

Le Trafic Membranaire au cours de
la Phagocytose : Régulation par la
Phospholipase D et les GTPases Ral

Soutenue publiquement le 15 novembre 2007

Membres du jury :

Jan De MEY, Professeur ULP - Rapporteur Interne

Pierre CHARDIN, DR2, HdR - Rapporteur Externe

Florence NIEDERGANG, CR1, HdR - Rapporteur Externe

Nancy J. GRANT, CR1, HdR - Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr **Marie-France Bader** pour l'accueil chaleureux dans son laboratoire et les nombreux conseils scientifiques au cours des réunions de travail, pauses café et pots de travaux qui ont échelonné ma thèse.

Je tiens également à remercier **Jan Demey, Pierre Chardin et Florence Niedergang**, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Mes remerciements spéciaux vont à **Nancy Grant** pour ces cinq années de sciences extrêmement satisfaisantes mais aussi pour sa patience à mon égard tant du point de vue scientifique qu'humain (j'essaierai d'être à l'heure à ma soutenance, promis... Elle est bien à prévue à 14h30 du matin, non ?). Je la remercie pour les nombreuses heures de discussions et de corrections ainsi que pour son aide quotidienne et sa patience ! Tu rieulaïze que ma thèse se termine ? j'espère pouvoir encore profiter de tes lumières et avoir encore quelques conversations (en anglais bientôt) quand je serai en post-doc. Thanks again !

Merci également à l'équipe de Marie-France Bader en général pour l'ambiance de travail et de détente. **Nicolas** pour son aide sur la PLD, **Sylvette** pour la microscopie et **Jarka** pour m'avoir accueilli dans le labo la première fois. **Gaby** pour son aide au jour le jour ainsi que son organisation méticuleuses et ses corrections soignées ("en effet, je crois qu'il en est ainsi"). **Tam** pour les coups de main avec la bio molle et ses hello! matinaux, la jeune **Valou** pour... sa bonne humeur le matin et les repas sérieux autours de discussions scientifiques importantes. Merci à tous **les autres thésards** du labo pour leur aide, leurs échanges et les soirées fructueuses que nous avons eu, en particulier Emeline et nos échanges de rédactions. Merci à **El Professor et Nanou** pour les longues discussions sur l'avenir des thésards et des porte-avions français...

Merci à **Stéph** pour les discussions scientifiques (on aura l'occasion de reparler d'endocytose je crois), la téquila et les tortillas, les rencontres du vendredi (puissent-elles vivent éternellement) et la Rothaus, les soirées vins, fromages *and all that jazz*..... Tiens, quand on parle de rencontres du vendredi, merci à **Fred** pour sa disponibilité, son toit à la vue inoubliable, les longues discussions scientifiques et philosophiques au coin de la table de l'épicerie et les rencontres du vendredi...

Un grand merci également à **Fanny** pour s'être assise à mon bureau... et pour son soutien et le reste... je sais... on est au labo là... ☺

Je tiens également à remercier les organismes et associations qui ont contribué au financement de ma thèse : Le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, la Fondation pour la Recherche Médicale qui a financé ma quatrième année de thèse et le DAAD (Office Allemand d'Echange Universitaire) qui m'a permis d'effectuer une collaboration de trois mois en Allemagne dans le laboratoire du Dr Rettig à Homburg.

Abbréviations :

ADP : adénosine diphosphate
ARF : ADP Ribosylation Factor
ARN : Acide ribonucléique
ARNi : acide ribonucléique interférence
AT : Acyltransferase
ATP : adénosine triphosphate
CA : constitutivement actif
CaM : Calmoduline
CLIP : Class II associated invariant chain peptide
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
COPII : coat protein II
CR : récepteur au complément
CRP : C-Reactive Protein
DAG : diacylglycérol
DGK : Diacylglycerol Kinase
DN : dominant négatif
EEA1 : Early Endosomal Antigen 1
FcR : Recpteur à la portion constante (Fc) des IgG
fMLP : formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FRET : Fluorescence R Energy Transfer
G3P : Glycérol 3 phosphate
GAP : GTPase activating protein
GDI : GDP Dissociation Inhibitor
GDP : guanosine diphosphate
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
GTP : guanosine triphosphate
IgG : immunoglobuline G
ITAM : Ig Tyrosine-based Activation Motif
LAMP : lysosomal associated membrane protein
LPA : acide lysophosphatidique
LPAAT : LPA acétyltransférase

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
PA : acide phosphatidique
PAP : Phosphatidic Acid Phosphatase
PC : Phosphatidylcholine
PDGF : Platelet derived Growth Factor
PDK1 : PI3 Kinase dependent kinase 1
PFA : Paraformaldéhyde
PH : Pleckstrin homology domain
PI(3)P : phosphoinositide phosphate
PI(3,4,5)P₃ : phosphoinositide triphosphate
PI(4,5)P₂ : phosphoinositide biphosphate
PKC : protéine kinase C
PLA : phospholipase A
PLC : Phospholipase C
PLD : Phospholipase D
PX : Phox Homology
Ral GDS : Ral GDP Dissociation Stimulator
RalBP1 : Ral Binding Protein 1
RCP : Rab Coupling Protein
RE : réticulum endoplasmique
SCAR : suppressor of cAMP receptor
SH2 : Src Homology domain 2
SNAP : synaptosome-associated protein
SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TAP : Transporter associated with Antigen Processing
TCR : récepteur des cellules T
TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence (fluorescence par onde évanescente)
VAMP : vésicle associated membrane protein
WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein
WT : wild type (sauvage)

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION GENERALE	3
I. Évolution des mécanismes et fonctions physiologiques de la phagocytose	5
1. Apparition de la phagocytose : la fonction nutritionnelle chez les amibes	7
2. La phagocytose chez <i>Ceanorhabditis elegans</i> : élimination de cellules apoptotiques dans le cadre du développement.	8
3. La phagocytose chez la drosophile : apparition de l'immunité innée.	9
4. La phagocytose chez les mammifères : extension des fonctions à l'immunité adaptative.	10
5. Conclusion	12
II. Mécanismes moléculaires de la phagocytose.	13
1. Modèle simplifié de la phagocytose	13
2. Récepteurs phagocytaires et déclenchement de la signalisation	15
3. Signalisation au début de la phagocytose	17
4. Réorganisation du cytosquelette d'actine	19
5. Recrutement de membrane au niveau du site de phagocytose	24
6. Fermeture et internalisation du phagosome	26
7. Maturation du phagosome et dégradation de la particule	27
8. Recyclage des particules internalisées et présentation de l'antigène	29
RESULTATS I	33
FONCTION ET DYNAMIQUE DE LA PHOSPHOLIPASE D AU COURS DE LA PHAGOCYTOSE	33
I. Introduction à la Phospholipase D	35
1. Structure de la PLD et synthèse du PA	35
2. Fonctions de la PLD	38
3. Régulateurs potentiels de la PLD	40
4. Objectifs	42
II. Résultats sur la Phospholipase D	43
III. Discussion sur le rôle de la PLD au cours de la phagocytose	45
1. Localisation de la PLD	45
2. Rôle du PA dans la signalisation	47
3. Un rôle dans la fusion de vésicules avec la membrane du phagosome ?	50
4. Conclusion	52

RESULTATS II	53
IMPLICATION DES GTPASES RAL DANS LA PHAGOCYTOSE	53
I. Introduction aux GTPases Ral	55
1. Structure des GTPases Ral.....	55
2. Activation des GTPases Ral	56
3. Fonctions cellulaires.....	57
4. Objectifs.....	60
II. Résultats sur les GTPases Ral	61
1. Présence et activation des GTPases Ral au cours de la phagocytose.....	61
2. Localisation et dynamique des GTPases Ral au cours de la phagocytose.....	62
3. Détermination des compartiments intracellulaires de RalA et RalB.....	65
4. Effet et localisation de différents mutants de RalA et RalB au cours de la phagocytose	68
5. Effet de la déplétion de RalA et RalB endogènes sur la phagocytose	70
6. L'exocyste, un effecteur potentiel de Ral au cours de la phagocytose.....	71
7. La PLD interagit avec les GTPases Ral au cours de la phagocytose	72
III. Discussion sur les GTPases Ral au cours de la phagocytose	74
1. Rôle des GTPases Ral au cours de la phagocytose	74
2. Localisation des GTPases Ral au cours de la phagocytose	75
3. Effecteurs potentiels du rôle négatif de RalB au cours de la phagocytose.....	75
4. Effecteurs potentiels du rôle positif de RalA au cours de la phagocytose	76
5. Conclusion	79
DISCUSSION GENERALE	81
1. Résultats et hypothèses de travail.....	83
2. Étude du trafic membranaire dans des cellules vivantes	85
3. Régulation du cytosquelette d'actine au cours de la phagocytose.	87
4. Régulation de l'apport de membrane	89
5. L'insertion de membrane compense l'internalisation du phagosome.....	90
6. Conclusions.....	95
ANNEXE	99
I. Annexe 1 : Ciesielski-Treska J et al., 2004	99
II. Annexe 2 : Matériels et méthodes relatifs à l'étude des GTPases Ral	101
1. Culture cellulaire	103

2. Anticorps.....	103
3. Plasmides	104
4. Clonage de RalA et RalB sauvages.....	104
5. Transfection des plasmides.....	105
6. ARN interférences.....	105
7. Préparation des billes couplées aux IgG et stimulation de la phagocytose	106
8. Etude des cellules vivantes	106
9. Immunomarquage.....	107
10. Microscopie confocale.....	107
11. Quantification de la phagocytose.....	107
12. Extraction de protéines	108
13. Activation des GTPases Ral endogènes	109
14. Immunoprécipitation de Sec8	109
15. Immunoprécipitation de la PLD1-HA et de la PLD2-HA.....	110
16. Immunorépliques.....	111
BIBLIOGRAPHIE	113

AVANT-PROPOS

Le trafic membranaire est nécessaire au bon fonctionnement des cellules et implique des interactions et le transport de protéines ou de lipides entre compartiments intracellulaires, la sécrétion de molécules de signalisation par exocytose de vésicules, ou encore l'internalisation de matériel extracellulaire par divers types de mécanismes comme l'endocytose, la macropinocytose ou encore la phagocytose. Divers lipides sont impliqués dans ce trafic intracellulaire de vésicules et permettent la mise en place de voies de signalisation, le recrutement et/ou l'activation de protéines ou encore la formation de plateformes au sein des membranes, les rafts lipidiques, qui participent à l'organisation de différents domaines de la membrane.

