la solution de sucrose HB puis centrifugés à 34

000 rpm (rotor SW-60 Ti Beckman) pendant une heure à 4°C. Un coussin de membrane était ensuite prélevée et complétée avec du sucrose HB et d'inhibiteur de protéase (complete 1X) puis une seconde centrifugation était effectuée à 3 400 rpm (rotor SW-60 Ti Beckman) pendant une heure à 4°C. Une fraction était encore prélevée puis un volume de Laemmli 2X égal à la quantité prélevée de bande blanche était ajouté.

6. Dosage protéique par la méthode EZQ (Invitrogen)

6.1 Préparation de la courbe standard, du TCL et des échantillons

La courbe standard fut établit en diluant avec du Laemmli 1X une solution de 10 µg/µl d'ovalbumine (composant d) recomposé à partir de Laemmli 1X de façon à obtenir les concentrations : 5 µg/µl, 2,5 ug/l, 1 ug/µl, 0,5 µg/µl et 0,1 µg/µl. Quant aux échantillons, ceux-ci étaient chauffés à 95°C pendant cinq minutes avant d'être centrifugé trois minutes à 15 000 rpm pour culotter les billes de latex. Les échantillons étaient ensuite dilués 1:2 avec du Laemmli 1X. Le TCL était aussi chauffé à 95°C puis dilué 1:4 et 1:2 avec du Laemmli 1X.

6.2 Préparation du papier d'essai et dosage

Les standards moléculaires (5 µg/µl, 2,5 ug/l, 1 ug/µl, 0,5 µg/µl et 0,1 µg/µl), les TCL (1 : 2 et 1 : 4) et les échantillons (1 : 1 et 1 : 2) étaient appliqués à raison de 1 µl par puit en triplicata sur le papier à essai à l'aide d'une plaque de 96 puits adaptée. Le papier était ensuite séché et agité avec 20 ml de méthanol

pendant cinq minutes à T° pièce afin d'éliminer l'urée, le SDS, les sels, les agents réducteurs et les colorants pouvant être présents. Le papier était séché puis les protéines étaient colorées avec le composant A et agitées pendant 30 minutes à T° pièce. Après la coloration, le papier était lavé trois fois par agitation pendant une minute avec du tampon de lavage (10 % méthanol et 7 % acide acétique) puis séché. À partir de la courbe des standards moléculaires, la concentration protéique des échantillons étaient déterminée par une mesure multiple point par point de la fluorescence (418 nm d'excitation et 650 nm d'émission) à l'aide d'un spectrofluoromètre (SpectraMax Gemini EM). Les données étaient ensuite prises en charge par le logiciel SoftMax Pro 4.8, afin de déterminer les concentrations des échantillons à partir de la courbe standard.

7. Immunobuvardage rapide de type Western (Millipore)

Lors des protocoles d'immunobuvardage conventionnels, le blocage de la membrane est effectué, afin de prévenir la liaison non-spécifique des anticorps à la membrane. Cette étape de blocage peut durer d'une heure allant jusqu'à une nuit entière en utilisant un agent bloquant tel que : la BSA, le lait en poudre, du sérum pré-immun et des détergents non-ioniques. Dans le cas de la méthode d'immunobuvardage rapide, l'étape de blocage est éliminée. Cette méthode exploite la capacité hydrophobe des membranes de transfert de PVDF (Polyvinylidene fluoride). Lorsque la membrane de PVDF est rincée au méthanol 100 %, celle-ci est déshydratée et c'est à ce moment que l'anticorps primaire peut

être exposé instantanément, sans blocage préalable, aux protéines transférées sur la membrane de PVDF. Les protéines liées à la membrane interagissent donc avec l'anticorps, mais les zones de la membrane qui sont dépourvues de protéines restent dans un état hydrophobe. L'hydrophobicité de la membrane empêche la solution aqueuse contenant l'anticorps de se lier non-spécifiquement à la membrane. De ce fait, il n'est donc plus nécessaire de bloquer la membrane et les temps de lavage sont grandement diminués. Bref, cette méthode permet d'économiser beaucoup de temps de manipulation.

7.1 Électrophorèse sur gel pré-coulé NuPAGE 12% bis-tris 1mm

Les échantillons étaient centrifugés à 15 000 rpm pendant trois minutes pour culotter les billes de latex. 10 µg d'échantillon et de TCL était chargé sur le gel pré-coulé NuPAGE 12% bis-tris 1mm. Le tampon d'électrophorèse (MES 1X) était ensuite ajouté, puis un courant de 185 V constant fut appliqué pendant environ une heure à T° pièce.

7.2 Transfert sur membrane de PVDF

Après l'électrophorèse, les protéines furent transférées sur une membrane de PVDF ayant des pores de 0,2 µm et pré-activée au méthanol 100%. Le tampon de transfert (tampon de transfert 1X d'Invitrogen) était ajouté à la sandwich puis un courant de 250 mA constant fut appliqué pendant 90 minutes à T° pièce.

7.3 Hybridation des protéines avec les anticorps

Suite au transfert, les membranes de PVDF étaient lavées avec du méthanol 100% pendant 30 secondes afin de resserrer les pores de la membrane du PVDF, puis séchées à l'aire libre. Sans être bloquées dans une solution de lait, les membranes furent exposées à leur anticorps primaire préparé dans une solution diluante d'anticorps (1% (p/v) lait en poudre écrémé et 0,04% (v/v) Tween 20) avec agitation pendant une heure à T° pièce. Les membranes étaient ensuite lavées trois fois avec du PBS 1X pendant 5 minutes et exposé avec agitation pendant 30 minutes à T° pièce à l'anticorps secondaire 1:3000 (dirigé contre le type d'anticorps primaire) préparé aussi avec la solution diluante d'anticorps. Les anticorps secondaires étaient couplés à la peroxydase de raifort (horse radish peroxydase : HRP). Suite à l'incubation avec l'anticorps secondaire, les membranes étaient lavées trois fois avec du PBS 1X pendant 5 minutes avec agitation. Pour engendrer un signal de la HRP, la membrane était exposée à une solution d'ECL pendant une minute à T° pièce. Ce signal photonique impressionne un film qui était ensuite développé pour visualiser les bandes spécifiques à l'anticorps primaire exposé.

7.4 Anticorps utilisés

A) Calnexine

- Anti-Calnexine de drosophile fait chez le lapin (polyclonal IgG) par le réseau de protéomique de Montréal (RPMPN) #3750. 1:100 pour

l'immunobuvardage.

B) Lamine Dm0

- Anti-Lamine Dm0 de drosophile fait chez la souris (monoclonal IgG₁) par le Developmental studies hybridoma bank (DSHB) à l'université de l'Iowa. 1:1000 pour l'immunobuvardage.

C) Rab5

- Anti-Rab5 de drosophile fait chez le lapin (polyclonal IgG) par le réseau de protéomique de Montréal (RPMPN) #3748. 1:100 pour l'immunobuvardage.

D) Rab7

- Anti-Rab7 (H-50) d'humain fait chez le lapin (polyclonal IgG) par Santa Cruz biotechnology # SC-10767, lot # D171. 1:500 pour l'immunobuvardage.

E) rSec8

- Anti-rSec8 de rat produit chez la souris (monoclonal IgG₁) par Stressgen # VAM-SV016, lot # B412410, 1:500 pour immunobuvardage.

F) Sec22p

- Anti-Sec22p de levure fait chez le lapin (polyclonal) donné par Dr. Randy Schekman (Université de Californie, Californie, États-Unis). 1:1000 pour

l'immunobuvardage.

8. Préparation d'un gel pour l'analyse protéomique par spectrométrie de masse

Les gels envoyés en spectrométrie de masse sont généralement colorés à l'argent ou au bleu de Coomassie. Cependant, la coloration des protéines (argent ou Coomassie) peu affecter la qualité de l'analyse de la spectrométrie de masse. Pour maximiser l'analyse, les protéines ne furent pas colorées. Trois préparations de phagosomes au même temps de « pulse » et « chasse » (60'/0') ont été analysées par spectrométrie de masse, afin de maximiser la cartographie du protéome du phagosome de la drosophile.

8.1 Électrophorèse sur gel pré-coulé Nu-PAGE 12% bis-tris 1mm

Un échantillon de phagosome fut centrifugé à 15 000 rpm pendant 3 minutes afin de culotter les billes de latex. 50 µg de cet échantillon a été chargé sur un gel pré-coulé Nu-PAGE 12% bis-tris 1mm et une solution tampon de MES 1X fut ajoutée avant l'application d'un courant de 185 V constant à T° pièce. L'électrophorèse fut arrêtée lorsque le front de migration eut atteint 5 cm.

8.2 Découpage des bandes

Lorsque l'électrophorèse fut terminée, la piste de migration de l'échantillon sur le gel était découpée avec un scalpel lavé à l'éthanol en bandes de 1 mm et chaque bande était redécoupée en petits cubes. Chaque petit cube d'une même

bande était déposé dans un puit d'une plaque 96 puits contenant une solution d'acide acétique 1% et la plaque était ensuite conservée à 4°C avant d'être envoyée en spectrométrie de masse au réseau de protéomique de Montréal (RPMPN).

8.3 Digestion des bandes à la trypsine

Les gels non-colorés contenus dans des plaques 96 puits furent exposés 30 minutes à une solution de dithiothreitol 10 mM pour réduire les résidus cystinyl et 20 minutes à une solution d'iodoacétamide 55 mM pour effectuer l'alkylation. Après deux lavages à l'acétonitrile et $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, les bandes étaient extraites et séchées avec de l'acétonitrile à 37°C. Les bandes étaient ensuite digérées avec de la trypsine (6 ng/ μl dans 50 mM $[\text{NH}_4]_2\text{CO}_3$) pendant cinq heures à 37°C et les peptides étaient premièrement extraits avec une solution d'acide formique 1% / acétonitrile 2%, suivi de deux extractions à l'acétonitrile. Tous les traitements furent effectués par robotique avec l'utilisation de la plate-forme MassPrep (MicroMass).

8.4 Analyse par spectrométrie de masse Micro-qTOF (Waters Micromass)

Avant l'analyse, les plaques 96 puits étaient conservées dans un échantillonneur de plaque à puits (Agilent 1100 Series). Avant l'injection, la précolonne (Zorbax 300SB-C18, 5 mm X 0.3, 5 μm) installée sur une valve Rheodyne à 6 ports était conditionnée avec de l'eau contenant de l'acétonitrile 5 % et de l'acide formique 0,1 %. Ce conditionnement était effectué par une pompe

isocratique (Agilent 1100 series) réglée à un débit de 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. 20 μl de digestion tryptique était injectée sur la pré-colonne à un débit de 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ et l'échantillon était lavé pendant 5 minutes pendant que l'éluant était évacué.

Par la suite, la valve était actualisée et la pré-colonne fut mis en ligne avec la colonne analytique (PicoFrit - New Objective, Woburn, MA) (10 cm x 75 μm , C18 Biobasic, 5 μm , 300 Å). L'élution des peptides fut effectuée avec un gradient eau-acétonitrile provenant de la Nanopompe (Agilent series) et un débit de 200 nL/min. Le solvant A était de l'eau (acide formique 0,1 %) et le solvant B était une solution acétonitrile:eau (95:5) (acide formique 0,1 %). Le gradient linéaire fut débuté après le lavage. À zéro minute, la solution B était à 10,5 % et devait atteindre 42 % après 45 minutes, 73,5 % après 53 minutes et 100 % après 58 minutes. Le 100 % était maintenu pendant deux minutes puis retourné à 10,5 % de 60 minutes à 72 minutes.

Le spectromètre de masse était un QTOF Micro de Waters Micromass équipé d'une nanosource modifiée avec un adaptateur de nanospray (New Objective, Woburn, MA), afin de maintenir le bout de la colonne PicoFrit près du cône échantillonneur. Le voltage capillaire était optimisé avec la solution B 35 %. Le balayage MS ou « MS survey scan » fut ajusté à une seconde (0,1 seconde d'interscan) et enregistré de 350 à 1600 m/z. Seul les ions doublement et triplement chargés possédant une intensité supérieure à 25 comptes étaient considérés comme candidats pour la fragmentation MSMS. L'acquisition MSMS

s'arrêtait dès que le total des « ions current » atteignait 2800 comptes/seconde ou suite à un maximum de quatre secondes. Le balayage MS était ensuite acquis de 50 à 1990 m/z. Le temps de balayage était de 1,35 seconde et l'inter-balayage de 0,15 seconde. Un second précurseur ionique était sélectionné à partir du balayage MS suivant. Les ions doublement et triplement chargés qui étaient sélectionnés étaient fragmentés avec le programme de collision énergétique suivant : (i) pour les ions à doubles charge, la collision énergétique était de 25 eV pour un intervalle de 400 à 653 m/z, 26 eV pour un intervalle de 653 à 740 m/z, 28 eV pour un intervalle de 740 à 800 m/z, 32 eV pour un intervalle de 820 à 1200 m/z et 55 eV pour un intervalle de 1200 à 1600 m/z. (ii) Pour les ions à triples charges, la collision énergétique était de 14 eV pour un intervalle de 435 à 547 m/z, 19 eV pour un intervalle de 547 à 605 m/z, 24 eV pour un intervalle de 605 à 950 m/z et 35 eV pour un ratio m/z supérieur à 950 m/z.