La phagocytose correspond à l'ingestion par une cellule de particules de grande taille par extension de la membrane plasmique qui forme le phagosome, une vacuole dans laquelle la particule sera dégradée. La phagocytose est impliquée dans des fonctions aussi diverses que la nutrition chez les amibes, le développement de l'organisme, l'homéostasie de l'environnement cellulaire ou encore l'immunité (Stuart and Ezekowitz, 2005). Au cours de mon DEA, j'ai eu pour but d'étudier les effets de fibrilles, formés par la protéine Prion pathologique, sur la phagocytose par des cellules microgliales, les macrophages résidents du système nerveux central. Nos observations ont montré que le processus de phagocytose était inhibé par ces fibrilles au stade de la fermeture du phagosome (Ciesielski-Treska et al., 2004). Dans le but de mieux comprendre la régulation de la phagocytose, nous nous sommes penchés sur l'exploration de ses mécanismes moléculaires et plus particulièrement sur l'implication de l'acide phosphatidique, un second messager lipidique, susceptible de participer à la signalisation lors de la formation du phagosome.

La première partie de mon introduction concernera l'évolution du mécanisme de phagocytose chez différentes espèces afin de montrer la pertinence de l'utilisation de chacune d'entre elles pour comprendre la phagocytose dans son ensemble. Les modèles choisis permettront de dessiner l'évolution des fonctions et des mécanismes impliqués dans la formation et la maturation du phagosome. Par la suite, je détaillerai plus précisément le déroulement de ce processus avec pour modèle la phagocytose de particules opsonisées soit par des immunoglobulines de type G, soit par le complément. En effet, ces deux voies de signalisation aboutissent à deux façons différentes d'internaliser des particules, l'une

procédant par extension de la membrane plasmique autour de la particule et l'autre par invagination de la membrane.

Je développerai ensuite l'introduction particulière, la présentation et la discussion des résultats obtenus au cours de ma thèse. **La première partie de mes travaux concerne l'implication de la Phospholipase D (PLD) et de son produit, l'acide phosphatidique (PA), au cours de la phagocytose** et son rôle potentiel dans le trafic membranaire et l'exocytose de vésicules au niveau du site de phagocytose. **La deuxième partie porte sur le rôle joué par la famille des petites GTPases Ral dans la régulation de la phagocytose.** En effet, les GTPases Ral sont connues pour leur rôle dans le trafic membranaire ou le réarrangement du cytosquelette d'actine (van Dam and Robinson, 2006). De plus, c'est un régulateur connu de la PLD (Kim et al., 1998), raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à cette famille de protéines. Nous avons cherché à mettre en évidence leur implication dans la phagocytose et la régulation de plusieurs de leurs effecteurs potentiels dont la PLD et le complexe de l'exocyste impliqué dans le recrutement de membrane dans divers types cellulaires (Moskalenko et al., 2002). Finalement, la dernière partie de ma thèse porte sur la discussion générale des résultats obtenus et de leur pertinence dans le contexte des connaissances actuelles sur les mécanismes de la phagocytose et le trafic membranaire.

INTRODUCTION GENERALE

I. Évolution des mécanismes et fonctions physiologiques de la phagocytose

Les bases fonctionnelles de la phagocytose ont été jetées par Elie Metchnikoff à partir de 1882 et ont contribué à la mise en place de la théorie cellulaire de l'immunité contre la théorie humorale. Les observations de Metchnikoff, biologiste du développement, l'ont amené à formuler sa théorie sur le rôle protecteur de la phagocytose dans des organismes pluricellulaires. En effet, au cours d'études sur le développement embryonnaire des organismes marins microscopiques, il a l'intuition, en observant "*des cellules mobiles d'une larve transparente d'étoile de mer, (...) que des cellules analogues devaient servir à la défense de l'organisme contre de nuisibles intrus*". Il réalise alors une expérience sur des larves d'étoiles de mer pendant laquelle il observe l'agrégation de cellules autour d'une épine qu'il introduit dans ces larves et met en évidence le phénomène de la phagocytose. Il pose l'hypothèse que la fonction du phagocyte passe de "manger pour se nourrir à manger pour protéger l'organisme" (Tauber, 2003). Cependant, sa théorie sur la phagocytose ne définit pas uniquement un rôle immunitaire pour les phagocytes. Pour Metchnikoff, l'organisme pluricellulaire est constitué de nombreuses cellules aux fonctions différentes en compétition entre elles pour augmenter leur importance au sein de l'organisme. Dans ce cadre, les phagocytes libres de leurs mouvements ont gardé une autonomie pluripotentielle et par leur mécanisme de dégradation de particules ainsi que par l'acquisition de nouvelles fonctions comme la protection de l'organisme contre les invasions ou l'élimination de débris cellulaires, les phagocytes participent à l'harmonisation de l'organisme (Tauber, 2003). Le phagocyte est vu par Metchnikoff comme une cellule libre de toute attache, dont la fonction est restée inchangée au cours de l'évolution avec pour rôle de maintenir l'intégrité de l'organisme, que ce soit en le nourrissant, en éliminant les parties inutiles ou en le protégeant des invasions extérieures. En 1908, Metchnikoff recevra le Prix Nobel de physiologie et de médecine pour ses travaux sur l'immunité et la phagocytose.

Avec l'établissement de cette théorie sur la phagocytose comme régulateur des dysfonctionnements ou des excès de l'organisme ainsi que des invasions, on remarque que la question du mécanisme de la phagocytose peut être traitée au-delà du modèle dans lequel on l'étudie. Étudier la phagocytose dans le cadre de l'immunité se révèle donc aussi pertinent que dans le cadre du développement ou au sein d'organismes unicellulaires. Les mécanismes fondamentaux qui amènent une cellule à internaliser une particule sont transposables à

différents modèles dans leurs grandes lignes même s'ils peuvent varier dans les détails (récepteurs et voies de signalisation différentes par exemple). C'est pourquoi, pour la première partie de cette thèse, j'ai choisi délibérément de discuter divers aspects de l'évolution des fonctions et des mécanismes de la phagocytose en prenant quelques exemples issus de l'étude d'organismes modèles en biologie.

Au cours de l'évolution, on constate que de nombreux mécanismes cellulaires sont conservés entre les organismes unicellulaires et les cellules formant des tissus aux fonctions spécifiques chez les organismes supérieurs. Une de ces fonctions cellulaires essentielles conservées, la phagocytose, permet l'internalisation et la dégradation de particules de taille supérieure à 0,5 micromètre. Cette fonction constitue un mécanisme vital à la mise en place des tissus lors du développement, à l'homéostasie de l'organisme en cas de morts cellulaires nombreuses, à l'élimination de synapses non fonctionnelles dans le système nerveux et bien sûr au bon fonctionnement du système immunitaire inné et de son dialogue avec l'immunité adaptative (Figure 1). Ces différentes fonctions et interactions intervenant chez les mammifères supérieurs dérivent de fonctions apparues au cours de l'évolution chez différentes espèces. Il est possible de retracer l'apparition de ces grandes évolutions du rôle de la phagocytose en se penchant sur différents organismes modèles importants en biologie tels que l'amibe *Dictyostelium discoïdeum*, le nématode *Ceanorhabditis elegans*, l'insecte *Drosophila melanogaster* et le mammifère. Les exemples cités n'ont pas pour but de présenter un état des lieux exhaustif des fonctions et mécanismes de la phagocytose dans ces différents modèles animaux et cellulaires, mais de présenter certaines fonctions physiologiques essentielles impliquant la phagocytose au cours de l'évolution.

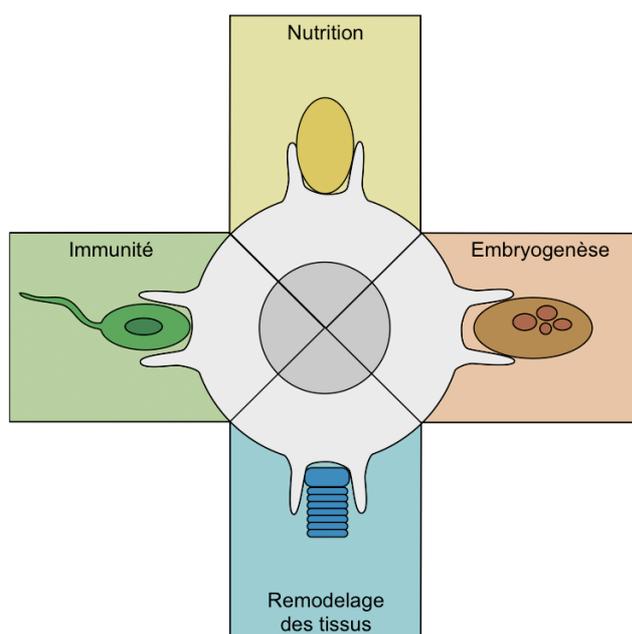


Figure 1 : Les différentes fonctions de la phagocytose acquises au cours de l'évolution (Desjardins et al., 2005).

1. Apparition de la phagocytose : la fonction nutritionnelle chez les amibes

Le premier rôle biologique de la phagocytose est un rôle nutritionnel. Les nutriments disponibles dans l'environnement pour des organismes unicellulaires comme *Dictyostelium discoideum* se présentent sous la forme de microorganismes qui doivent être ingérés puis dégradés et dont les éléments constitutifs pourront être recyclés par l'amibe pour son développement (Desjardins et al., 2005). Ce microorganisme eucaryote, dont le génome est largement connu, présente divers intérêts pour la biologie du développement ou la biologie cellulaire, notamment pour l'étude de la phagocytose. Dans la mesure où les principales étapes de la phagocytose sont présentes chez *Dictyostelium*, l'utilisation de ce modèle permet de distinguer les mécanismes de la phagocytose préservés au cours de l'évolution et ceux qui sont apparus *de novo* avec de nouvelles voies de régulation (pour revue voir (Rupper and Cardelli, 2001).

Dictyostelium est donc un modèle pertinent pour disséquer les cascades de signalisation et les acteurs intervenant au cours de l'internalisation d'une particule, comme c'est le cas de la régulation de l'actine (Janssen and Schleicher, 2001). En effet, l'utilisation d'agents pharmacologiques tels que cytochalasine ou latrunculine, qui détruisent le réseau d'actine, entraînent une baisse de l'internalisation de particules chez *Dictyostelium* (Lee et al., 2001). De plus, des équivalents des petites protéines G, connues pour leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine, sont présents chez *Dictyostelium* et ont pu être impliqués au cours de la phagocytose, révélant des similarités avec la régulation du cytosquelette d'actine chez les mammifères. Diverses isoformes peuvent jouer des rôles dans la formation de lamellipodes, s'accumulent au niveau de la cupule de phagocytose ou interviennent dans des étapes tardives de la phagocytose (Rupper and Cardelli, 2001). L'étude de *Dictyostelium* a également permis de définir des acteurs de la régulation du trafic membranaire nécessaire à la phagocytose, comme les GTPases Rab (Rupper and Cardelli, 2001; Rupper et al., 2001), ou encore la régulation de la fermeture du phagosome par l'activité contractile d'un homologue de la myosine VII (Titus, 1999). En tant que modèle génétique, *Dictyostelium* permet donc d'étudier divers acteurs moléculaires régulant les différentes étapes de la phagocytose conservées chez les mammifères.

2. La phagocytose chez *Ceanorhabditis elegans* : élimination de cellules apoptotiques dans le cadre du développement.

Après la mise en place du mécanisme moléculaire de base de la phagocytose chez *Dictyostelium*, on constate avec l'évolution des organismes pluricellulaires la complexification du phénomène de phagocytose. Cela s'accompagne d'abord d'une diversification des rôles de la phagocytose qui chez un organisme pluricellulaire ne permet plus de remplir la fonction nutritionnelle. La phagocytose est ainsi impliquée dans le remodelage des tissus au cours du développement chez *C. elegans*. En effet, au cours du développement de ce nématode, un certain nombre de cellules surnuméraires sont produites et nécessitent d'être éliminées. Ces éliminations se font en trois vagues successives. La première a lieu dès le début du développement pendant laquelle la moitié des cellules sont éliminées. La deuxième, au stade larvaire, permet la mort de neurones surnuméraires tandis que la dernière vague, à l'âge adulte, concerne les cellules germinatives (Lettre and Hengartner, 2006). On voit ici apparaître la notion de mort cellulaire programmée ou apoptose qui constitue la première étape avant l'élimination par ingestion de cellules inutiles à l'organisme. Par ailleurs, chez *C. elegans*, il n'existe pas encore de cellules spécialisées dans la phagocytose. En effet, les cellules apoptotiques sont éliminées par leurs voisines immédiates qui voient leur fonction évoluer avec l'apparition de signaux spécifiques "mangez moi" à la surface des cellules à ingérer. Par exemple, les cellules germinales surnuméraires sont éliminées par des cellules myoépithéliales environnantes suite à la mise en place de marqueurs spécifiques de la mort cellulaire programmée chez ces cellules germinales (Gumienny et al., 1999).

Un certain nombre de voies de signalisation ont été explorées dans le cadre de la phagocytose chez *C. elegans*. Ainsi le rôle dans l'élimination de cellules apoptotiques nécessite l'apparition de récepteurs spécifiques permettant la reconnaissance de ces cellules. Parmi les récepteurs potentiels identifiés, CED-1 est un homologue de récepteurs scavenger impliqués dans l'élimination de cellules apoptotiques (Zhou et al., 2001) et PSR-1 reconnaît la phosphatidylsérine, un lipide dont l'exposition sur la face externe des cellules est spécifique des cellules apoptotiques (Wang et al., 2003). Dans les deux cas, la signalisation déclenchée conduit à la réorganisation du cytosquelette d'actine, nécessaire à la formation du phagosome, par des voies impliquant des homologues de GTPases de la famille Rho, ainsi que diverses protéines jouant un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Mangahas and Zhou, 2005). *C. elegans* constitue donc un modèle intéressant pour l'étude de la phagocytose de

cellules apoptotiques, une fonction importante pour le remodelage des tissus ainsi que pour l'étude de nouveaux récepteurs impliqués dans cette fonction et dans la signalisation conduisant au réarrangement du cytosquelette d'actine.

3. La phagocytose chez la drosophile : apparition de l'immunité innée.

La drosophile constitue un modèle largement utilisé pour étudier la phagocytose. Chez la drosophile, la phagocytose participe, comme chez *C. elegans*, à l'élimination de cellules surnuméraires et au remodelage des tissus lors du développement de l'insecte (Bangs et al., 2000). Ce phénomène se complexifie avec l'apparition de nouveaux récepteurs comme la protéine Croquemort, identifiée dans ce processus (Franc et al., 1996). Mais avec la drosophile apparaît surtout la notion de défense immunitaire contre l'invasion et l'infection par des organismes étrangers, qui constitue une fonction nouvelle pour la phagocytose (Franc and White, 2000). Chez la drosophile, divers mécanismes existent pour éliminer des pathogènes ou parasites basés sur deux types de réponses immunes, humorale ou cellulaire (Lemaitre and Hoffmann, 2007). La réponse humorale se caractérise par la sécrétion de composés oxydant, toxiques pour les pathogènes, de peptides anti-microbiens ou d'opsonines qui constituent un facteur important de la régulation de la phagocytose de bactéries (Stroschein-Stevenson et al., 2006). La phagocytose constitue quant à elle la réponse cellulaire et permet l'élimination d'agents pathogènes grâce au développement de divers récepteurs spécifiques (Kurata et al., 2006; Lemaitre and Hoffmann, 2007). De plus, chez la drosophile, des cellules phagocytaires professionnelles, les hémocytes, remplissent les fonctions de remodelage des tissus et d'immunité (Wood and Jacinto, 2007).

Par ailleurs, bien que peu d'études se soient penchées spécifiquement sur la régulation de l'actine et du trafic membranaire au cours de la phagocytose chez la drosophile, des études génétiques ont permis d'impliquer certains acteurs dans ce phénomène. Des régulateurs du réarrangement du cytosquelette d'actine tels que les GTPases de la famille Rho, D-SCAR, un régulateur du complexe Arp2/3 de nucléation de l'actine ou la Profilin, un régulateur de la polymérisation de l'actine (Pearson et al., 2003), ainsi que des acteurs impliqués dans le trafic vésiculaire tel que les protéines SNARE semblent être nécessaires à la régulation de la phagocytose chez la drosophile, comme le montre l'utilisation d'ARN interférences dirigés contre ces protéines (Stroschein-Stevenson et al., 2006). Des études disséquant le génome de

la drosophile ont donc permis de montrer la complexité des modes de régulation de la phagocytose chez la drosophile qui représente un modèle génétique important.

4. La phagocytose chez les mammifères : extension des fonctions à l'immunité adaptative.

Au cours de l'évolution, la phagocytose a donc acquis de nouvelles fonctions et voies de signalisation permettant de réguler l'internalisation de divers types de particules, fonctions qui s'étendent encore chez les mammifères. En effet, chez les mammifères, la phagocytose participe au remodelage des tissus au cours du développement comme chez *C. elegans*. Elle permet, par exemple, d'éliminer les cellules mortes par apoptose lors de la formation des organes au cours du développement de l'embryon (Penaloza et al., 2006) ou encore les neurones surnuméraires n'établissant pas de connexions efficaces avec d'autres neurones dans le système nerveux central (Mallat et al., 2005). De plus, la phagocytose joue également un rôle dans l'élimination de débris cellulaires et de cellules nécrotiques en cas de blessure (Krysko et al., 2006) ainsi que dans l'ingestion de pathogènes dans le cadre de l'immunité innée, comme c'est le cas chez la drosophile (Govind and Nehm, 2004). Enfin, elle participe à l'élaboration de l'immunité adaptative.

Chez les mammifères, de nombreux types cellulaires sont capables d'effectuer la phagocytose, la plupart étant issus de la lignée hématopoïétique. En exemple, on peut citer les macrophages, cellules circulatoires spécialisées dans la phagocytose d'agents pathogènes éliminés par le système immunitaire inné (Bosque et al., 1997), les cellules dendritiques, spécialisées dans la présentation de l'antigène et le déclenchement de la réponse immune adaptative (Blander and Medzhitov, 2006) ou encore les cellules microgliales, les macrophages résidents du système nerveux central qui jouent un rôle dans l'élimination de neurones morts, de plaques amyloïdes pendant certaines maladies neurodégénératives ou encore d'agents pathogènes ayant traversé la barrière hématoencéphalique (Gehrmann et al., 1995).

La régulation du système immunitaire acquis ou adaptatif permet de générer une réponse immune adaptée au type de pathogène. Une partie de la réponse immune adaptative est générée grâce à l'apprêtement de peptides antigéniques à partir des particules internalisées et dégradées au cours de la maturation du phagosome dans des cellules phagocytaires. La présentation de ces peptides antigéniques à la surface des cellules par le complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH) permet une interaction avec différents types de cellules immunitaires qui entraînent l'activation de la réponse adaptative en fonction du type de CMH impliqué. Le CMH de classe I permet de recycler des antigènes à partir de cellules du soi infectées, cancéreuses ou nécrosées, tandis que le CMH de classe II a pour rôle de présenter les antigènes issus de la dégradation de pathogènes (bactéries, champignons,...). La voie du CMH de classe I permet l'activation de cellules T CD8 positives, cytotoxiques qui s'attaquent alors à toutes les cellules infectées présentant l'antigène (Flutter and Gao, 2004). Dans le cas du CMH de classe II, la présentation de l'antigène déclenche l'activation de cellules T CD4 positives qui prolifèrent et sécrètent des cytokines permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires (Al-Daccak et al., 2004). L'interaction entre la voie de dégradation des particules phagocytées et la voie de synthèse issue du réticulum endoplasmique (pour le mécanisme voir page 29) permet donc l'assemblage de ces complexes CMH-antigène qui, une fois dirigés vers la membrane plasmique, entraînent l'activation de cellules T et le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptée. Ces interactions constituent une fonction nouvelle de la phagocytose.

On peut noter également l'apparition de nouveaux types de récepteurs phagocytaires qui entraînent l'internalisation de particules opsonisées comme par exemple les FcR, qui lient la portion constante des immunoglobulines, protéines d'opsonisation spécialisées dans la reconnaissance d'antigènes exogènes. Les immunoglobulines jouent un rôle important dans la protection face aux infections en stimulant la phagocytose des particules qu'elles recouvrent (Nimmerjahn and Ravetch, 2006). Le facteur du complément correspond à une autre forme d'opsonisation développée chez les mammifères bien que des équivalents sont déjà présents dans le système immunitaire de la drosophile (Stroschein-Stevenson et al., 2006). Les cellules phagocytaires de mammifères expriment des récepteurs au complément (CR) qui permettent de déclencher la phagocytose de particules opsonisées impliquant une voie de régulation du cytosquelette différente de celle déclenchée par les FcR (Castellano et al., 2001). On observe donc une complexification des fonctions immunitaires de la phagocytose par l'apparition de divers types de phagocytes professionnels, de nouveaux récepteurs et de nouvelles voies de signalisation et de maturation du phagosome, impliqués dans divers types de régulation de l'immunité adaptative.