9. Traitement des données protéomiques par bioinformatique

Les données protéomiques générées par la spectrométrie de masse sont produites à un taux phénoménal et s'accroissent de plus en plus. Bien que cela s'avère très prometteur en termes de possibilités scientifiques, il n'en demeure pas moins qu'il s'agit tout de même d'un problème qui doit être considéré davantage puisque dans bien des cas, les capacités analytiques de l'homme sont complètement dépassées (Reichhardt, 1999). Par l'usage du MALDI-TOF MS et du « nanoelectrospray », un minimum de 520 protéines ont été identifiées dans des

préparations de phagosome murin (Brunet et al., 2003) dont 150 de ces protéines ayant été préalablement publiées (Garin et al., 2001). De ce fait, il devient très contraignant de travailler et d'analyser rapidement autant de protéines en profondeur. Pour pallier à ce problème, nous avons eu recours à la bioinformatique; une discipline dans laquelle la biologie, l'informatique et la technologie de l'information sont couplées.

9.2 L'identification des protéines

Suite à l'acquisition des spectres de masse brutes des trois analyses protéomiques, ceux-ci étaient soumis à un pipeline bioinformatique (Kearney et al. 2003) qui a permis d'implémenter les procédures analytiques suivantes :

1. Les données brutes furent envoyées, par le programme TOMAS, au logiciel Distiller (Matrix Science, 2004) pour la détection et la création de « peaklists » en format mgf.
2. Les spectres bruts furent ensuite soumis à une détection des ions fragments (liste .pkl) par le logiciel Distiller (<http://www.matrixscience.com/distiller.html>). Les paramètres de Distiller étaient ajustés à un bruit de fond de 2 et d'un coefficient de corrélation de 0,7. Les « peaklists » étaient alors soumis au cluster de Mascot par le logiciel TOMAS pour effectuer une recherche contre la base de données uni_Drosophila_melanogaster, développée le 11 novembre 2004 à partir des bases de données Uniprot Swiss-Prot / TrEMBL (<http://www.pir.uniprot.org>). Les modifications

fixées était établies pour la carbamidométhyl sur les cystéines, les modifications variables étaient fixées pour l'oxydation sur les méthionines, les masses de peptides et la tolérance des fragments étaient établies à $\pm 0,5$ Da.

3. Les listes des peptides identifiés résultantes furent ensuite traitées, afin d'éliminer les peptides pouvant avoir survenir par hasard. De cette façon, seuls les peptides identifiés possédant une probabilité d'occurrence avec une chance inférieure à 0,05 furent retenus (c'est-à-dire, seuls les peptides pour lesquels le score peptidique de Mascot était supérieur au score ID furent retenus).

4. Les peptides identifiés étaient ensuite reliés aux protéines correspondantes, puis les protéines étaient ordonnées afin de produire une liste initiale des protéines identifiées. Cependant, les listes étaient encore redondantes, puisque 5 % des spectres correspondaient à plus d'un peptide et 40 % des peptides identifiés était présent dans plus d'une protéine. Conséquemment, les listes des protéines comprenant les trois analyses protéomiques furent traitées par un algorithme de groupement (Kearney et al. 2005), afin de générer une liste de protéine définie par des ensembles de protéines distinctes. Soit, le nombre minimum de séquences protéiques nécessaires pour expliquer les peptides observés.

5. Afin de faciliter l'analyse de la liste de protéines clusterisée, les données protéomiques furent intégrées dans une base de donnée relationnelle MySQL. Toutes les interrogations de la base de donnée ont été effectuées à l'aide du logiciel Navicat 6.0 (PremiumSoft, 2004).

9.3 La base de données relationnelle MySQL

Afin de permettre l'analyse des protéines identifiées avec beaucoup plus de maniabilité, nous avons importé les données relatives au protéome du phagosome de la drosophile dans une base de donnée MySQL (voir [en ligne] <http://www.mysql.com/>), selon le schéma relationnel de structure de la figure 6 (disponible [En ligne] http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/Schema_Droso.jpg). Par la suite, la base de donnée Ensembl! Mart (voir [en ligne] <http://www.ensembl.org/>) fut aussi importée dans notre base de données MySQL. Cette base de données Ensembl! nous a permis de déterminer les orthologues de la drosophile relatifs à l'homme (*homo sapiens*), à la souris (*mus musculus*), au vers (*Caenorhabditis elegans*) et à la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Les orthologues sont des gènes provenant de différentes espèces ayant évolués à partir d'un gène ancestral commun par spéciation et qui normalement posséderait tous la même fonction. La détermination des orthologues fut donc nécessaire pour l'identification et à la qualification des protéines du phagosome de la drosophile.

9.4 L'annotation de protéines

En plus de déterminer les orthologues relatifs aux protéines identifiées, les

protéines étaient annotées électroniquement, afin d'obtenir le plus d'informations automatisées au niveau de leurs fonctions (termes GO, voir [en ligne] <http://geneontology.org/>), de leurs domaines protéiques (domaine transmembranaire TMHMM, voir [en ligne] <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> et Prosite, voir [en ligne] <http://ca.expasy.org/prosite/>), des familles de protéines (Pfam, voir [en ligne] <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), de leur séquence FASTA et de leur taxonomie (NCBI, voir [en ligne] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Taxonomy>).

Heureusement, l'ensemble de ces annotations était contenu dans la base de données Uniprot Swiss-Prot/TrEMBL. Par conséquent, l'annotation fut développée à partir de cette base de donnée et pour se faire, les fichiers entiers de la base de donnée Uniprot Swiss-Prot/TrEMBL furent filtrés (voir scripts disponibles [en ligne] http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/Parser_SProt_to_DB.py et http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/Parser_TrEMBL_to_DB.py). Par la suite, les différentes informations protéiques étaient importées à l'intérieur des tables relationnelles de notre base de données MySQL. Suite à cette compilation des différentes données protéiques, il était désormais possible de croiser nos données protéomiques à l'ensemble des informations protéiques compilé.

9.5 Détermination des domaines transmembranaires par le modèle Hidden Markov (HMM)

La prédiction des domaines transmembranaires s'est effectuée à partir des

structures de séquences FASTA des protéines identifiées par spectrométrie de masse, selon le programme de prédiction de domaine transmembranaire le plus efficace : TMHMM «transmembrane hidden Markov model» (Moller et al., 2001). Les séquences FASTA provenant de la base de donnée Uniprot Swiss-Prot/TrEMBL étaient filtrées puis importées (voir script disponible [en ligne] http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/fasta_extract_to_DB.py) dans la table relationnelle BIOSEQ de notre base de donnée MySQL. Les séquences des protéines identifiées par spectrométrie de masse étaient sélectionnées puis soumises au serveur TMHMM 2.0 (voir [en ligne] <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Les données résultantes étaient finalement importées à l'intérieur de notre base de données MySQL (voir script disponible [en ligne] <http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/TMHMM.py>).

9.6 Alignement peptidique

L'alignement peptidique permet d'aligner les séquences de peptides uniques (séquence d'acide aminées exclusive à sa protéine correspondante) identifiées par spectrométrie de masse sur les séquences protéiques correspondantes identifiées par le logiciel Mascot. La visualisation d'un tel alignement facilite l'évaluation de la qualité des protéines identifiées. Cette évaluation est d'autant plus facilitée par le pourcentage de couverture de(s) peptide(s) unique(s) identifié(s) à partir de la séquence protéique entière. Pour se faire, un script en langage de programmation Python fut écrit (voir script disponible [en ligne] http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/alignementHTML_V2.py). Ce script

permet de générer une page HTML qui affiche les séquences protéiques et peptidiques alignées, en plus du pourcentage de couverture (nombre d'acide aminée de la séquence peptidique / nombre d'acide aminée de la séquence protéique entière x 100).

9.7 Détermination de la liste protéique du phagosome et modélisation moléculaire

Lorsque la base de donnée fut entièrement établie et complétée, nous avons simplifié et amélioré la relation entre les données protéomiques et la base de données d'orthologues d'Ensembl!, afin d'augmenter la vitesse de traitement des données communes. Par la suite, il fut possible de générer une liste des protéines du phagosome (voir liste disponible [en ligne] http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/Droso_All_homo.xls) contenant les orthologues de l'homme (*homo sapiens*), de la souris (*mus musculus*), du vers (*Caenorhabditis elegans*) et de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*).

Ensuite, chaque protéine était vérifiée dans la littérature (site disponible [en ligne] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), afin de classer chaque protéine selon leur(s) fonction(s) au niveau du phagosome. Cette classification nécessita aussi l'utilisation des annotations décrites au point 9.4. Une fois la classification terminée, des modèles moléculaires ont été développés à l'aide du logiciel Adobe Illustrator 10 (Adobe, 2004) et des éléments graphiques de Biocarta (<http://www.Biocarta.com/>).

RÉSULTATS

Les résultats de ce travail se divisent en deux parties. La première partie présente les résultats de la validation de la pureté de la technique d'isolation de phagosomes à l'aide de billes de latex chez la drosophile. Enfin, la seconde partie porte sur le traitement des données protéomiques à l'aide d'outils bioinformatiques.

1) Validation de la pureté de la technique d'isolation de phagosomes

1.1 Présence de noyaux intacts dans le PNS « Post Nuclear Supernatant »

La technique d'isolation de phagosome chez la drosophile fut adaptée à partir de la méthode utilisée avec la lignée cellulaire J774 de la souris (Desjardins et Griffiths, 2003). Lorsque nous avons appliqué cette technique au modèle de la drosophile, il s'est avéré difficile de briser les cellules S2 avec une seringue et du tampon HB (250 mM sucrose + 3,0 mM imidazole, pH 7,4). En comparaison aux cellules J774 de la souris, un nombre trop élevé de coups de seringue était nécessaire avant d'obtenir un bris cellulaire appréciable chez la drosophile. De plus, des colorations au bleu de toluidine indiquaient qu'une proportion trop élevée de noyaux était brisée, lorsque la fragmentation cellulaire devenait suffisante. Une telle isolation de protéines de phagosomes engendrait une quantité trop élevée de protéines contaminantes provenant du noyau. Afin d'optimiser la lyse cellulaire, nous avons utilisé un tampon hypotonique pour briser les cellules en état de turgescence. Comme il est possible d'observer à la figure 7, l'utilisation de ce tampon hypotonique s'est avérée efficace dans la fragmentation des cellules S2

ayant phagocytées des billes de latex (0,8 μm), puisque la majorité des membranes nucléaires semblent intègre.

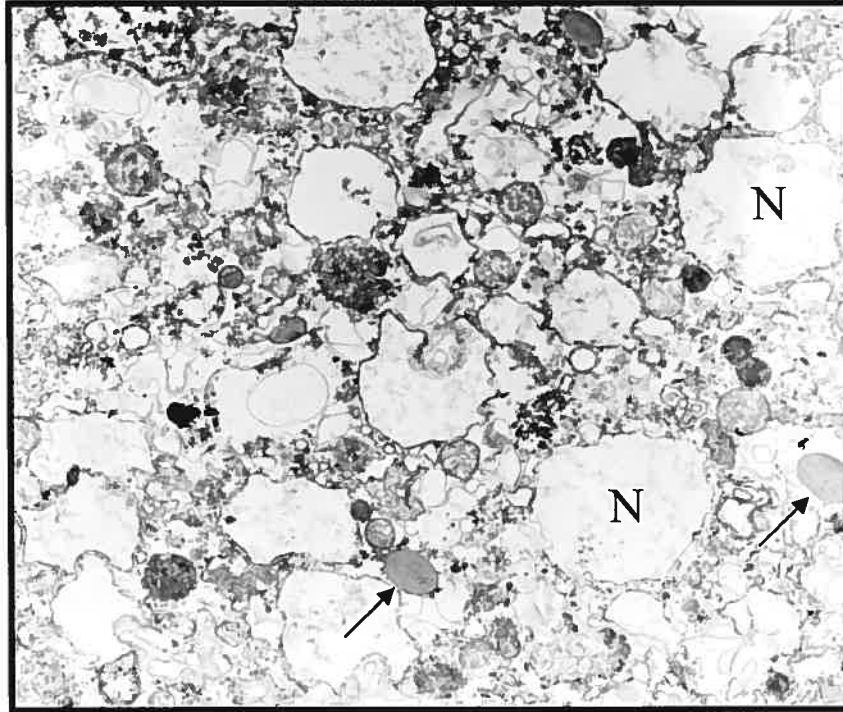


Fig 7. Image de l'intégrité des membranes nucléaires. Microscopie électronique (7 000x) de la fragmentation cellulaire à l'aide d'un tampon hypotonique de cellules S2 (*Drosophila melanogaster*) ayant phagocytées des billes de latex (0,8 μm). Sur cette image, il est possible d'observer la présence de billes de latex phagocytées identifiées par la pointe de flèches et que la majorité des noyaux (N) ne semblent pas endommagés.