5. Conclusion

Pour conclure sur l'évolution des mécanismes et des fonctions de la phagocytose, on peut dire que rien ne se perd, tout se transforme. En effet, les principaux mécanismes moléculaires n'ont pas été écartés par l'évolution mais au contraire améliorés, avec l'apport d'une régulation plus fine, l'implication de nouveaux récepteurs, voies de signalisation ou compartiments dans la formation et la maturation du phagosome. De plus, les fonctions physiologiques de la phagocytose ont également évolué, participant à l'organisation des tissus, l'homéostasie ou les mécanismes de défense. Les capacités de dégradation des particules internalisées, acquises avec la fonction de nutrition, ont ainsi pu être utilisées successivement pour la dégradation de cellules surnuméraires, de pathogènes ou pour la formation de voies de signalisation nouvelles avec la production de peptides antigéniques.

II. Mécanismes moléculaires de la phagocytose.

La persistance du processus de phagocytose au cours de l'évolution implique la nécessité de maintenir les principaux mécanismes moléculaires nécessaires à la phagocytose. Les nombreuses études sur ces mécanismes ont donc permis de construire un modèle assez complet du phénomène de phagocytose le séparant en différentes séquences largement conservées, quel que soit l'organisme ou le type cellulaire étudiés. Ces étapes peuvent cependant varier en fonction du type de récepteur déclenchant la phagocytose. En raison des nombreux types de récepteurs existant et de leurs interactions possibles au cours de la régulation de la phagocytose, j'ai choisi de décrire les voies de signalisation et les mécanismes déclenchés par deux types de récepteurs largement étudiés et qui présentent quelques différences intéressantes dans la mise en place de la phagocytose, le récepteur FcR et le récepteur CR3 au complément.

1. Modèle simplifié de la phagocytose

La phagocytose étant un mécanisme d'internalisation de particules de tailles importantes, les étapes qui mènent à cette internalisation nécessitent des réarrangements massifs de divers compartiments cellulaires afin d'aboutir à la formation d'un compartiment supplémentaire de grande taille dans lequel la particule sera enfermée, dégradée puis éventuellement recyclée. Ces mécanismes se déroulent en plusieurs étapes successives (Figure 2). La première consiste en la reconnaissance de la particule par des récepteurs membranaires. De nombreux types de ligands et de récepteurs ont été impliqués dans la phagocytose. Parmi les ligands, on compte par exemple des motifs consensus à la surface des bactéries, des protéines et des débris cellulaires, des composés spécifiques des cellules apoptotiques ou encore l'interaction avec des particules inertes comme les billes de latex. Les récepteurs quant à eux correspondent plus ou moins spécifiquement aux différents ligands connus et peuvent agir seuls ou en interaction (Stuart and Ezekowitz, 2005). Cette étape déclenche la signalisation intracellulaire qui conduit à la formation de pseudopodes, excroissance de la membrane plasmique entourant progressivement la particule à ingérer. Cette extension se fait sous l'impulsion du cytosquelette d'actine qui crée la force motrice poussant sur la membrane plasmique (Castellano et al., 2001). Cette extension s'accompagne aussi d'insertions de membranes issues de différents compartiments intracellulaires afin de maintenir la surface globale de la cellule, phénomène plus complexe que la vision de

Metchnikoff pour qui le phagosome dérivait exclusivement de la membrane plasmique. Cette insertion de membrane, ou exocytose focale, permet également de modifier la composition lipidique et protéique du phagosome jouant ainsi un rôle supplémentaire dans la signalisation au cours de la phagocytose (Niedergang and Chavrier, 2004). Lorsque les pseudopodes ont totalement entouré la particule, ils fusionnent grâce à un mélange d'activités contractiles et de réarrangements de la membrane (Araki, 2006). Le phagosome ainsi internalisé s'éloigne ensuite de la membrane plasmique pour rejoindre la région péri-nucléaire. Au cours de cette migration au sein de la cellule, le phagosome subit de nombreux réarrangements par interaction avec la voie endosomale, conduisant à la formation d'un phagolysosome caractérisé par une acidification et la présence d'enzymes de dégradation (Tjelle et al., 2000). Enfin, après dégradation de la particule, celle-ci sera recyclée de diverses façons en fonction du type cellulaire et de la particule ingérée, avec comme fonctions principales la nutrition de la cellule, l'élimination de pathogène et le recyclage de peptides pour la présentation de l'antigène nécessaire à l'immunité adaptative (Blander, 2007).

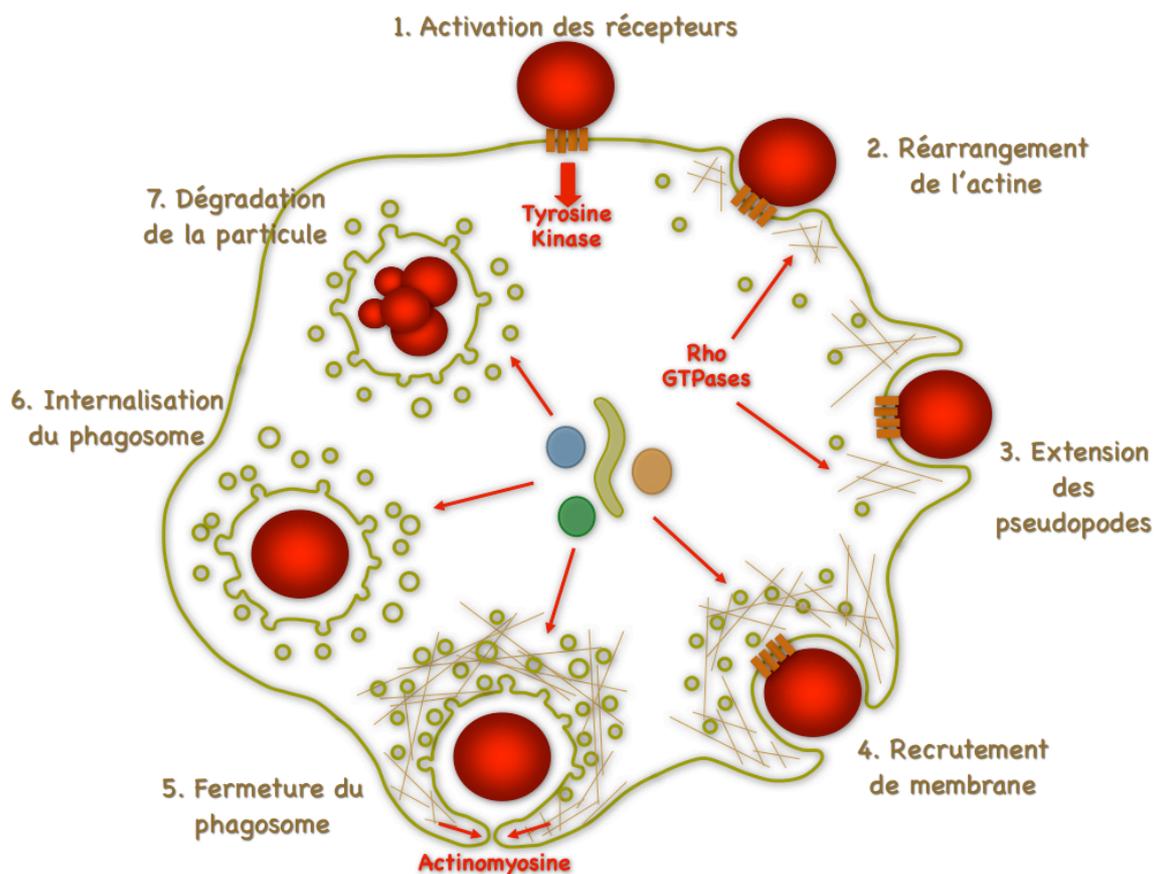


Figure 2 : Modèle simplifié des étapes de la phagocytose.

2. Récepteurs phagocytaires et déclenchement de la signalisation

La première étape concerne la reconnaissance et la liaison de la particule à la membrane de la cellule. Elle implique une grande diversité de récepteurs membranaires permettant d'interagir spécifiquement avec des motifs moléculaires consensus associés aux pathogènes (récepteurs scavenger, récepteur au mannose, lectines...), des motifs spécifiques de cellules apoptotiques (récepteur à la phosphatidylsérine) ou encore des opsonines sécrétées par le système immunitaire et recouvrant la particule ciblée (récepteurs au complément ou récepteur aux immunoglobulines) (Stuart and Ezekowitz, 2005). L'interaction entre ligands et récepteurs phagocytaires entraîne la signalisation par des protéines kinases.

Les récepteurs FcR reconnaissent la portion constante (Fc) des protéines de la superfamille des Immunoglobulines (Ig). Ces FcR sont transmembranaires et possèdent des domaines d'activation intracellulaires comportant des motifs spécifiques répétitifs nommés ITAM (pour Ig Tyrosine-based Activation Motif) dont la structure correspond à deux YxxL séparés par 7 résidus (Figure 3). On sépare les FcR à ITAM en deux catégories, les FcR comportant une sous-unité de liaison au ligand et une sous-unité intracytoplasmique de transduction du signal comportant un ou deux motifs ITAM et les FcR avec une seule unité comportant un seul ITAM avec 12 résidus séparant les séquences YxxL. On peut également sub-diviser les FcR en récepteurs de haute affinité (ou FcRI) et récepteurs de faible affinité (ou FcRII et FcRIII). Les premiers peuvent lier différents types d'Ig et permettent une transduction du signal dès la liaison d'une Ig tandis que les seconds se lient exclusivement aux IgG, et nécessitent la liaison d'un complexe d'IgG (par exemple agrégés autour d'une particule antigénique) afin de transmettre le signal (pour revue voir (Daeron, 1997)).

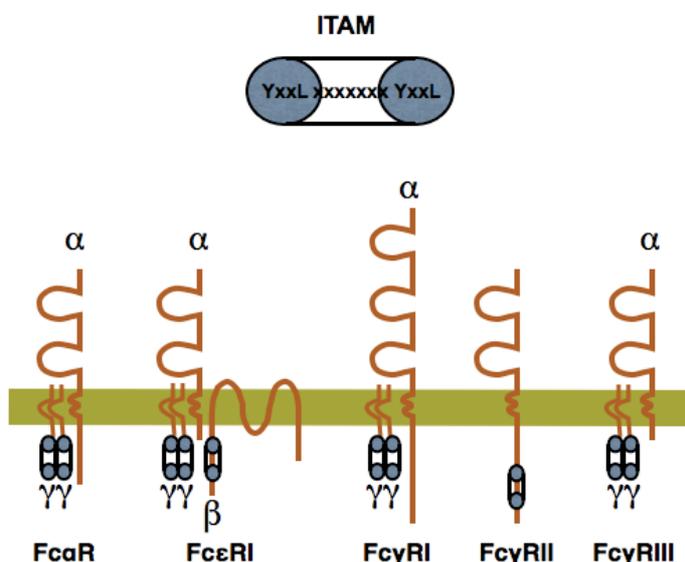


Figure 3 : Structure des récepteurs Fc (adapté de (Daeron, 1997)). Les différents récepteurs représentés dans ce schéma peuvent déclencher la phagocytose et lier différents types d'Ig. Les récepteurs FcγR se lient aux IgG tandis que les FcεR se lient aux IgE et les FcαR aux IgA.

Dans un premier temps, la liaison des immunoglobulines entraîne le regroupement des récepteurs phagocytaires à des fins de signalisation. Ce lien entre les récepteurs permet d'augmenter la liaison entre la particule et la membrane plasmique de la cellule mais aussi d'amplifier le signal intracellulaire par l'augmentation du nombre de récepteurs activés (Sobota et al., 2005). Ce mode de recrutement des récepteurs a été appelé "Zipper Model" en référence à l'analogie avec une fermeture éclair puisque les récepteurs seraient interconnectés au fur et à mesure du déploiement de la membrane plasmique autour de la particule. L'activation des récepteurs entraîne la phosphorylation des résidus tyrosine présents dans les motifs ITAM. Cette phosphorylation semble être dépendante de kinases de type Syk (Kiefer et al., 1998) et transforme les motifs ITAM en sites de liaison privilégiés recrutant d'autres kinases Syk par leur domaine SH2 et entraînant une cascade de phosphorylation de ces kinases (Agarwal et al., 1993; Benhamou et al., 1993; Kiener et al., 1993), amplifiant ainsi le signal.

De plus, l'agrégation des FcR est à la base de la transduction du signal au cours de la phagocytose. Il semble que la liaison du ligand au récepteur permette la phosphorylation rapide (15 secondes environ) des motifs ITAM mais ne soit pas suffisante pour maintenir la signalisation (Benhamou et al., 1993; Kiener et al., 1993). C'est donc la continuité de l'agrégation des récepteurs qui permettrait la transduction du signal comme le démontre l'agrégation de deux récepteurs entre eux par des haptènes monovalents qui entraînerait la phosphorylation des ITAM et leur déphosphorylation dans les cinq secondes suivantes, sans ajout du ligand (Paolini et al., 1991). Plus il y a de récepteurs agrégés au cours de la phagocytose, par exemple à cause de la liaison d'une particule de grande taille, plus la transduction du signal sera importante.

Les récepteurs au complément sont à l'origine d'une forme de phagocytose dont les voies de signalisation et les caractéristiques morphologiques sont différentes de la phagocytose par les FcR. Ces différences sont expliquées par la suite. Le complément C3, une protéine sécrétée opsonisant les particules, est reconnu par divers récepteurs cellulaires de la famille des récepteurs CR. CR3, un récepteur hétérodimérique (CD11b et CD18) transmembranaire de la famille des intégrines, est le plus étudié (van Lookeren Campagne et al., 2007). Il permet la phagocytose de particules par des cellules préalablement activées (esters de phorbol, cytokines). Cette activation semble être dépendante de la GTPase Rap1 dont l'activation constitutive affranchit la cellule d'un traitement préalable pour déclencher la

phagocytose par le récepteur CR (Caron et al., 2000). Par la suite, la liaison du ligand au récepteur entraîne l'activation de protéines tyrosine kinases et de la protéine kinase C (PKC), nécessaire à la phagocytose par le récepteur CR3 (Lutz and Correll, 2003; Makranz et al., 2004). En effet, la PKC entraîne notamment la phosphorylation de la sous-unité CD18 du récepteur CR3 qui permet le recrutement de l' α -actinine, une protéine régulant le réarrangement du cytosquelette d'actine. Contrairement au modèle "Zipper" impliquant le récepteur FcR, les récepteurs CR3 se présentent au niveau du site de phagocytose comme des points focaux peu nombreux et regroupant les protéines de signalisation entraînant le réarrangement des filaments d'actine.

3. Signalisation au début de la phagocytose

Dans un second temps, l'activation de la voie de signalisation de type tyrosines kinases de la famille Src/syk ou encore serine/threonine kinases (variable selon le type de récepteurs impliqués) permet la phosphorylation et le recrutement de protéines de signalisation (pour revue voir (Cox and Greenberg, 2001). Quel que soit le type de récepteur activé, il semble que les protéines tyrosine kinases soient importantes pour le déclenchement des voies de signalisation permettant l'activation et le recrutement de protéines de régulation de l'actine. Premier exemple, la protéine Vav, une GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) de Rac, est phosphorylée et recrutée par Src et permet ainsi le recrutement de Rac et le remodelage de l'actine dépendant de Rac (Cougoule et al., 2006). On trouve également des protéines liées à l'organisation des filaments d'actine comme la talin et la paxilin qui sont des protéines d'ancrage de l'actine au niveau de la membrane plasmique ou encore la coronin, découverte chez *Dictyostelium* (Maniak et al., 1995) et qui joue un rôle dans la liaison entre filaments d'actine et aussi leur polymérisation au cours de la phagocytose (Yan et al., 2005).

Un autre mode de régulation de l'activité et du recrutement de protéines impliquées dans la phagocytose consiste à modifier les micro-environnements lipidiques de la membrane du phagosome. Comme exemple, on peut citer la production ou la modification des différents types de phosphoinositides qui a été bien caractérisée au niveau spatial et temporel au cours de la phagocytose (Figure 4). Le PI(4,5)P₂ est présent dès la formation du phagosome tandis que le PI(3,4,5)P₃ s'accumule plus tardivement. Le PI(3)P semble être présent sur le phagosome après fusion des pseudopodes et internalisation. Ces variations de lipides du phagosome existent également chez *Dictyostelium* (Dormann et al., 2004). Le recrutement de

protéines comportant des domaines de liaison aux lipides (domaines PH, FYVE ou PX) peut donc se faire de façon précise au cours du temps et dans l'espace. Pour réguler la présence de ces lipides, il est nécessaire de moduler l'activité des enzymes permettant la phosphorylation ou la déphosphorylation des phosphoinositides.

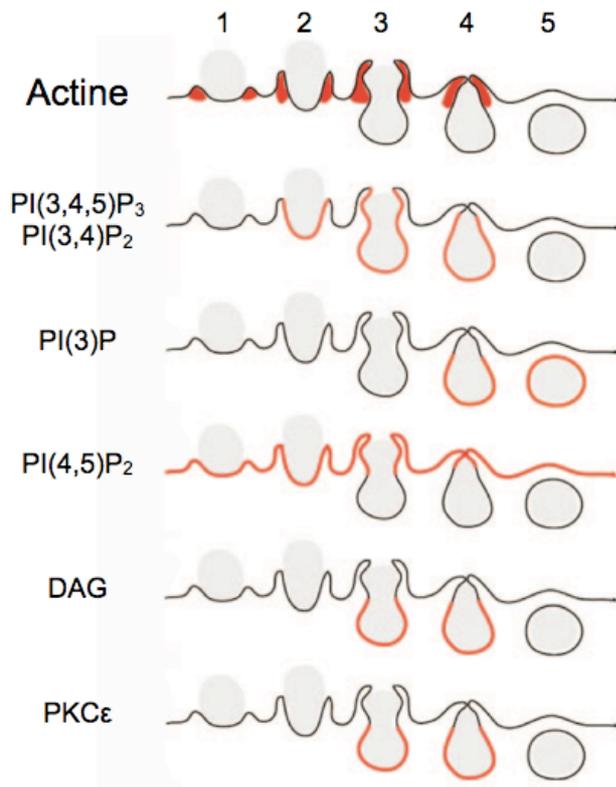


Figure 4 : Localisation de divers lipides de signalisation au cours de la phagocytose (Swanson and Hoppe, 2004). Divers domaines de liaison aux lipides couplés à des fluorophores permettant leur localisation ont permis de dessiner l'esquisse de la dynamique de ces lipides au cours des différentes étapes de la phagocytose. Ces étapes sont : 1) formation de la cupule de phagocytose, 2) extension et 3) rencontre des pseudopodes, 4) fusion des pseudopodes et fermeture du phagosome et finalement 5) internalisation du phagosome. Il est intéressant de noter que la PKCε et son activateur, le DAG, présentent le même patron de localisation.