1.2 Pureté de l'isolation de phagosomes

Après s'être assuré que la fragmentation des cellules S2 était convenable, nous avons vérifié par microscopie électronique si les phagosomes isolés par gradient de sucrose étaient contaminés par d'autres organelles. En observant les images de microscopie électronique de la figure 8, il est possible de remarquer à fort grossissement (50 000x) que les billes de latex sont encerclées et capturées par

la membrane d'un phagosome. Aussi, cette même image de microscopie électronique nous révèle que de petites structures accompagnent les phagosomes isolés et qu'il s'agit d'endosomes. Toutefois, l'absence de mitochondries ou de noyaux nous indique qu'aucune contamination n'est présente. Afin de confirmer ces évidences de microscopie électronique, nous avons effectué des immunobuvardages sur les préparations de phagosomes pour cibler les protéines Lamine Dm0 et Rab7. L'analyse de l'intensité des bandes obtenues par les immunobuvardages présentées à la figure 9 nous indique que la Lamine Dm0, une protéine constitutive du noyau, est plus que 8 fois moins concentrée dans les préparations de phagosomes que dans les lysats cellulaires totaux (TCL). Quant à Rab7, un marqueur d'endosome tardif, l'immunobuvardage présenté à la figure 9 démontre que cette protéine est au moins 4 fois plus concentrée dans les préparations de phagosomes que dans les lysats cellulaires totaux (TCL).

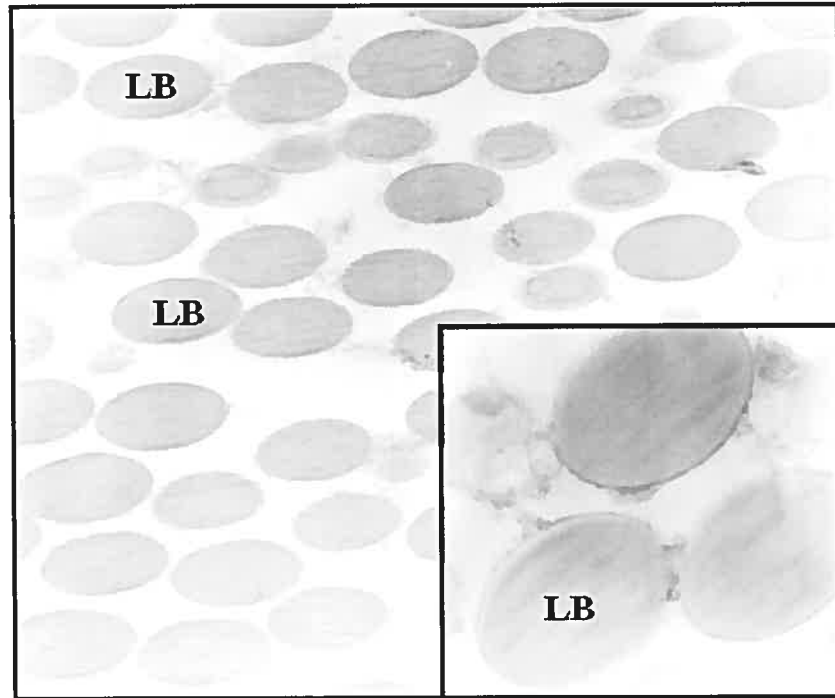


Fig 8. Image de la pureté des phagosomes isolés. Microscopie électronique (12 000x et 50 000x pour l'encadré) d'une isolation de billes de latex (LB) 0,8 μ m phagocytées sur gradient de sucrose (62 % à 10 %). Il est possible d'observer que des membranes, celle de phagosomes, englobent les billes de latex et que de petites structures accompagnent les phagosomes isolés. Nous croyons que ces petites structures seraient des endosomes et que l'absence de mitochondries et de noyaux nous indique que les phagosomes isolés sont purs.

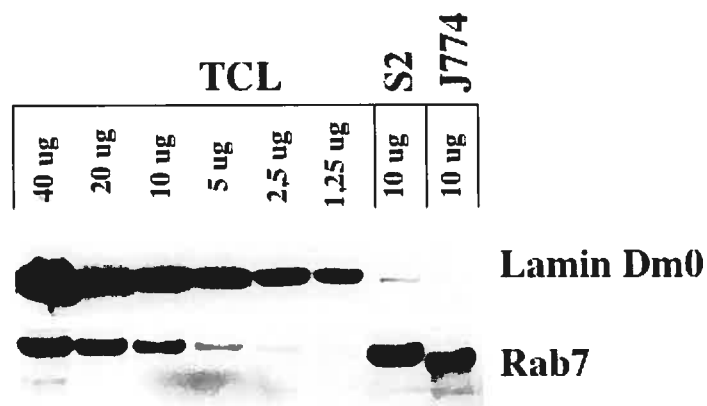


Fig 9. Immunobuvardage contre les protéines Lamine Dm0 et Rab7. Différentes quantités en μ g de protéines de phagosomes de cellules S2, de J774 (contrôle positif pour Rab7) ou de TCL (lysat cellulaire total) de cellules S2 ont été utilisées.

La très faible présence de Lamine Dm0 (plus que huit fois moins concentrée pour les S2 que dans le TCL) pour les cellules S2 indique une faible contamination de noyaux dans la préparation de phagosome. À l'opposé, le marqueur d'endosomes tardifs Rab7 est au moins quatre fois plus enrichi sur les phagosomes isolées que dans le TCL.

2) Analyses bioinformatiques

Après avoir déterminé que les phagosomes isolés étaient suffisamment purs, nous avons effectué des analyses de spectrométrie de masse sur les trois échantillons de phagosomes isolés.

2.1 Protéome du phagosome de la drosophile

Suite à l'acquisition des données générées par l'analyse de la spectrométrie de masse dans notre base de donnée, nous avons exporté une liste de protéines (disponible [en ligne] http://www.phagosome.com/data/JonathanBoulais/droso_all_homo.xls) sous format Excel (.xls) comprenant les orthologues de l'homme (*homo sapiens*), de la souris (*mus musculus*), du vers (*Caenorhabditis elegans*) et de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Par la suite, chacune des 617 protéines identifiées ont été soumises à une analyse littéraire, afin de déterminer leurs fonctions au niveau du phagosome sous la colonne « Consensus ». De ces 617 protéines, 106 (17 %) n'avaient aucune fonctions connues, tandis que les 83 % résiduels se sont vus attribués une catégorie fonctionnelle. D'ailleurs, ce sont à partir de ces fonctions que les modèles moléculaires présentés au point 2.4 furent développés.

2.2 Alignement peptidique

Le script d'alignement peptidique est un outil visuel nous permettant de visualiser sous un autre angle chaque protéine identifiée par sa couverture peptidique. Avec ce script, il est possible d'évaluer qualitativement une protéine d'intérêt selon le nombre de peptides unique identifiés et du % de couverture relatif à la protéine. De plus, il est possible d'accéder via Internet (lien en bleu) à la page informationnelle de Swiss-Prot/TrEMBL de chaque protéine. Les 617 protéines du phagosome furent alors soumises à cette analyse (voir fichier disponible [en ligne] http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/Alignement_Droso.html) et il est possible de voir en exemple à la figure 10 la protéine Calnexine. Pour cette protéine, quatre peptides uniques furent identifiés constituant un % de couverture de 7,43.

002393

Calnexin

MAWKMGGNRAATLALLFASSLLLLSSANAADLDTESDDFEDGYVEDVQREPAVIGGDEKLAYESPVIDAKKFHFA
LAYESPVIDAK
DHFDDVRESRKRWVLSQAKKDDIARRISKYDGIWNWESPQRIVWANDLGLVLKSKAKHAALAAPLRKPFEFKSDK
IYWANDLGLVLK
PLVVQYEVTLQEQECGGSYLKLLSAGKDTQLKAFNDKTPYTIMFGPDKCGNDVKMHFIFRHVNPINGTITTEKH
CNKPKNRLEEFKDKLPHLYQLVVRPNSFEIRVDHKKIINEGSLLDTFKPPVNPPAERIDDPNHDKPESWDEREKI
PDPFAHKPEDWDEDAPPQLPDTDAVMPNGWLEDEPDHIFDPTATKPEDWDAEIDGWEAPLVDNPVCEKAPGCGK
WKAPLIPNPNYKGWRAPIENPNYQGWAPRKIPNPDFFEDLKPQMTPI SAVGLELWSMSSDILFDNLIITDD
APMIENPNYQGK
VEVARDFAANSFDIKRRYIDRESDSFVNKVVVELAKANPSIWGIGLVAIVALVALTIYCRFGTAKSQD SAAKAAA
DFRANSFDIK
EAKKSDDPQPDEPREAERESDERAAGDTSKESTPLSASPKKNQKSDLDDNNEESKAARSREPAQTEESNTKTRKR
QARKE

Protein coverage %: 7.43

Fig. 10. Alignement peptidique de la protéine Calnexine. Exemple graphique provenant du fichier `Droso_peptide.html` (disponible [en ligne] http://phagosome.com/data/JonathanBoulais/Alignement_Droso.html) de l'alignement peptidique en format HTML pour la protéine Calnexine et de son pourcentage de couverture peptidique. Les peptides (en rouges) alignés sur la séquence entière sont uniques à cette protéine et il est possible d'accéder à la page informationnelle de Swiss-Prot/TrEMBL de cette protéine via un lien Internet du numéro d'accèsion de la protéine souligné en bleu. De cette fonctionnalité, il est possible de vérifier les peptides identifiés pour chaque protéine et d'accéder rapidement à l'ensemble des informations relatives à la protéine désirée.

2.3 Domaine transmembranaire prédit par le modèle TMHMM 2.0

Afin de déterminer le nombre de domaine transmembranaire de chaque protéine identifiée, nous avons utilisé le modèle informatique TMHMM 2.0. Tel qu'observé à la table I, cette analyse révéla que la grande majorité du protéome, soit 80 %, est dépourvu de domaine transmembranaire. De plus, 10 % des protéines possèdent un domaine transmembranaire, 2,7 % des protéines possèdent

2 domaines transmembranaires et 7,3 % du protéome est composé d'au moins trois domaines transmembranaires.

Tableau I : Pourcentage du nombre de domaine transmembranaire prédit par le modèle TMHMM 2.0 pour les protéines identifiées du protéome du phagosome de la drosophile.

Domaine transmembranaire	%
0	80
1	10
2	2,7
3 +	7,3

2.4 Modélisation moléculaire : l'exocytose

Une des premières analyses du protéome du phagosome de la drosophile fut portée sur la présence du complexe de l'« exocyst ». De cette évidence, il fut proposé que ce complexe participe d'une certaine façon à l'exocytose du contenu du phagosome. Tel qu'il est possible de voir à la figure 11, la fonction exocytique attribué au phagosome de la drosophile provient de l'identification par spectrométrie de masse de sept sous-unités sur neuf du complexe de l'« exocyst ».