Au cours des différentes étapes de la formation et l'internalisation du phagosome on retrouve différents environnements lipidiques au niveau de la membrane du phagosome. Dans un premier temps, alors que le PI(4,5)P₂ existe à un niveau basal à la membrane plasmique on enregistre une augmentation locale au niveau de la cupule de phagocytose due à l'activité de la PI(4)P5 Kinase (Coppolino et al., 2002). Le PI(4,5)P₂ pourrait jouer un rôle dans le réarrangement du cytosquelette d'actine nécessaire à la formation des pseudopodes (Scott et al., 2005). Ce PI(4,5)P₂ disparaît ensuite progressivement de la base du phagosome avant sa fermeture en corrélation avec la disparition d'actine filamentaire. Des protéines comprenant des domaines PH comme la gelsoline et la cofiline, qui jouent un rôle dans le réarrangement du cytosquelette d'actine, sont susceptibles d'être recrutées et/ou activées par leur liaison au PI(4,5)P₂. Dans un second temps, on constate que la disparition du PI(4,5)P₂ de la membrane du phagosome coïncide avec l'apparition de DAG (diacylglycerol) issu de l'activité de la

Phospholipase C (PLC) avant la fermeture du phagosome. Des protéines contenant des domaines C1 peuvent lier le DAG et être recrutées avec la même dynamique, comme la PKC (Figure 4) connue pour jouer un rôle au cours de la phagocytose (Larsen et al., 2000). Dans le même temps, il semblerait qu'une partie du PI(4,5)P₂ serait utilisé comme substrat de la PI(3) Kinase pour former du PI(3,4,5)P₃ capable également de recruter des protéines à domaines PH. Le PI(3,4,5)P₃ est produit également durant la formation du phagosome et disparaît après son internalisation. Le PI(3,4,5)P₃ pourrait jouer un rôle dans le recrutement de Btk une tyrosine kinase capable de phosphoryler la PLC dans le but de produire du DAG, ce qui placerait la PI(3) Kinase en amont de la PLC dans la production de DAG (Cantrell, 2001). Mais le PI(3,4,5)P₃ pourrait également réguler la présence et l'activation de protéines nécessaires à la réorganisation du cytosquelette durant la phagocytose comme la protéine WAVE qui permet la régulation du complexe Arp2/3 (Oikawa et al., 2004). Après fermeture et internalisation du phagosome, du PI(3)P pourrait être formé par l'activité de différents types de PI(3) Kinase (Vieira et al., 2001). Le PI(3)P, capable d'interagir avec des domaines FYVE et PX, pourrait être à l'origine du recrutement de EEA1 (Early Endosomal Antigen 1) un marqueur des endosomes précoces important pour la maturation du phagosome (Fratti et al., 2001), ou du complexe de la NADPH oxydase responsable de la production de radicaux libres oxygénés impliqués dans la destruction de pathogènes ingérés. Il apparaît ainsi que la réorganisation de la composition lipidique des membranes plasmiques et phagosomales est nécessaire à la séquence de recrutement et d'activation des différents acteurs de la signalisation au cours de la phagocytose. C'est en suivant l'adage que "rien ne se perd, tout se transforme" que les cellules recyclent les différents composés lipidiques séquentiellement afin de passer à l'étape suivante de la formation puis de la maturation du phagosome.

4. Réorganisation du cytosquelette d'actine

La voie de signalisation activée par les récepteurs phagocytaires conduit au remodelage du cytosquelette d'actine qui est à la base de la force motrice permettant la formation et l'internalisation du phagosome contenant la particule à ingérer. L'actine est une ATPase se présentant sous forme de monomères (actine G) principalement liés à l'ATP ou de polymères (actine F) principalement liés à l'ADP après hydrolyse de l'ATP. La polymérisation de l'actine est un phénomène dynamique régulé par différents types de protéines. La polymérisation de filaments *de novo* est facilitée par la nucléation d'actine G,

par exemple par le complexe Arp2/3 qui permet également de former des réseaux denses de filaments d'actine par liaison avec des filaments pré-existants (Figure 5).

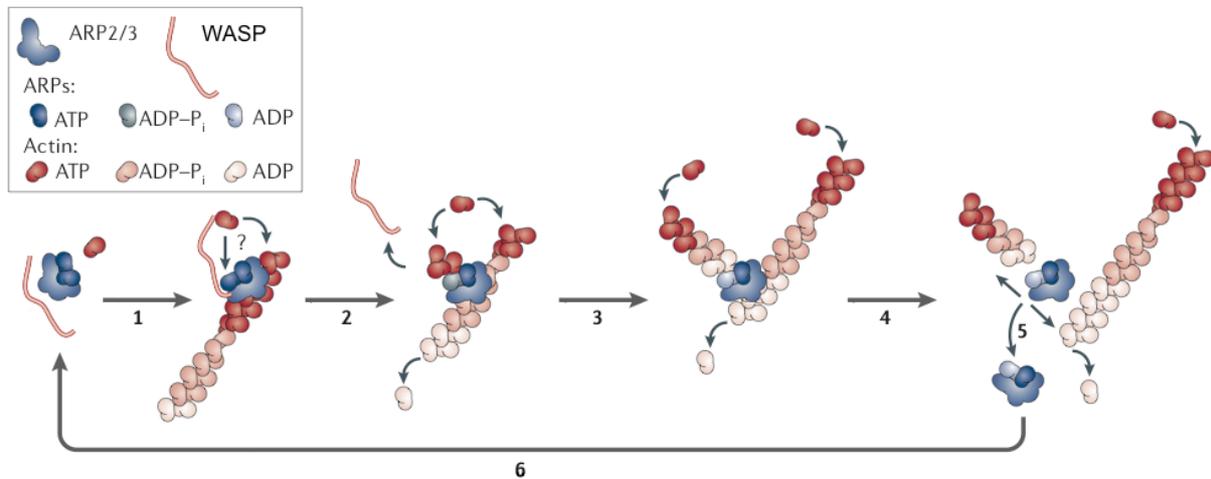


Figure 5 : Modèle de dynamique du complexe Arp2/3 et de la formation de filaments d'actine (Goley and Welch, 2006). En 1, la liaison avec la protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) permet l'activation du complexe et la liaison aux monomères d'actine formant un site de nucléation ou de branchement sur un filament pré-existant. En 2, WASP se dissocie du complexe Arp2/3 après nucléation. En 3 et 4, hydrolyse de l'ATP par Arp2 et élongation des filaments d'actine. En 5 et 6, dissociation du complexe Arp2/3 et de l'actine et recyclage du complexe par échange de l'ADP par l'ATP.

La dépolymérisation des filaments d'actine est facilitée par des protéines comme la cofiline qui augmente le recyclage de l'actine en monomères ainsi que par des protéines séquestrant l'actine G comme la thymosine, empêchant ainsi la polymérisation. La stabilisation des filaments d'actine F est régulée par des protéines comme la tropomyosine ou la tropomoduline qui couvre l'extrémité négative. Enfin, la formation de réseaux d'actine à partir de filaments est facilitée par des protéines comme la gelsoline capable de diviser des filaments en deux, permettant ainsi d'augmenter le nombre de filaments et par des protéines d'interaction entre filaments comme le complexe Arp2/3 qui joue également un rôle dans la nucléation de l'actine. La régulation de la dynamique de l'actine et ses acteurs est un phénomène assez bien caractérisé (voir la revue de (dos Remedios et al., 2003).

Le complexe Arp2/3 est régulé par des protéines de la famille WASP, elle-même dépendante de l'activation par des GTPases de la famille Rho qui constitue une première étape dans la signalisation permettant le réarrangement de l'actine lors de la phagocytose. Les GTPases de la famille Rho sont des interrupteurs moléculaires dont l'état d'activation est dépendant de leur liaison au GDP (état inactif) ou au GTP (état actif) et régulé par des protéines GAP (GTPase activating protein) et des GEF qui permettent aux GTPases de

d'alterner entre ces deux états, ainsi que par des GDI (GDP Dissociation Inhibitor) qui séquestrent les GTPases inactives (Figure 6).

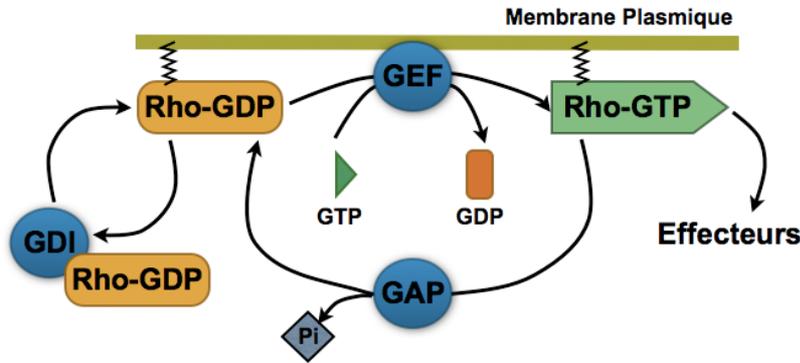


Figure 6 : Cycle d'activation des GTPases de la famille Rho (adapté de (Etienne-Manneville and Hall, 2002)).

Les petites GTPases RhoA, Rac et Cdc42 sont responsables de la polymérisation de l'actine au niveau du site de phagocytose, bien que différentes formes soient impliquées en fonction des étapes de la phagocytose ou des récepteurs activés (Caron and Hall, 1998; Massol et al., 1998). Cdc42 et Rac sont responsables de la polymérisation de l'actine au cours de la formation des pseudopodes dans la phagocytose issue des récepteurs FcR tandis que l'internalisation par l'intermédiaire des récepteurs CR3, qui n'implique pas d'extension de pseudopodes, est dépendante de RhoA (Figure 7).

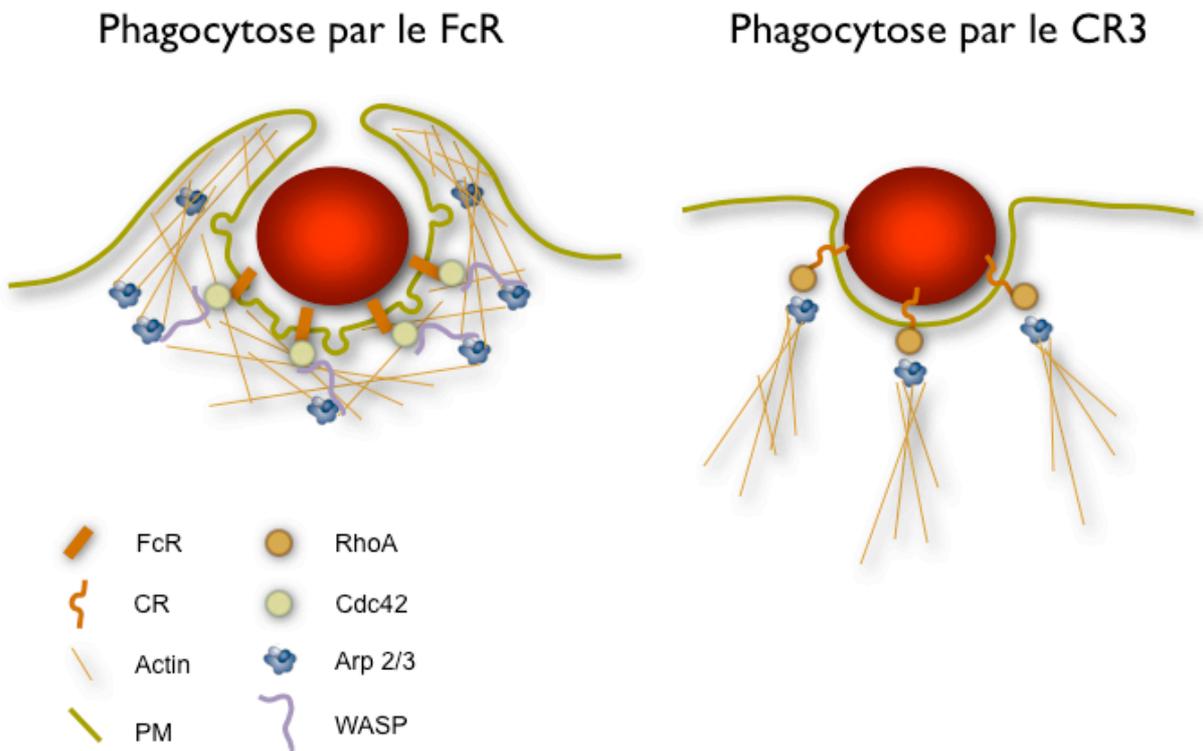


Figure 7 : Modèle de régulation de la formation de filaments d'actine au cours de la phagocytose par les récepteurs FcR et CR3 (adapté de (Castellano et al., 2001)). PM : membrane plasmique.