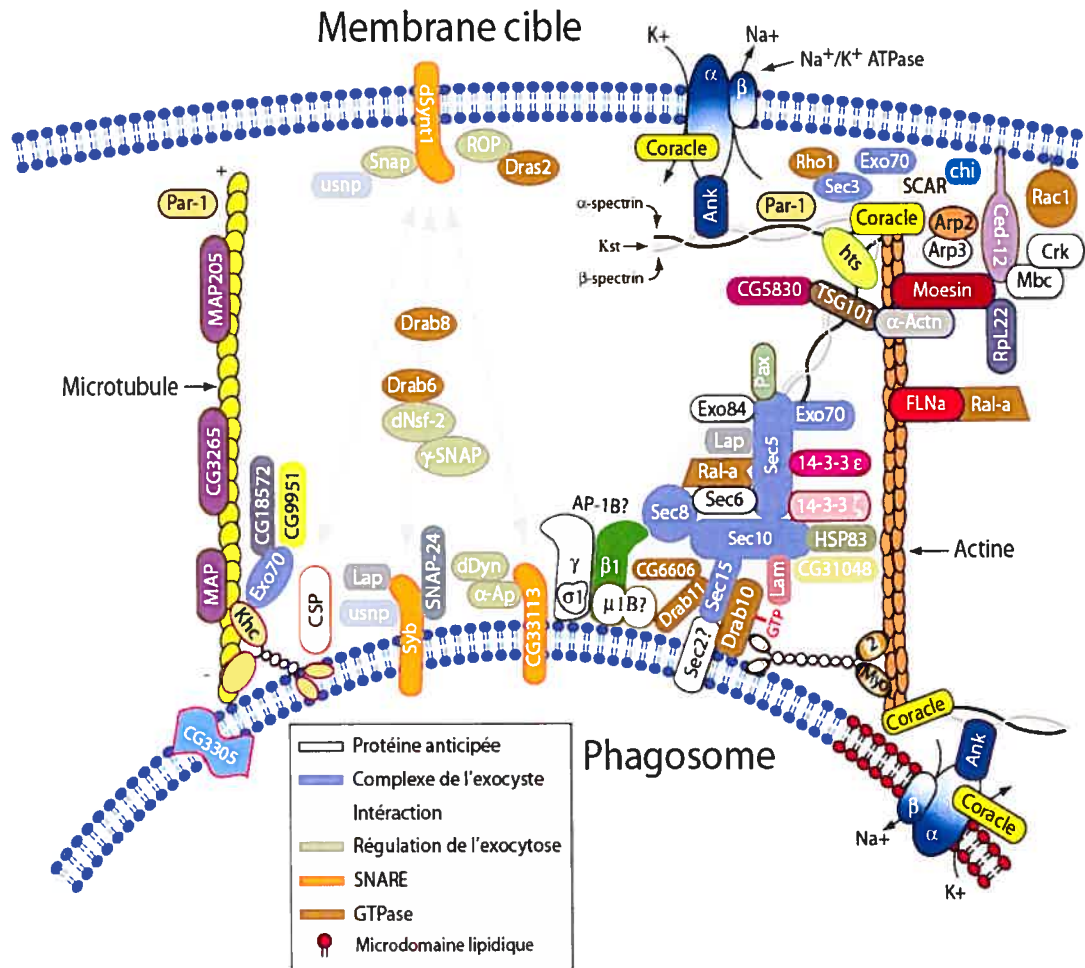


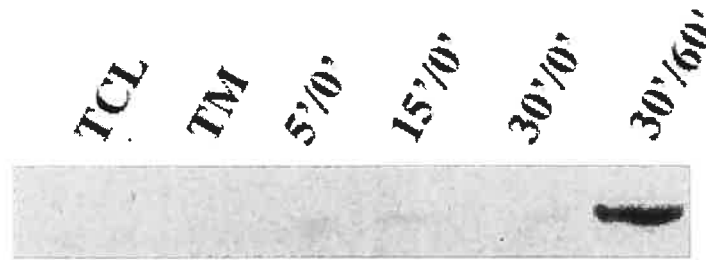
Fig. 11. Modèle moléculaire des interactions protéiques du complexe de l'exocyste au niveau du phagosome de la drosophile. α -Actn, alpha-actinin; Ank, Ankyrin; AP, Adaptor Protein complexe; Arp, Actin related protein; Ced-12, ELMO orthologue; CG3265, End-binding protein 1; CG3305, Lamp-1 orthologue; CG5830, Nuclear LIM interactor-interacting factor 1 orthologue; CG6606, RAB11 family interacting protein 2 orthologue; CG31048, Presenilin binding protein orthologue; CG33113, Reticulon-1 orthologue; CG18572, protéine CAD; chi, chickadee; Crk, ced-2; CSP, Cystein String Protein; dDyn, Dynamin; FLNa, Filamin a; HSP, Heat shock protein; hts, Hu-li Tai Shao protein; Khc, Kinesin heavy chain; Kst, β -spectrin heavy chain; Lam, Lamin Dm0; Lap, Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein; mbc, DOCK180 orthologue; MAP, Microtubule Associated Protein; Myo-2, Myosin heavy chain (non-muscle); Nsf, N-ethylmaleimide-sensitive factor; Par-1, proteinase-activated receptors; Pax, Paxillin; Rab, Ral, Ras et Rho, ras-related GTP-binding protein; ROP, Syntaxin binding protein 1 orthologue; RpL22, Ribosomal protein (large subunit); SCAR, suppressor of cAMP receptor; Sec2, petite GTPase; Sec3, 5, 6,

8, 10, 15 et Exo70, 84 : sous-unité du complexe de l'exocyst; SNAP, soluble NSF-attachment proteins; Syb, Synaptobrevin; TSG101, Tumor suppressor protein 101; usnp, SNAP-29 orthologue. Ce modèle fut constitué à partir des protéines identifiées par spectrométrie de masse (fichier disponible [en ligne] [http://www.phagosome.com /data/JonathanBoulais/ droso_all_homo.xls](http://www.phagosome.com/data/JonathanBoulais/droso_all_homo.xls)).

En plus de ce complexe, d'autres protéines identifiées par spectrométrie de masse ont été démontrées dans la littérature pour participer à l'exocytose de vésicules. Parmi ces candidats nous retrouvons la protéine Syntaxin-1A qui interagit avec les protéines Vap-A, SNAP-24, CSP, Synaptobrevin et Reticulon-1 like. Ces protéines pourraient aussi participer à l'exocytose du phagosome.

De ces évidences protéomiques, nous avons voulu confirmer la présence du complexe de l'« exocyst » au niveau du phagosome en effectuant des immunobuvardages de cinétique phagocytaires envers la sous-unité Sec8 de ce complexe. Les immunobuvardages envers la protéine Sec8 présentés à la figure 12 démontrent que Sec8 s'enrichie avec l'augmentation du temps de maturation au niveau du phagosome et qu'elle atteint son enrichissement maximal à partir du temps 30'/4h. Il semble donc que le complexe de l'« exocyst » soit bien présent au niveau du phagosome de la drosophile ou du moins que la sous-unité Sec8 y soit enrichie.

A)



B)



Fig. 12. Immunobuvardage envers la protéine Sec8 d'une cinétique de phagocytose. A) Cinétique phagocytaire de temps courts (10 μ g par piste). Sec8 n'apparaît seulement au niveau du phagosome qu'à partir du temps 30'/60'. B) Cinétique phagocytaire de temps longs (10 μ g par piste). Cette cinétique démontre que la protéine Sec8 s'enrichit avec l'augmentation du temps de maturation du phagosome pour atteindre son enrichissement maximal à partir du temps 30'/4h. TCL (lysate cellulaire total) et TM (membrane totale). Notez que les temps indiqués représente le temps de pulse / temps de chasse.

2.5 Modélisation moléculaire : la fusion d'endosome

La maturation du phagosome s'accompagne d'une série de fusions partielles avec différents endosomes. Il ne fut donc pas surprenant de découvrir que plusieurs protéines qui participent à ce mécanisme furent identifiées par notre analyse protéomique.

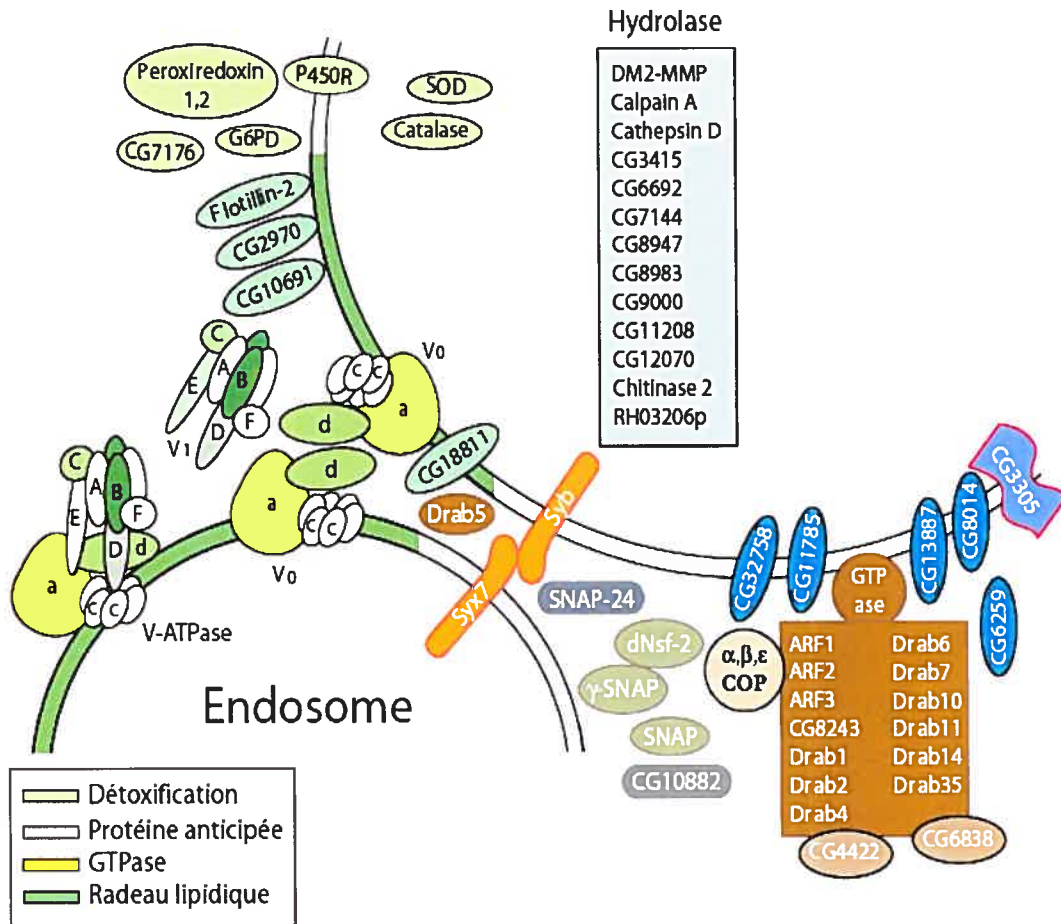


Fig. 13. Modèle moléculaire de la fusion d'endosome, de microdomaines lipidiques (en vert foncé) et des systèmes de dégradation/détoxification au niveau du phagosome de la drosophile. Ce modèle fut constitué à partir des protéines identifiées par spectrométrie de masse (fichier disponible [en ligne] http://www.phagosome.com/data/JonathanBoulais/droso_all_homo.xls). ARF, ADP-ribosylation factor; CG2970, Stomatin-like protein 2 orthologue; CG3305, lysosomal associated membrane protein 1 orthologue; CG3415, Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 orthologue; CG4422, Rab GDI alpha orthologue; CG6259, Syntaxin family 7 orthologue; CG6692, Cathepsin L orthologue; CG6838, ADP-ribosylation factor GTPase activating protein orthologue; CG7144, Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase orthologue; CG7176, isocitrate dehydrogenase orthologue; CG8014, DnaJ homolog subfamily C member 13 orthologue; CG8243, stromal membrane-associated protein orthologue; CG8947, Homologue of Sarcophaga 26; CG8983, disulfide-isomerase A3 precursor orthologue; CG9000, zinc metalloproteinase: STE24 homologue; CG10691, Prohibitin orthologue; CG10882, SEC24-related orthologue; CG11208, 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase orthologue; CG11785, Transmembrane protein Tmp21 precursor orthologue; CG12070, Prosaposin orthologue; CG13887, BCR-associated protein Bap31 orthologue; CG18811, glycosylphosphatidylinositol-

anchored orthologue; CG32758, Sorting nexin 27 orthologue; DM2-MMP, Matrix metalloproteinase 2; G6PD, 6-phosphogluconate dehydrogenase; NSF, N-ethylmaleimide-sensitive factor; Rab et ARF, ras-related GTP-binding protein; RH03206p, epoxide hydrolase 1 orthologue; SNAP, soluble NSF-attachment proteins; SOD, Superoxide dismutase; Syb, Synaptobrevin; Syx7, Syntaxin 7; Vo et V₁ sous-unité de la V-ATPase.

Comme il est possible d'observer à la figure 13, la sous-unité V₀ de la v-ATPase qui est ancrée à travers les microdomaines lipidiques, participe aux rapprochements membranaires entre endosomes et phagosomes. La fusion s'effectue ensuite par l'interaction de la protéine Syntaxin-7 avec les protéines SNAP-24 et Synaptobrevin. De plus, cette fusion est régulée entre autre par l'entremise des protéines Rab5, Rab7, NSF et SNAP. Ce sont d'ailleurs ces fusions qui permettent au phagosome d'acquérir les enzymes hydrolytiques (Cathepsin D et L, etc.) nécessaires à la dégradation des corps phagocytés. Les réactifs oxygénés résultants de cette dégradation sont ensuite pris en charge par le système de détoxification (Superoxide dismutase, Catalase, etc.) aussi présent au niveau du phagosome.

Dans le but de vérifier si les marqueurs de maturation du phagosome de la drosophile Rab5 et Rab7 se comportent similairement à ceux de la souris, nous avons effectué des immunobuvardages de cinétiques phagocytaires pour ces deux protéines. Les immunobuvardages de la figure 14A démontrent une forte concentration de la petite GTPase Rab5 lors des temps courts de phagocytose (5'/0' à 30'/0'). À l'opposé, lorsque le temps de maturation augmente (de 30'/60' à 30'/ON), il est possible de remarquer que la concentration de Rab5 diminue. De

ces résultats, nous affirmons que Rab5 est un marqueur précoce au niveau du phagosome de la drosophile et qu'il se comporte de façon équivalente à celui de la souris. Quant à la protéine Rab7, les immunobuvardages de la figure 14B nous démontrent que cette protéine s'enrichie au niveau du phagosome de la drosophile avec l'augmentation du temps de maturation du phagosome. Cet enrichissement est d'ailleurs perceptible jusqu'au temps 30'/0', puisque la concentration de Rab7 semble se stabiliser lors des temps plus tardifs. Sachant que la petite GTPase Rab7 est considérée en tant que marqueur tardif chez la souris, nous affirmons selon nos évidences que la protéine Rab7 se comporte aussi comme un marqueur tardif au niveau du phagosome chez la drosophile.

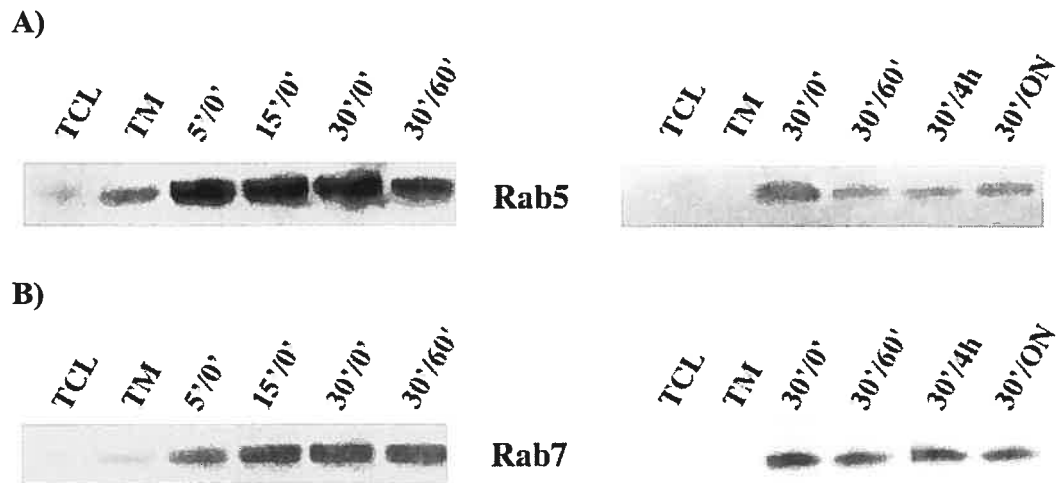


Fig. 14. Immunobuvardage envers les protéines Rab5 et Rab7 d'une cinétique de phagocytose. A) Cinétique phagocytaire de temps courts (à gauche) et longs (à droite) pour la protéine Rab5 (10 μ g par piste), un marqueur d'endosome précoce. La protéine Rab5 est fortement enrichie lors des temps précoces puis diminue à partir du temps 30'/0' jusqu'au temps 30'/ON. Donc, Rab5 est aussi un marqueur d'endosome précoce chez la drosophile B) Cinétique phagocytaire de temps courts (à gauche) et longs (à droite) pour la protéine Rab7 (10 μ g par piste), un marqueur d'endosome tardif. La protéine Rab7 s'enrichie avec l'augmentation du temps de maturation des phagosomes. De plus, Rab7 semble atteindre une

concentration maximale à partir du temps 30'/0'. Ainsi, Rab7 est aussi un marqueur d'endosome tardif chez la drosophile. TCL (lysate cellulaire total) et TM (membrane totale). Notez que les temps indiqués représente le temps de pulse / temps de chasse.

2.6 Modélisation moléculaire : la fusion du réticulum endoplasmique et la traduction

Parmi l'ensemble des protéines que nous avons identifiées par l'entremise de nos analyses de spectrométrie de masse une large proportion du protéome était associée au réticulum endoplasmique. Comme il fut démontré chez la souris, nous avons aussi proposé que le réticulum endoplasmique participe à la formation de phagosomes naissants chez la drosophile. Comme il est possible d'observer à la figure 15, l'implication du réticulum endoplasmique dans la phagocytose s'effectuerait par la fusion membranaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique sous la coupe phagocytaire. Le mécanisme moléculaire de cette fusion s'effectuerait entre autre par l'entremise de la SNARE Sec22 et du dimère VAP-A/VAP-B. Ce transfert membranaire provenant du réticulum endoplasmique procurerait donc au phagosome l'ensemble de la machinerie nécessaire à la traduction (chaperone, ribosome, facteurs d'initiations d'élongations (eIF) et facteurs d'élongations (eF)). Il serait ainsi possible de façon toute aussi étonnante que de nouvelles protéines soient traduites au niveau du phagosome !

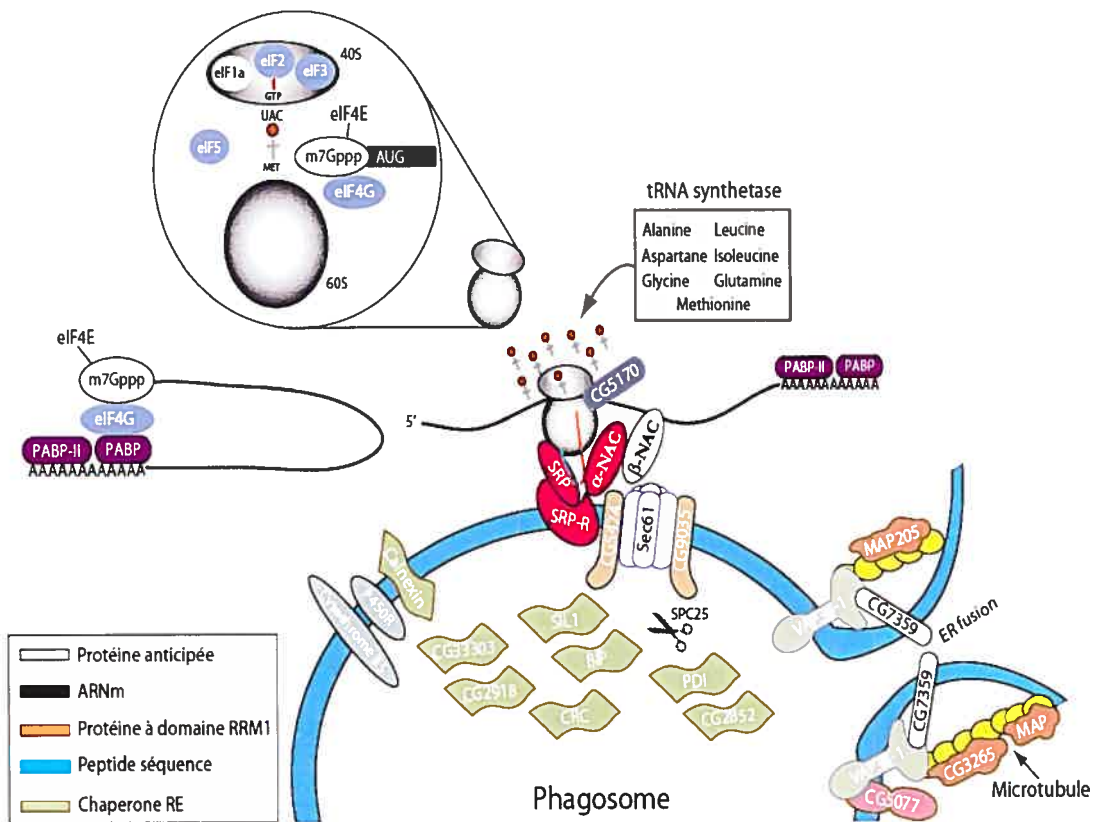


Fig. 15. Modèle moléculaire de la fusion du réticulum endoplasmique et de la traduction au niveau du phagosome de la drosophile. Bip, glucose-regulated protein precursor; CG2852, Rotamase orthologue; CG2918, member of the Hsp70 family; CG3265, End-binding protein 1 orthologue; CG5077, oxysterol binding protein-like 8 orthologue; CG5170, Vigilin orthologue; CG5474, TRAP- β orthologue; CG7359, Vesicle trafficking protein SEC22b orthologue; CG9035, Translocon-associated protein, delta subunit orthologue; CG33303, Ribophorin I orthologue; eIF, elongation initiation factor; MAP, Microtubule Associated Protein; Met, Methionine; NAC, nascent-polypeptide-associated complex; PABP, poly(A)-binding protein; RE, réticulum endoplasmique; Sec61, protéine du translocon; SIL1, endoplasmic reticulum chaperone; SRP, Signal recognition protein; TRAP, Translocon-associated protein; VAP33-1, VAMP-associated protein. Ce modèle fut constitué à partir des protéines identifiées par spectrométrie de masse (fichier disponible [en ligne] http://www.phagosome.com/data/JonathanBoulais/droso_all_homo.xls).

Afin de vérifier la possibilité du modèle moléculaire de la fusion du réticulum endoplasmique au niveau du phagosome chez la drosophile, nous avons

effectué des immunobuvardages de cinétiques phagocytaires envers les protéines Sec22 et Calnexine. Comme il est possible d'observer à la figure 16A, la chaperone Calnexine est enrichie au sein du phagosome et demeure constante malgré l'évolution de la maturation du phagosome. Quant à Sec22, cette SNARE semble fortement présente au début de la formation du phagosome (30'/0') pour ensuite disparaître rapidement avec l'augmentation du temps de maturation du phagosome.

A)



B)



Fig. 16. Immunobuvardage envers les protéines Calnexine et CG7359 (homologue de Sec22) d'une cinétique de phagocytose. A) Cinétique phagocytaire de temps courts (à gauche) et longs (à droite) pour la protéine Calnexine (10 µg par piste). La protéine Calnexine est présente de façon constante à travers les différents temps de maturation du phagosome. B) Cinétique phagocytaire de temps longs pour la protéine Sec22 (10 µg par piste). Cette cinétique démontre que la protéine Sec22 est recrutée au début de la phagocytose pour ensuite disparaître avec l'augmentation du temps de maturation du phagosome. TCL (lysate cellulaire total) et TM (membrane totale). Notez que les temps indiqués représente le temps de pulse / temps de chasse.

2.7 Modélisation moléculaire : le transport d'ARNm

Le déclenchement de la traduction de nouvelles protéines nécessite évidemment la présence d'ARNm. Suite au développement du modèle moléculaire de la fusion du réticulum endoplasmique au niveau du phagosome et d'une éventuelle traduction au niveau de cet organelle, il fut proposé que des ARNm pourraient être transportés au phagosome afin d'engendrer une traduction spécifique. En analysant notre protéome du phagosome de la drosophile, nous avons découvert que les joueurs reconnus pour leur implication dans le transport précis d'ARNm ont été identifiés en grande majorité. Ce mécanisme présenté à la figure 16 propose que des granules d'ARNm (en gris) se déplacent le long des microtubules par l'entremise du moteur moléculaire Kinesin vers la membrane du phagosome. Lorsque la portion 3' UTR des ARNm contenus dans le granule de transport est reconnue spécifiquement à son site de destination, les ARNm sont déchargés localement. Ces ARNm sont alors pris en charges par les ribosomes, puis traduits au niveau de la membrane du phagosome.

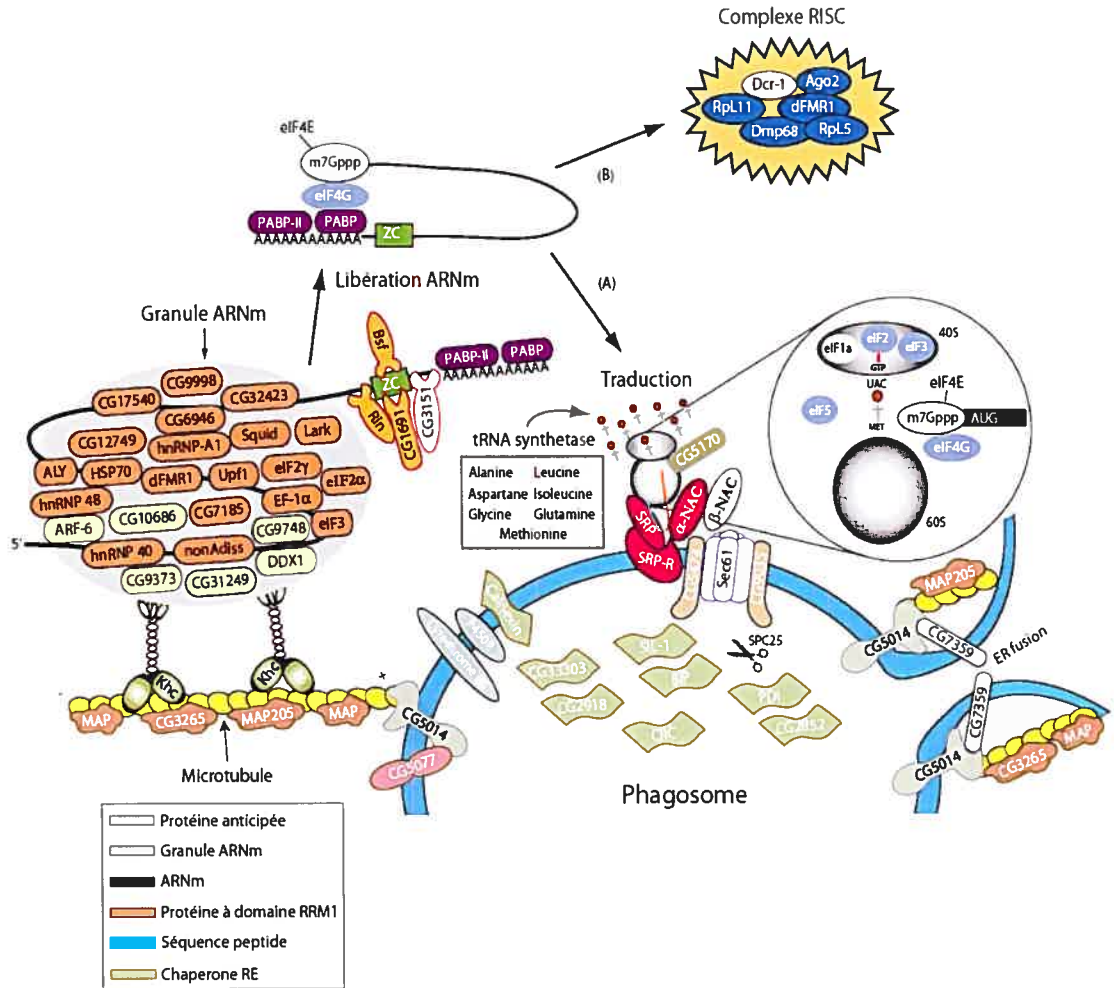


Fig. 17. Modèle moléculaire du transport d'ARNm au niveau du phagosome de la drosophile. Lorsque les ARNm sont libérés par les granules d'ARNm au niveau du phagosome, suite à une reconnaissance spécifique des granules d'ARNm, les ARNm libérés peuvent être traduits (A) ou dégradés par le complexe RISC (B). Ago2, Argonaute 2; ALY, Transcriptional coactivator Aly/REF; ARF, ADP-ribosylation factor; Bip, glucose-regulated protein precursor; Bsf, Bicoid mRNA stability factor; CG1691, IGF-II mRNA-binding protein orthologue; CG2852, Rotamase orthologue; CG2918, member of the Hsp70 family; CG3151, RNA-binding protein HuD orthologue; CG3265, Microtubule-associated protein RP/EB family member; CG5077, oxysterol binding protein-like 8 orthologue; CG5170, Vigilin orthologue; CG5474, TRAP-β orthologue; CG6946, hnRNP H orthologue; CG7185, cleavage and polyadenylation specific factor 6 orthologue; CG9035, Translocon-associated protein, delta subunit orthologue; CG9373, myelin basic protein expression factor 2 orthologue; CG9748, DEAD-box protein 3; CG9998, Splicing factor U2AF 50 kDa subunit; CG10686, RAP-55 orthologue; CG12749, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; CG17450, Splicing factor 45 orthologue; CG31249, CGI-99 orthologue; CG32423, RNA-binding protein RBMS3 orthologue; CG33303, Ribophorin I orthologue; CRC, Calreticuline; Dcr-