Dans le cas de l'activation du récepteur FcR, la signalisation conduisant à la réorganisation du cytosquelette d'actine est dépendante des GTPases Cdc42 et Rac et permet l'initiation et l'extension de pseudopodes membranaires autour de la particule phagocytée, aboutissant à la formation du phagosome. Vav, une GEF de Rac, est nécessaire à l'activation de Rac et à la phagocytose déclenchée par des récepteurs FcR et CR3 (Patel et al., 2002; Hall et al., 2006). La ou les GEF conduisant à l'activation de Cdc42 au cours de la phagocytose ne sont pour l'instant pas connues. Rac et Cdc42 semblent être responsables de la régulation de l'actine à différentes étapes de la phagocytose. L'extension des pseudopodes semble être régulée par l'activation de Cdc42 tandis que la fermeture du phagosome serait sous le contrôle de Rac ce qui est montré par des patrons d'activations différents au cours du phénomène (Figure 8) (Hoppe and Swanson, 2004). La régulation de l'actine est donc précise à la fois au niveau spatial et au niveau temporel.

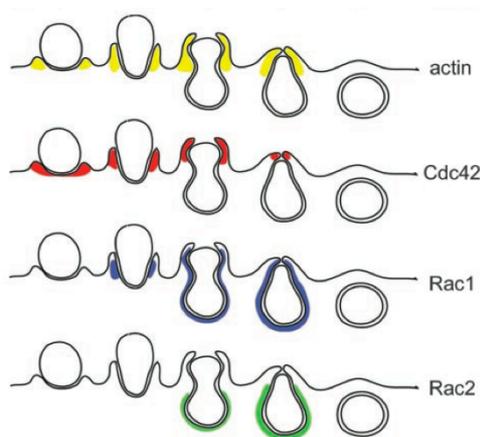


Figure 8 : Modèle de la dynamique de l'actine et des GTPases de la famille Rho (Hoppe and Swanson, 2004). La dynamique d'activation de Cdc42, Rac1 et Rac2 implique un rôle pour Cdc42 dans la formation et l'extension des pseudopodes tandis que Rac1 et 2 semblent jouer un rôle dans la fermeture du phagosome.

D'un autre côté, la phagocytose régulée par le récepteur au complément ne nécessite pas d'extension de pseudopodes pour ingérer des particules (Figure 7) mais semble au contraire la faire "couler" à l'intérieur de la cellule (Allen and Aderem, 1996). Au cours de la phagocytose, les récepteurs CR3 se regroupent au niveau de points focaux visibles en microscopie électronique (Kaplan, 1977) et enrichis en F-actine et recrutant diverses protéines de régulation du cytosquelette comme le complexe Arp2/3 nécessaire à la nucléation de filaments d'actine (Allen and Aderem, 1996). La régulation du remodelage de l'actine est, dans ce cas, dépendante de RhoA, connue plus généralement pour son implication dans la régulation des adhérences focales et des fibres de stress correspondant à des structures rigides

appliquant des forces de tension au niveau de points d'adhérence de la cellule (Caron and Hall, 1998; Wiedemann et al., 2006). La formation de points d'ancrage de l'actine proche des fibres de stress suggère une régulation de l'internalisation de la particule passant par une activité contractile liée aux myosines II tirant la particule vers l'intérieur de la cellule (Olazabal et al., 2002).

Les formines correspondent à une autre catégorie de protéines régulant la polymérisation de l'actine. La présence sur ces protéines d'un domaine FH1 permet le recrutement de complexe profiline/actine à la pointe des filaments d'actine tandis que le domaine FH2 initie l'assemblage des filaments. Contrairement au complexe Arp2/3 qui permet la nucléation de l'actine à partir de filaments pré-existants et qui forme des réseaux d'actine par arborisation, les formines entraînent l'élongation rapide de filaments linéaires parallèles (pour revue sur les formines voir (Goode and Eck, 2007). La protéine mDia, une formine, est ainsi localisée à la pointe de filopodes et permet leur formation (Pellegrin and Mellor, 2005; Schirenbeck et al., 2005). De plus, la formation de fibres de stress, structures également linéaires, semble régulée par la protéine mDia1 en aval de RhoA (Nakano et al., 1999; Watanabe et al., 1999). La phagocytose dépendante du récepteur CR présente des analogies avec la formation de fibres de stress comme l'implication de RhoA et la polymérisation de filaments d'actine à partir de points focaux au niveau du site de phagocytose et semble également impliquer les formines. En effet, la protéine mDia1, sous le contrôle de RhoA, semble jouer un rôle dans la polymérisation de l'actine nécessaire à la phagocytose par le récepteur au complément et non par le récepteur Fc (Colucci-Guyon et al., 2005). De plus, la localisation de Dia1 au niveau de la cupule de phagocytose semble dépendre de la protéine d'échafaudage IQGAP1 (Brandt et al., 2007) qui joue également un rôle dans le réarrangement du cytosquelette d'actine par des GTPases de la famille Rho, notamment dans des fonctions telles que migration cellulaire, ou adhérence cellulaire (Brown and Sacks, 2006).

Parmi les protéines qui semblent jouer un rôle dans l'extension des pseudopodes dans le modèle classique lié au récepteur FcR, on trouve également des moteurs moléculaires tels que la myosine de type X (Chavrier, 2002; Cox et al., 2002). La myosine X possède en effet, un domaine PH qui permet sa liaison au PI(3,4,5)P₃ (produit dans la membrane du phagosome en formation par la PI(3) Kinase). Cette liaison à la membrane plasmique couplée à l'interaction avec l'actine créerait des forces de tension supplémentaires permettant de tirer la

membrane plasmique vers la partie distale des filaments d'actine polymérisés autour de la particule à ingérer. De cette façon, l'extension des pseudopodes serait dirigée par la polymérisation de l'actine mais la déformation de la membrane plasmique nécessaire pour entourer la particule se ferait par traction de la membrane le long des filaments d'actine et serait facilitée par l'apport de membrane issue de la fusion de vésicules intracellulaires avec le site de phagocytose (Chavrier, 2002; Cox et al., 2002).

5. Recrutement de membrane au niveau du site de phagocytose

Pour permettre l'extension de membrane autour de la particule et l'internalisation conséquente, il est nécessaire de maintenir la surface membranaire de la cellule (l'internalisation de nombreuses particules de taille plus ou moins importante entraînerait une diminution de la surface générale de la cellule). Une réponse à ce problème consiste en l'apport de membrane par l'intermédiaire du recrutement de stocks de membrane intracellulaire au niveau du site de phagocytose afin de garantir l'homéostasie de la cellule. Il a ainsi été montré que l'exocytose de vésicules au cours de la phagocytose est dépendante de protéines SNARE connues pour leur rôle dans la fusion de vésicules avec la membrane plasmique. Ces résultats ont été obtenus en utilisant des toxines botuliques clivant certaines de ces SNARE, prouvant ainsi l'implication fonctionnelle de l'exocytose au cours du processus de phagocytose (Hackam et al., 1998). Quelle est l'origine de ces vésicules ? Parmi les compartiments possibles, on trouve les endosomes (précoces ou tardifs) et les lysosomes qui jouent également un rôle dans la maturation du phagosome, ainsi que le réticulum endoplasmique récemment mis en évidence dans la phagocytose (Figure 9).

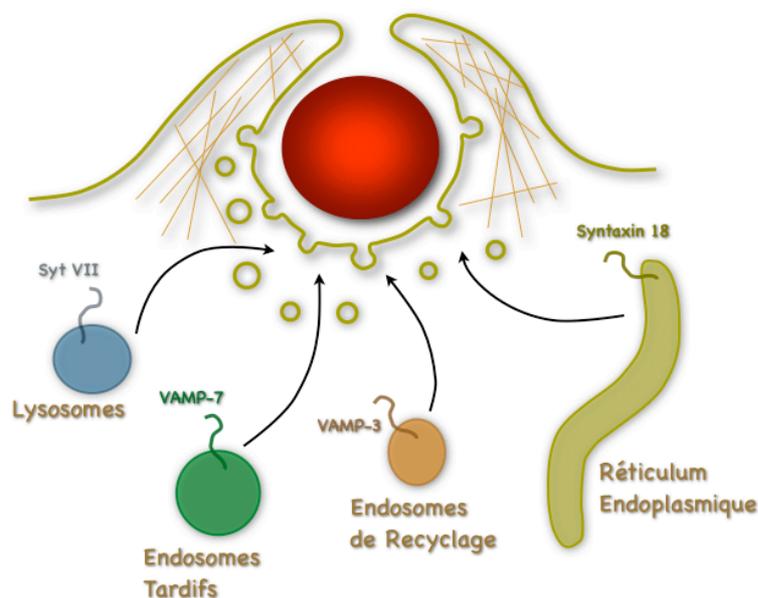


Figure 9 : Recrutement de membrane au cours de la phagocytose (adapté de (Jutras and Desjardins, 2005)). Le modèle présente les différents compartiments intracellulaires impliqués dans l'apport de membrane au cours de la formation du phagosome, ainsi que certaines des protéines SNARE régulant la fusion avec le phagosome.