1, Dicer-1; DDX, DEAD box protein; dFMR1, Fragile X mental retardation syndrome related protein; Dmp68, ATP-dependent RNA helicase P62; EF, Elongation factor; eIF, Eukaryotic translation initiation factor subunit; hnRNP, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; HSP, Heat shock protein; Khc, Kinesin heavy chain; Lark, RNA-binding protein lark; MAP, Microtubule Associated Protein; NAC, nascent-polypeptide-associated complex; nonAdiss, No-on-transient A protein; P450R, NADPH-cytochrome P450 reductase; PABP, poly(A)-binding protein; PDI, Protein disulfide-isomerase precursor; Rin, Rasputin; RpL, Ribosomal protein (large subunit); Sec61, protéine du translocon; SIL1, chaperone du réticulum endoplasmique; SPC25, Probable microsomal signal peptidase 25 kDa subunit; Squid, RNA-binding protein squid (HNRNP 40); SRP, Signal recognition protein; SRP-R, Signal recognition protein receptor; Upf1, Regulator of nonsense transcripts 1 homolog; Vap33-1, VAMP-associated protein orthologue; ZC, Zip code. Ce modèle fut constitué à partir des protéines identifiées par spectrométrie de masse (fichier disponible [en ligne] http://www.phagosome.com/data/JonathanBoulais/droso_all_homo.xls).

DISCUSSION

Comme il fut mentionné précédemment, la phagocytose est le processus par lequel les cellules internalisent de larges particules pour être ensuite dégradées à travers la voie endo-lysosomale. Ce mécanisme joue un rôle clé au niveau de l'immunité innée, mais aussi dans l'enclenchement de la réponse immunitaire adaptative. Plus précisément, la phagocytose relie l'immunité innée à l'immunité adaptative par l'internalisation des microorganismes, suivie d'une présentation des peptides antigéniques par l'entremise des CMH. Chez la souris, de même que chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, les mécanismes moléculaires impliqués au niveau du phagosome ont été identifiés par protéomique, puis caractérisés (Desjardins, 2003; données non publiées, Desjardins et Soldati). De ces évidences, il s'avère que certains groupes de protéines sont conservés à travers l'évolution au niveau du protéome du phagosome, tant chez l'amibe que chez la souris et constituent ce que l'on nomme comme étant le « bloc primitif fixe » de la phagocytose.

Dans cette étude, nous présentons une analyse protéomique et bioinformatique du phagosome de la mouche à fruits *Drosophila melanogaster*, dans la perspective future de consolider l'analyse évolutive de la phagocytose, en ajoutant une troisième espèce comparative. L'analyse bioinformatique des domaines transmembranaires de notre protéome nous a révélé que 80 % des protéines identifiées sont constituées de protéines dépourvues de domaine transmembranaire. De plus, cette étude nous a permis de développer plusieurs

modèles moléculaires qui reflètent les différents aspects fonctionnels du phagosome de la drosophile, tel que : l'exocytose, la fusion du réticulum endoplasmique, la traduction, le transport ciblé d'ARNm et la fusion d'endosomes.

Pour effectuer cette étude, il fut tout d'abord nécessaire d'adapter la technique d'isolation de phagosomes par billes de latex, premièrement développé chez la souris, à une lignée phagocytaire de la drosophile. Cette méthode fut validée, puis vérifiée dans le but de s'assurer de la pureté des phagosomes isolés. Les résultats de cette validation démontrent que les phagosomes isolés par cette technique d'isolation sont d'une excellente pureté, puisqu'ils sont dépourvus de contaminants nucléaires et mitochondriales.

Pureté des préparations de phagosomes isolés à l'aide de billes de latex

Lorsque nous avons adapté la méthode d'isolation de phagosome aux cellules S2, nous avons réalisé qu'il était difficile d'obtenir une fragmentation cellulaire convenable. Il était donc nécessaire de faciliter la fragmentation cellulaire, puisqu'un temps de fragmentation élevé implique une exposition prolongée aux protéases cellulaires et donc d'une dégradation des protéines du phagosome. Afin de pallier à cette contrainte, nous avons utilisé un tampon hypotonique dépourvu de détergent dans le but premier de briser les cellules en état de turgescence, tout en préservant l'intégrité des noyaux. En utilisant ce tampon hypotonique, nous avons considérablement diminué le temps de

fragmentation, en plus d'améliorer la qualité des préparations de phagosomes, puisque les membranes nucléaires ne sont pas endommagées (voir figure 7).

Pour ce qui est du degré de pureté des préparations de phagosomes, les images de microscopie électronique semblent montrer la présence de petites structures adjacentes aux phagosomes isolés et ces dernières pourraient être considérées comme des contaminants (voir figure 8). Toutefois, nous croyons que ces petites structures sont en fait des endosomes fusionnés et non des contaminants, puisque nous n'observons pas de mitochondries ni de membranes nucléaires. Nous avons tenté des immunobuvardages chez la drosophile à partir d'anticorps spécifiques envers les protéines de souris Tim23, Tom20 et cytochrome C, des protéines reconnues en tant que marqueurs de la mitochondrie. Malheureusement, les anticorps n'ont pu reconnaître les orthologues chez la drosophile.

Malgré l'absence de preuves que ces petites structures soient des endosomes, nous avons effectué des immunobuvardages, dans le but de quantifier le degré de contamination nucléaire. Nos résultats démontrent qu'une très faible quantité (plus que huit fois moins concentrée) de Lamine Dm0 semble présente dans nos préparations. En comparant l'intensité de la bande obtenue pour les préparations de phagosomes de cellules S2 (10 μ g) à celle de la bande 1,25 μ g de TCL (voir figure 9), il est clair que le degré de contamination nucléaire est très faible. De plus, le fort enrichissement du marqueur tardif Rab7 au niveau des

préparations de phagosomes de cellules S2 (quatre fois plus concentrées) vient appuyer les évidences de l'immunobuvardage envers la Lamine Dm0, témoignant de la pureté de la technique d'isolation de phagosomes.

De ces évidences, nous confirmons donc que la technique d'isolation de phagosomes adaptée à la lignée cellulaire S2 de la drosophile nous permet de générer des préparations de phagosomes d'une excellente pureté, puisque les analyses morphologiques et biochimiques témoignent de l'intégrité des membranes nucléaires, d'un enrichissement du marqueur d'endosomes tardif Rab7 et d'une très faible présence de la protéine nucléaire Lamine Dm0.

Analyse protéomique par spectrométrie de masse des préparations de phagosomes de la drosophile

Après s'être assuré de la pureté des phagosomes isolés, des analyses protéomiques par spectrométrie de masse ont pu être effectuées sur trois échantillons distincts de phagosomes isolés. Les résultats de ces analyses ont permis d'identifier 617 protéines constituant une excellente couverture du protéome du phagosome de la drosophile, sachant que chez la souris, plus de 600 protéines ont été identifiées (Brunet et al., 2003).

Étant plus élevé dans la hiérarchie évolutive, il serait raisonnable que le protéome murin du phagosome soit plus diversifié que celui de la drosophile. Cependant, il semble que l'écart de richesse entre ces deux espèces ne soit pas

aussi large que prévu. En effet, l'absence de présentation antigénique chez la drosophile, et donc d'immunité adaptative, nous laissait croire à une différence nettement plus marquée entre ces deux espèces.

Toutefois, se pourrait-il que des protéines uniques à la drosophile puissent assumer des fonctions encore inconnues au sein du phagosome, dans le but de compenser, d'une certaine façon, l'absence d'immunité adaptative ? Cette question semble forte intéressante, puisque 17 % des protéines identifiées au niveau des phagosomes de la drosophile ont des fonctions inconnues. De plus, ces inconnues regroupent des protéines qui ne possèdent pas d'orthologues et dont la littérature ne contient aucune information à propos des fonctions potentielles de ces protéines. Ces 17 % de protéines inconnues (106 protéines) s'avèrent alors fort intéressant dans l'étude de l'implication de la phagocytose à travers l'immunité innée. D'ailleurs, des anticorps seront développés contre certaines de ces protéines inconnues, dans l'espoir de découvrir leurs implications au niveau du phagosome.

Afin d'élargir les capacités informatives de notre protéome, nous prévoyons, dans un futur rapproché, coupler nos données protéomiques aux données de la carte protéique interactive de la drosophile, aussi connue sous le nom d'interactome, qui fut déterminée par la méthode des deux hybrides (Giot et al., 2003). Pour la première fois dans le domaine de la protéomique, nous serons en mesure non seulement d'identifier des protéines au niveau d'une organelle, mais aussi de prédire ses interactions protéiques. Ainsi, il sera peut-être possible

d'identifier de nouvelles voies ou de nouveaux concepts qui n'étaient pas encore associés au phagosome et d'en étudier leurs implications lors du mécanisme de la phagocytose.

Analyses bioinformatiques de l'alignement peptidique

Suite à l'obtention de nos données protéomiques, nous avons effectué des analyses bioinformatiques, afin de travailler, avec plus de rigueur et de facilité, notre protéome de 617 protéines.

Tout d'abord, nous avons vérifié l'alignement des peptides avec leur séquence protéique attribuée. Bien que cet outil nous ait permis de constater que les peptides identifiés étaient parfaitement alignés, il nous était impossible de déterminer le pourcentage de couverture peptidique. Pourtant, le pourcentage de couverture aurait pu être un excellent indice afin de juger de la qualité de l'alignement peptidique. Toutefois, il faut savoir que chaque protéine possède ses propres quantités de lysine, d'arginine et de domaine transmembranaire et que ces derniers constituent des facteurs qui influencent sur la détection des peptides digérés par l'analyse de spectrométrie de masse. De ce fait, il devient alors inapproprié de comparer les pourcentages de couverture peptidique entre différentes protéines. Cependant, nous prévoyons contourner ce problème en ajoutant plus de fonctionnalité à notre script d'alignement en permettant la comparaison entre diverses expériences ou répliquas. De cette façon, il sera

possible de comparer le pourcentage de couverture d'une même protéine entre diverses expériences ou traitements et alors qualifier si la couverture peptidique est faible ou élevée.

Analyses bioinformatiques des domaines transmembranaires

Par la suite, nous avons effectué une analyse des domaines transmembranaires à l'aide du modèle informatique TMHMM 2.0. Cette analyse révéla que 80 % des protéines du phagosome de la drosophile ne possède aucun domaine transmembranaire prédit. Il n'en demeure pas moins que l'analyse par spectrométrie de masse pourrait défavoriser la détection des protéines possédant des domaines transmembranaires et qu'un tel fait puisse expliquer notre faible pourcentage de protéines transmembranaires. D'un autre point de vue, ce faible pourcentage de protéines transmembranaires dépeint clairement le portrait très dynamique du phagosome. D'ailleurs, ces protéines dépourvues de domaine(s) transmembranaire(s) proviendraient sûrement des interactions que subit le phagosome à travers la voie endo-lysosomale, lors du processus de maturation.

Bien que ces données aient été prédites par un modèle informatique et que ces programmes ne sont pas encore parfaits, il n'en demeure pas moins que le programme de prédiction transmembranaire TMHMM 2.0 est considéré comme étant le plus précis de tous (Moller et al., 2001). Cependant, il n'en demeure pas moins qu'il semblerait que ce programme aurait tendance à sous-estimer les

domaines transmembranaires. Pour pallier cette contrainte, il aurait été possible d'utiliser la méthode de prédiction des séquences signaux comme SignalP 2.0 (Nielsen et Krogh, 1998).

Toutefois, nous demeurons confiant face à nos résultats, puisqu'il fut déterminé que seulement 25 % de l'ensemble des protéines contenues parmi les bases de données protéiques SWISS-PROT et TrEMBL possèdent au moins un domaine transmembranaire (Bairoch et Apweiler, 2000). Il s'avère donc que notre 20 % de protéines qui possède au moins un domaine transmembranaire n'est pas aussi sous-estimé que nous l'avons cru.

Modélisation moléculaire

Dans le domaine de la protéomique, l'analyse par spectrométrie de masse se résume trop souvent à l'identification simpliste d'une liste de protéines. Puisque ces analyses s'avèrent limitées et peu constructives sur le plan scientifique, nous avons opté d'enrichir ces analyses à l'aide d'outils bioinformatiques.

Afin d'innover, nous présentons pour la première fois une analyse protéomique du phagosome sous la forme de modèles moléculaires virtuels et dans lesquelles différentes fonctions hypothétiques sont proposées, tels que la fusion d'endosomes, l'exocytose, la fusion du réticulum endoplasmique, la traduction protéique et le transport ciblé d'ARNm. L'organisation virtuelle de chaque

protéine, selon leur (s) fonction (s) respective (s), nous a permis d'ériger des hypothèses fonctionnelles qui seront vérifiées par des études biochimiques futures.

À travers ces modèles, il faut toutefois reconnaître l'utilité que nous ont apportée les homologues (un gène relié à un second gène par un ancêtre commun) qui furent déterminés par l'entremise de la base de données Ensembl!. En écartant ces orthologues, nous n'aurions pu développer tous ces modèles moléculaires, puisqu'environ 60 % de notre protéome du phagosome de la drosophile est identifié par des noms de gènes peu informatifs, tel que CG3305 qui a pour orthologue la protéine LAMP-1. De plus, ce sont à partir de ces orthologues que nous serons en mesure de déterminer le « bloc primitif fixe » de la phagocytose, puisqu'il nous est désormais possible de comparer informatiquement notre protéome à celui identifié chez la souris et l'amibe *Dictyostelium discoideum*.

Le recrutement du réticulum endoplasmique lors de la phagocytose

L'implication du réticulum endoplasmique lors de la phagocytose est un mécanisme conservé à travers l'évolution, allant de l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Muller-Taubenberger et al., 2001) à la souris (Gagnon et al., 2002), en passant par la drosophile. Ce fut donc à nouveau sans trop d'étonnements que nous avons découvert, par nos analyses de spectrométrie de masse, une forte présence de protéines associées au réticulum endoplasmique dans nos préparations de phagosomes de drosophile (voir figure 15). De plus, nos résultats démontrent la

présence constante de la chaperonne du réticulum endoplasmique, Calnexine, à travers différents temps de phagocytose (voir figure 16A). Il semble donc que le réticulum endoplasmique soit aussi impliqué dans le mécanisme de la phagocytose chez la drosophile. D'autant plus qu'il fut démontré à partir d'hémocytes phagocytaires de l'insecte *Pieris rapae* qu'une autre chaperonne du réticulum endoplasmique, calreticuline, est retrouvée à la surface de ces hémocytes et que le blocage de cette protéine, par des anticorps, diminue significativement la phagocytose (Asgari et Schmidt, 2003).

Par ailleurs, nous retrouvons parmi notre protéome la protéine Vap33-1, aussi connue sous le nom de son orthologue VAP-A. Cette protéine possède l'habileté d'interagir avec de nombreuses protéines intracellulaires, notamment avec son dimère VAP-B et les SNAREs syntaxin 1A, rbet1, α -SNAP, NSF et tout particulièrement Sec22 (Weir et al., 2001). Fait intéressant, le second dimère VAP-B fut démontré pour être impliqué dans le remodelage du réticulum endoplasmique (Amarilio et al., 2005). Il se pourrait donc que les dimères VAP-A et B engendrent un remodelage du réticulum endoplasmique lors de la phagocytose, afin de permettre son recrutement à la membrane plasmique, sous la coupe phagocytaire.

De plus, la SNARE Sec22 semble directement impliquée dans la fusion du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique, lors de la phagocytose (Becker et al., 2005). Bien que nous n'ayons pas identifié la protéine Sec22 par

spectrométrie de masse, nous avons toutefois démontré son enrichissement au niveau du phagosome lors de temps courts de phagocytose (voir figure 16B). Il est donc fort probable que cette SNARE soit responsable du recrutement du réticulum endoplasmique lors de la phagocytose chez la drosophile.

Ces hypothèses s'avèrent très intéressantes puisque les protéines VAP, associées à la SNARE Sec22, pourraient dans un premier temps moduler le remodelage du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique. Tout en permettant, dans un second temps, la fusion du réticulum avec la membrane plasmique sous la coupe phagocytaire, afin de générer un phagosome naissant.

La traduction au niveau du phagosome

En partant du principe de l'implication du réticulum endoplasmique dans l'élaboration de la phagocytose, il serait raisonnable de stipuler qu'un tel transfert de membrane regrouperait aussi l'ensemble de la machinerie protéique nécessaire à la traduction de nouvelles protéines. En analysant notre protéome, il fut rapidement envisageable qu'une telle hypothèse soit réaliste, puisque nous avons identifié une forte présence de protéines ribosomales (petite (40S) et grande sous-unité (60S) composées toutes deux d'ARNr), de facteurs d'initiation de la traduction (eIF), de facteurs d'élongation de la traduction (eF), d'ARNt synthetase, de la protéine SRP et de son récepteur, en plus de la chaperonne cytosolique NAC

(Wiedmann et Prehn, 1999) et de Vigilin une protéine qui serait impliquée dans le cycle des ARNt au niveau des ribosomes (Vollbrandt et al., 2004).

Malgré que nous n'avons pas identifié par spectrométrie de masse la protéine majeure du translocon, Sec61, reconnue à être présente chez la drosophile, il se pourrait aussi que la traduction de nouvelles protéines s'effectue tout de même du côté cytosolique sans qu'aucune protéine ne traverse vers l'intérieur du phagosome. Ces protéines nouvellement traduites à la surface cytosolique du phagosome pourraient entre autres être impliquées parmi les différentes voies de signalisation associée au phagosome (Swanson et Hoppe, 2004), dans la maturation du phagosome à travers la voie endo-lysosomale (Scott et al., 2003) ou dans d'autres fonctions encore inconnues.

Toutefois, il est toujours possible de considérer que la protéine Sec61 ne fut pas identifiée par spectrométrie de masse due à ses nombreux domaines transmembranaires et qu'ainsi le translocon soit tout de même présent au niveau du phagosome. Par ailleurs, des indices nous laissent croire en ce sens, puisque nous avons identifié le complexe TRAP (Holthuis et al., 1995) et la protéine Ribophorin (Shibatani et al., 2005), toutes deux connues pour être associées au translocon.

Le transport ciblé d'ARNm au niveau du phagosome

Dans l'optique de parfaire l'hypothèse d'une éventuelle traduction au niveau du phagosome, il fut proposé, suite à l'analyse de notre protéome, qu'un transport d'ARNm pourrait permettre d'acheminer spécifiquement des ARNm au niveau du phagosome, en vue d'enclencher la traduction de nouvelles protéines.

Ce concept du transport d'ARNm par l'entremise de granules fut principalement étudié au niveau des neurones, puisque ces cellules sont composées de structures hautement polarisées comprenant un corps basal, un axone et des dendrites. La majorité des protéines nécessaires aux axones et aux terminaisons synaptiques sont synthétisées dans le corps basal, puis transporté le long de l'axone à l'intérieur d'organelles ou complexes protéiques (Grafstein et Forman, 1980). Cependant, de nombreux ARNm sont transportés du corps basal aux dendrites, afin de supporter la synthèse protéique locale (Job et Eberwine, 2001).

La taille de ces granules d'ARNm a été évaluée à 1000S ou plus et une analyse protéomique chez la souris a révélé la présence d'un minimum de 42 protéines dans la composition des granules d'ARNm (Kanai et al., 2004). En comparant notre protéome à cette étude, nous avons découvert plusieurs protéines communes entre les deux espèces et qu'un transport ciblé d'ARNm pourrait s'effectuer au niveau du phagosome.

C'est à partir de cette étude que nous avons entrepris de comparer les protéines de notre analyse à celle-ci, afin de développer notre modèle moléculaire sur le transport ciblé d'ARNm. Ce modèle moléculaire propose donc que des ARNm seraient transportés, par un transport ATP-dépendant antérograde, sur des microtubules par l'entremise du moteur moléculaire Kinesin vers la membrane du phagosome. Les ARNm seraient ensuite identifiés spécifiquement par un complexe protéique retrouvé à la membrane du phagosome (comprenant la protéine IGF-II) pour alors déclencher le déchargement du contenu des granules d'ARNm au niveau cytoplasmique. Par la suite, les ARNm seraient pris en charge par les ribosomes pour la néo-synthèse de protéines (voir figure16).

La distribution localisée des ARNm à leur site de destination respectif est assurée par l'entremise d'une région de 54 nucléotides de la portion 3'-UTR des ARNm. Comme une lettre à la poste, cette région permet d'acheminer les ARNm à la bonne adresse, d'autant plus que cette région qui identifie chaque ARNm est connue sous le nom de région « code postal » ou « zip code ». Ce sont des protéines retrouvées aux différents sites de destinations qui reconnaissent la région « code postale » et qui indiquent aux granules d'ARNm de décharger leur contenu d'ARNm. D'ailleurs, notre analyse nous a permis d'identifier la protéine RE72930p, un orthologue des protéines IGF-II (Nielsen et al., 2000) de la souris et ZBP-1 (zip code binding protein) du poulet.

Plus précisément, IGF-II est une protéine dotée de deux motifs de reconnaissance d'ARN (RRM), en plus de quatre domaines KH (hnRNP K homology) et fait partie de la famille IMP (IGF-II RNA binding protein). Cette famille fut notamment démontrée pour être impliquée dans la synthèse protéique localisée de β -actine (Ross et al., 1997). De plus, IGF-II semblerait impliquée dans la localisation subcytoplasmique d'ARNm lors de l'embryogenèse (Nielsen et al., 1999). Se pourrait-il qu'une synthèse d'actines soit effectuée localement sur le phagosome ? Pourtant, il est connu que le revêtement d'actine est éliminé lors de la maturation du phagosome (Aderem et Underhill, 1999). De ce fait, il serait peu probable qu'une nouvelle synthèse d'actine ait lieu lors de la maturation du phagosome, dans le but d'enrichir la membrane de cet organelle. Toutefois, il se pourrait que des granules d'ARNm puissent intervenir dans la synthèse locale de filaments d'actines lors de la formation du phagosome et que certaines protéines provenant des granules d'ARNm demeurent associées au phagosome quelque temps lors de sa maturation. Car, une autre protéine également présente dans notre protéome, EF1 α fut démontrée pour fixer des ARNm de β -actine à des filaments d'actines (Condeelis et Singer, 2005).

Évidemment, nous n'avons pas identifié par spectrométrie de masse l'ensemble des 42 protéines présentées dans l'étude de Kanai et ses collègues. Cependant, il se pourrait tout aussi bien que certaines protéines n'aient pu être identifiées dans notre analyse, mais aussi que le contenu protéique des granules de transport d'ARNm diffère entre les deux espèces. Il sera donc nécessaire de

vérifier si certaines de ces protéines sont enrichies au niveau du phagosome de la drosophile. Pour se faire, des anticorps seront développés contre certaines protéines des granules d'ARNm chez la drosophile, dont les protéines CGI-99 et FMR1.

CONCLUSION

Suite à notre étude protéomique et bioinformatique de la phagocytose chez la mouche à fruits *Drosophila melanogaster*, nos résultats ont démontré que nous avons adapté adéquatement la méthode d'isolation de phagosome par billes de latex qui fut premièrement développé chez la souris. Cette technique nous a permis de générer des échantillons de phagosomes isolés d'une excellente pureté, puisqu'ils sont dépourvus de contaminants nucléaires et mitochondriaux. Ces échantillons ont ensuite été soumis à une analyse protéomique par spectrométrie de masse. Les résultats de cette analyse protéomique nous ont permis d'identifier un total de 617 protéines et nous évaluons qu'environ 17 % de ces protéines seraient considérées comme inconnues. Par la suite, nous avons effectué une analyse bioinformatique des domaines transmembranaires qui nous a révélé que 80 % de notre protéome est constitué de protéines dépourvues de domaines transmembranaires. Ces données s'accordent avec l'image dynamique attribuée au phagosome, lors de sa maturation au sein de la voie endo-lysosomale. De plus, l'organisation de notre protéome, et de ses orthologues attribués, nous a permis de développer cinq modèles moléculaires virtuels. Ces modèles moléculaires font état de fonctions hypothétiques qui seraient associées au phagosome, dont la fusion d'endosome, l'exocytose, la fusion du réticulum endoplasmique et le transport ciblé d'ARNm. D'ailleurs, l'investigation de ces modèles hypothétiques est d'or et déjà en cours.

À travers cette étude, nous avons innové la méthode d'analyse de résultats protéomiques d'un organelle en associant la bioinformatique à la protéomique. Par cette méthode nous avons pu développer de nombreuses et nouvelles hypothèses biologiques qui seront validées par des analyses biochimiques futures. De plus, l'approche informatique que nous avons utilisée s'est révélée forte efficace, puisqu'elle nous a permis d'étendre l'amplitude de nos analyses avec efficacité, rapidité et rigueur.

En terminant, la suite de ce projet devrait faire l'objet de nombreuses expériences. Entre autres, il serait intéressant d'étudier les implications des protéines inconnues lors de la phagocytose. Aussi, il serait désormais possible d'effectuer l'étude évolutive de la phagocytose en comparant par informatique les protéomes des phagosomes de l'amibe *Dictyostelium discoideum*, de la drosophile et de la souris, afin de déterminer le « bloc primitif fixe » de la phagocytose. Aussi, il serait très intéressant de vérifier si un transport d'ARNm s'effectue vers le phagosome, par l'entremise des granules d'ARNm et de déterminer qu'elles sont les protéines qui y seraient synthétisées. L'exocytose du phagosome serait aussi un autre champ d'intérêt par l'étude de l'implication du complexe de l'« exocyst » au niveau du phagosome, d'autant plus que ce complexe semble absent chez le phagosome de la souris. Enfin, pour élargir l'étendue informative de notre protéome, il serait aussi possible de mettre en relation nos données

protéomiques du phagosome de la drosophile à celles de l'intéreactome protéique de la drosophile.

BIBLIOGRAPHIE

- Aderem, A. et Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 17, 593-623. 1999.
- Albert, M. L., Kim, J. I., et Birge, R. B. α v β 5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat.Cell Biol.* 2[12], 899-905. 2000.
- Amarilio, R., Ramachandran, S., Sabanay, H., et Lev, S. Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *J.Biol.Chem.* 280[7], 5934-5944. 2-18-2005.
- Asgari, S. et Schmidt, O. Is cell surface calreticulin involved in phagocytosis by insect hemocytes? *J.Insect Physiol* 49[6], 545-550. 2003.
- Bairoch, A. et Apweiler, R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* 28[1], 45-48. 1-1-2000.
- Becker, T., Volchuk, A., et Rothman, J. E. Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102[11], 4022-4026. 3-15-2005.
- Braun, A., Hoffmann, J. A., et Meister, M. Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95[24], 14337-14342. 11-24-1998.
- Brennan, C. A. et Anderson, K. V. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu.Rev.Immunol.* 22, 457-483. 2004.
- Brunet, S., Thibault, P., Gagnon, E., Kearney, P., Bergeron, J. J., et Desjardins, M. Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol.* 13[12], 629-638. 2003.
- Buczynski, G., Grove, B., Nomura, A., Kleve, M., Bush, J., Firtel, R. A., et Cardelli, J. Inactivation of two *Dictyostelium discoideum* genes, DdPIK1 and DdPIK2, encoding proteins related to mammalian phosphatidylinositide 3-kinases, results in defects in endocytosis, lysosome to postlysosome transport, and actin cytoskeleton organization. *J.Cell Biol.* 136[6], 1271-1286. 3-24-1997.
- Cannon, G. J. et Swanson, J. A. The macrophage capacity for phagocytosis. *J.Cell Sci.* 101 (Pt 4), 907-913. 1992.

Caron, E. et Hall, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282[5394], 1717-1721. 11-27-1998.

Clarke, M., Kohler, J., Arana, Q., Liu, T., Heuser, J., et Gerisch, G. Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of *Dictyostelium* cells. *J.Cell Sci.* 115[Pt 14], 2893-2905. 7-15-2002.

Condeelis, J. et Singer, R. H. How and why does beta-actin mRNA target? *Biol.Cell* 97[1], 97-110. 2005.

Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F., et Cosson, P. Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J.Biol.Chem.* 275[44], 34287-34292. 11-3-2000.

Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat.Rev.Immunol.* 3[4], 280-291. 2003.

Desjardins, M. et Griffiths, G. Phagocytosis: latex leads the way. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15[4], 498-503. 2003.

Dumontier, M., Hocht, P., Mintert, U., et Faix, J. Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J.Cell Sci.* 113 (Pt 12), 2253-2265. 2000.

Ellis, R. E., Jacobson, D. M., et Horvitz, H. R. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129[1], 79-94. 1991.

Elrod-Erickson, M., Mishra, S., et Schneider, D. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr.Biol.* 10[13], 781-784. 6-29-2000.

Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J., et Ezekowitz, R. A. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity.* 4[5], 431-443. 1996.

Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A., et White, K. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* 284[5422], 1991-1994. 6-18-1999.

Franc, N. C. et White, K. Innate recognition systems in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. *Microbes.Infect.* 2[3], 243-250. 2000.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J., et Desjardins, M. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110[1], 119-131. 7-12-2002.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., et Desjardins, M. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J.Cell Biol.* 152[1], 165-180. 1-8-2001.

Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C. A., Finley, R. L., Jr., White, K. P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R. A., McKenna, M. P., Chant, J., et Rothberg, J. M. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302[5651], 1727-1736. 12-5-2003.

Grafstein, B. et Forman, D. S. Intracellular transport in neurons. *Physiol Rev.* 60[4], 1167-1283. 1980.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., et Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 20, 621-667. 2002.

Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Sjolín, C., Schreiber, A. D., Trimble, W. S., et Grinstein, S. v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95[20], 11691-11696. 9-29-1998.

Hedgecock, E. M., Sulston, J. E., et Thomson, J. N. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220[4603], 1277-1279. 6-17-1983.

Hickman, P., Roberts, L. S., and Larson, A. (2001). *Integrated principles of zoology*. (New York: McGraw-Hill).

Hoeppner, D. J., Hengartner, M. O., et Schnabel, R. Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 412[6843], 202-206. 7-12-2001.

Holthuis, J. C., van Riel, M. C., et Martens, G. J. Translocon-associated protein TRAP delta and a novel TRAP-like protein are coordinately expressed with pro-opiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. *Biochem.J.* 312 (Pt 1), 205-213. 11-15-1995.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., et Desjardins, M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425[6956], 402-406. 9-25-2003.

Hultmark, D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr.Opin.Immunol.* 15[1], 12-19. 2003.

Irving, P., Troxler, L., et Hetru, C. Is innate enough? The innate immune response in *Drosophila*. *C.R.Biol.* 327[6], 557-570. 2004.

Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 54 Pt 1, 1-13. 1989.

Job, C. et Eberwine, J. Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat.Rev.Neurosci.* 2[12], 889-898. 2001.

Kanai, Y., Dohmae, N., et Hirokawa, N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43[4], 513-525. 8-19-2004.

Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., et Rock, K. L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90[11], 4942-4946. 6-1-1993.

Lavine, M. D. et Strand, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 32[10], 1295-1309. 2002.

Leippe, M. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Dev.Comp Immunol.* 23[4-5], 267-279. 1999.

Mallat, M., Marin-Teva, J. L., et Cheret, C. Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr.Opin.Neurobiol.* 15[1], 101-107. 2005.

Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., et Nakanishi, Y. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J.Biol.Chem.* 279[46], 48466-48476. 11-12-2004.

Mangahas, P. M. et Zhou, Z. Clearance of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *Semin.Cell Dev.Biol.* 16[2], 295-306. 2005.

Marin-Teva, J. L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen N., et Mallat, M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41[4], 535-547. 2-19-2004.

Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J. C., et Chavrier, P. Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J.* 17[21], 6219-6229. 11-2-1998.

Moller, S., Croning, M. D., et Apweiler, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* 17[7], 646-653. 2001.

Morris, R., Cox, H., Mombelli, E., et Quinn, P. J. Rafts, little caves and large potholes: how lipid structure interacts with membrane proteins to create functionally diverse membrane environments. *Subcell.Biochem.* 37, 35-118. 2004.

Muller-Taubenberger, A., Lupas, A. N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E., et Gerisch, G. Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* 20[23], 6772-6782. 12-3-2001.

Nielsen, H. et Krogh, A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc.Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.* 6, 122-130. 1998.

Nielsen, J., Christiansen, J., Lykke-Andersen, J., Johnsen, A. H., Wewer, U. M., et Nielsen, F. C. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol.Cell Biol.* 19[2], 1262-1270. 1999.

Nielsen, J., Cilius, Nielsen F., Kragh, Jakobsen R., et Christiansen, J. The biphasic expression of IMP/Vgl-RBP is conserved between vertebrates and *Drosophila*. *Mech.Dev.* 96[1], 129-132. 2000.

- Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O., et Ui, M. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J.Biol.Chem.* 269[36], 22732-22737. 9-9-1994.
- Pearson, A., Lux, A., et Krieger, M. Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92[9], 4056-4060. 4-25-1995.
- Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., et Ezekowitz, R. A. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 416[6881], 644-648. 4-11-2002.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., et Ezekowitz, R. A. *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity*. 15[6], 1027-1038. 2001.
- Reddien, P. W., Cameron, S., et Horvitz, H. R. Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature* 412[6843], 198-202. 7-12-2001.
- Reddien, P. W. et Horvitz, H. R. The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 20, 193-221. 2004.
- Reichhardt, T. It's sink or swim as a tidal wave of data approaches. *Nature* 399[6736], 517-520. 6-10-1999.
- Ren, Y. et Savill, J. Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death.Differ.* 5[7], 563-568. 1998.
- Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E. H., Taneja, K. L., et Singer, R. H. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol.Cell Biol.* 17[4], 2158-2165. 1997.
- Rupper, A. et Cardelli, J. Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim.Biophys.Acta* 1525[3], 205-216. 3-15-2001.
- Rupper, A., Grove, B., et Cardelli, J. Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J.Cell Sci.* 114[Pt 13], 2449-2460. 2001.
- Rupper, A., Lee, K., Knecht, D., et Cardelli, J. Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in *Dictyostelium*. *Mol.Biol.Cell* 12[9], 2813-2824. 2001.

Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., et Haslett, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat.Rev.Immunol.* 2[12], 965-975. 2002.

Scott, C. C., Botelho, R. J., et Grinstein, S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J.Membr.Biol.* 193[3], 137-152. 6-1-2003.

Seastone, D. J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G., et Cardelli, J. The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol.Biol.Cell* 10[2], 393-406. 1999.

Shibatani, T., David, L. L., McCormack, A. L., Frueh, K., et Skach, W. R. Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry* 44[16], 5982-5992. 4-26-2005.

Souza, G. M., Mehta, D. P., Lammertz, M., Rodriguez-Paris, J., Wu, R., Cardelli, J. A., et Freeze, H. H. *Dictyostelium* lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J.Cell Sci.* 110 (Pt 18), 2239-2248. 1997.

Steinert, M., Leippe, M., et Roeder, T. Surrogate hosts: protozoa and invertebrates as models for studying pathogen-host interactions. *Int.J.Med.Microbiol.* 293[5], 321-332. 2003.

Stuart, L. M. et Ezekowitz, R. A. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.* 22[5], 539-550. 2005.

Swanson, J. A. et Hoppe, A. D. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J.Leukoc.Biol.* 76[6], 1093-1103. 2004.

Vilmos, P. et Kurucz, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol.Lett.* 62[2], 59-66. 1998.

Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H., et Steinhart, R. Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J.Cell Biol.* 86[2], 456-465. 1980.

Vollbrandt, T., Willkomm, D., Stossberg, H., et Kruse, C. Vigilin is co-localized with 80S ribosomes and binds to the ribosomal complex through its C-terminal domain. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 36[7], 1306-1318. 2004.

Wang, X., Wu, Y. C., Fadok, V. A., Lee, M. C., Gengyo-Ando, K., Cheng, L. C., Ledwich, D., Hsu, P. K., Chen, J. Y., Chou, B. K., Henson, P., Mitani, S., et Xue, D. Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12. *Science* 302[5650], 1563-1566. 11-28-2003.

Weir, M. L., Xie, H., Klip, A., et Trimble, W. S. VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 286[3], 616-621. 8-24-2001.

Wiedmann, B. et Prehn, S. The nascent polypeptide-associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane. *FEBS Lett.* 458[1], 51-54. 9-10-1999.

Zhou, Z., Mangahas, P. M., et Yu, X. The genetics of hiding the corpse: engulfment and degradation of apoptotic cells in *C. elegans* and *D. melanogaster*. *Curr.Top.Dev.Biol.* 63, 91-143. 2004.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Michel Desjardins pour m'avoir accordé sa confiance en m'assignant un projet aussi jeune et prometteur.

Merci à tous mes collègues du labo (Annie, Guillaume, Isabelle, Luc, Étienne, Christianne, Sophie, Pascale, Frank, Mathieu et Sylvain) qui ont su m'endurer malgré ma musique et un gros merci pour vos discussions.

À mes parents, à ma sœur ti-bro et Mélissa pour votre soutien particulier et vos encouragements, merci énormément.

À tous mes amis pour m'avoir changé les idées et pour m'avoir permis de regarder la science sous un autre angle.

Enfin, à travers tout ce que nous avons passé ensemble, Sylvain, j'aimerais te remercier tout particulièrement pour l'ensemble des connaissances que tu m'as transmises, et ce, avec ta bonne humeur quotidienne. Tu as été comme un père avec moi. Je ne pourrai jamais oublier nos folles nuits à sacrer et à s'exclamer devant une simple base de données. Nous sommes parties de loin, mais désormais, tu n'as plus le droit d'oublier le « DISTINCT » dans tes requêtes !