Les endosomes de recyclage, caractérisés par le marqueur VAMP-3, semblent être recrutés au niveau du phagosome naissant avant sa fermeture (Bajno et al., 2000) puisque la membrane du phagosome est enrichie en VAMP3-GFP au cours de l'internalisation de la particule. Par ailleurs, Niedergang et collaborateurs ont pu montrer que la GTPase ARF6 était impliquée dans la régulation de l'apport de ces vésicules de type endosomes de recyclage positives pour VAMP-3 (Niedergang et al., 2003). Cependant, des expériences utilisant des cellules de souris KO pour la VAMP-3 suggèrent que cette protéine ne joue pas de rôle significatif dans l'exocytose de vésicules de recyclage au cours de la phagocytose (Yang et al., 2001; Allen et al., 2002). Des expériences complémentaires sur la protéine VAMP-3 semblent donc nécessaires pour trancher la question de son implication fonctionnelles.

Le compartiment d'endosomes tardifs caractérisés par la présence de VAMP joue également un rôle dans l'apport de membrane au cours de la formation du phagosome (Braun et al., 2004). L'inhibition de l'expression de VAMP7 entraîne une diminution de la phagocytose et des observations en microscopie électronique suggèrent que la formation du phagosome est bloquée au niveau du stade d'élongation des pseudopodes dans des cellules transfectées avec une construction bloquant la VAMP7 (Braun et al., 2004). Ces résultats soulignent l'importance du recrutement de membrane dans ce phénomène.

Le compartiment lysosomal semble également être impliqué dans l'apport de membrane au niveau de la cupule de phagocytose, au cours d'étapes précédant la fermeture du phagosome (Tapper et al., 2002). Il semblerait que la fusion de lysosomes avec la membrane du phagosome naissant soit, de plus, dépendante du calcium et de la synaptotagmine VII (Czibener et al., 2006). L'inhibition de l'expression de la synaptotagmine VII, présente sur une population de lysosomes, entraîne une inhibition de la fonction phagocytaire mais seulement dans les cas de particules de taille importante ou de phagocytose prolongée, c'est-à-dire dans les cas où le besoin en apport de membrane est plus important. Il semblerait donc que le compartiment lysosomal soit recruté de façon plus spécifique pour compléter le recrutement de membrane et que cette exocytose focale soit dépendante du calcium (Czibener et al., 2006).

Récemment, le réticulum endoplasmique a également été proposé comme source de membrane au cours de la phagocytose. Des expériences de "Knock-Out" chez *Dictyostelium* ont montré l'importance de deux protéines associées au réticulum endoplasmique, la calreticuline et la calnexin, dans le processus de phagocytose, indiquant un rôle pour ce compartiment. Chez ces mutants, l'adhérence des particules à la membrane plasmique semble

normale tandis que la formation de la cupule de phagocytose est inhibée (Muller-Taubenberger et al., 2001). De plus, des expériences menées sur des cellules de mammifères ont montré que le réticulum endoplasmique était recruté au niveau du site de phagocytose pendant la formation du phagosome (Gagnon et al., 2002). Ce compartiment semble également exploité par divers pathogènes pour éviter leur dégradation au cours de la phagocytose. La syntaxine 18, une protéine SNARE spécifique du réticulum endoplasmique, semble jouer un rôle au cours de la phagocytose, indiquant le recrutement et la fusion du réticulum endoplasmique avec la membrane du phagosome (Hatsuzawa et al., 2006).

6. Fermeture et internalisation du phagosome

Une fois la mise en place des pseudopodes autour de la particule terminée, ceux-ci se rejoignent au sommet et finissent par fusionner, formant ainsi le phagosome, vacuole dans laquelle est confinée la particule. Cette fusion de la pointe des pseudopodes implique la contraction de l'actinomyosine forçant le rapprochement des membranes. Cette force motrice est fournie par l'interaction de l'actine avec des myosines de types X (Cox et al., 2002) ou II (Swanson et al., 1999) présentes au niveau de la cupule de phagocytose, lors de la formation et de la fermeture du phagosome. Le type de myosine impliqué dépend également du type de récepteur et de signalisation mis en œuvre au cours de la phagocytose (Olazabal et al., 2002).

Une fois le phagosome formé, celui-ci migre à l'intérieur de la cellule en périphérie du noyau. Au cours de cette étape, le réseau d'actine, formé pour étendre la membrane plasmique autour de la particule, doit être dépolymérisé afin de laisser le phagosome migrer vers l'intérieur de la cellule ce qui est suggéré par le fait que des protéines de régulation de l'actine (coronin par exemple) disparaissent rapidement du site de phagocytose après fermeture du phagosome (Maniak et al., 1995) et que la dépolymérisation de filaments d'actine préexistants stimule la phagocytose (Konzok et al., 1999). Par la suite, le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules jouent tous deux un rôle dans les mouvements intracellulaires du phagosome (Blocker et al., 1998; Moller et al., 2000) dépendant peut-être par la taille des particules ingérées ($>3\mu\text{m}$ par l'actine et $<1\mu\text{m}$ par les microtubules) (Toyohara and Inaba, 1989). D'une part, le type et la vitesse des mouvements associés au réseau de microtubule semblent varier en fonction du stade d'internalisation du phagosome. Les phagosomes précoces peuvent effectuer des trajets lents liés à la dynamique des microtubules tandis que dans des étapes plus tardives leur mouvements sont associés à des moteurs moléculaires de

types dyneine et kinesine (Blocker et al., 1998). D'autre part, l'actine semble permettre le mouvement rapide de phagosomes après internalisation (30 à 60 min) en utilisant la formation de "comètes" d'actine qui propulsent le phagosome à travers le cytoplasme (Zhang et al., 2002). Les raisons de ces différents types de mouvements sont encore inconnues.

7. Maturation du phagosome et dégradation de la particule

Au cours de la migration du phagosome vers l'intérieur de la cellule, l'enrichissement en protéines et enzymes s'accompagne d'une acidification, il s'agit de l'étape de maturation du phagosome. Le phagosome subit de nombreuses étapes de fusion et fission avec les compartiments endosomaux et lysosomaux dans le but de générer l'environnement nécessaire à la dégradation de la particule ingérée.

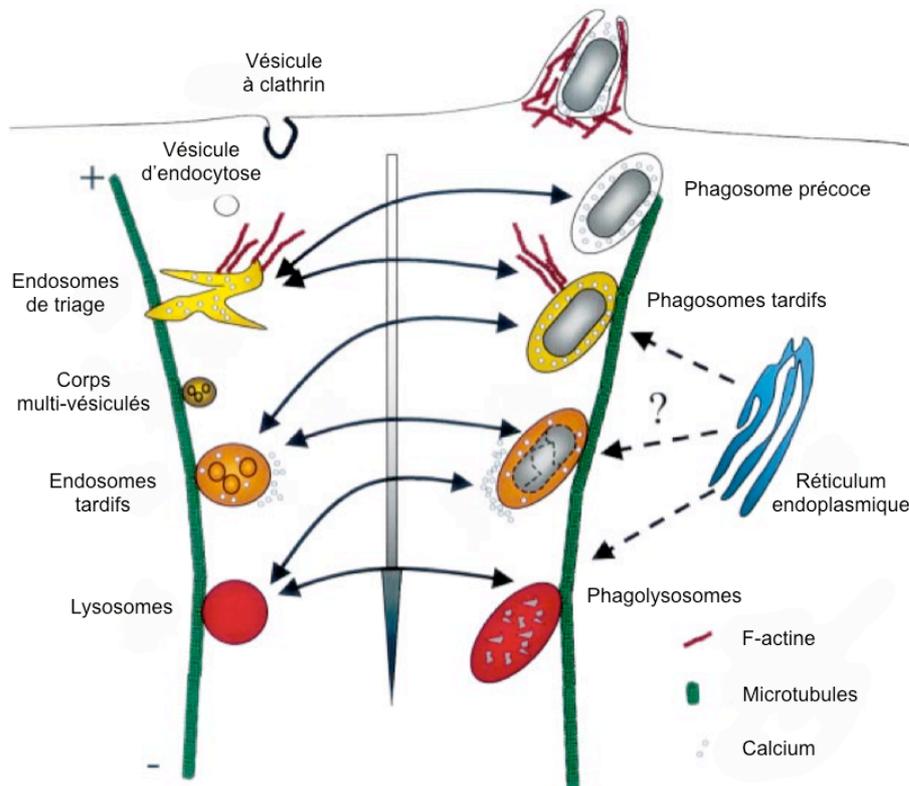


Figure 10 : Modèle de la maturation du phagosome par interaction avec la voie endosomale (adapté de (Vieira et al., 2002).

Pour comprendre les étapes de la maturation du phagosome il est nécessaire de la comparer avec la voie endosomale qui connaît une évolution parallèle lors de l'endocytose de matériel amené à être dégradé (récepteurs, protéines transmembranaires,...). Après endocytose, les premiers compartiments créés sont les endosomes précoces (ou "sorting" endosomes) et dont le pH est faiblement acide (autour de 6). Ces endosomes précoces sont caractérisés par la présence de marqueurs comme Rab5, EEA1 ou encore VAMP3 qui joue un rôle dans la fusion de ce

compartiment avec le phagosome. À partir de ce compartiment il existe deux possibilités de tri. La première recycle les protéines ou récepteurs internalisés vers les endosomes de recyclage (caractérisés par Rab11) qui permettent de rediriger ces composés vers la membrane plasmique par exemple. La seconde voie implique la dégradation des composés internalisés et les redirige vers les endosomes tardifs. Ce compartiment se caractérise par un pH autour de 5,5, un enrichissement en enzymes hydrolytiques et une morphologie multivésiculaire. On retrouve des marqueurs tels que Rab7, Rab9 et les LAMP. Dans ce compartiment, la voie de dégradation est largement engagée et conduit à la destruction des composés internalisés. Par la suite, les endosomes tardifs subissent une dernière évolution vers le stade de lysosomes dans lesquels l'acidification descend sous les 5,5 et où les protéases et lipases sont nombreuses et actives. On retrouve également sur ce compartiment des marqueurs tels que les LAMP ou encore la Cathepsin D, une enzyme hydrolytique. Pour revue sur la voie endosomale voir (Bishop, 2003).

Il est à noter que chez les neutrophiles, une catégorie de phagocytes professionnels, il existe une classe particulière de vésicules appelés granules primaires ou "azurophiles" de nature proche de celle des lysosomes mais qui ne font pas partie de la voie d'endocytose et de dégradation classique. Ces vésicules sont en revanche sécrétées directement au niveau de la membrane plasmique suite à l'activation de récepteurs de surface spécifique et lors de la phagocytose, jouant ainsi un rôle précoce dans la destruction de pathogènes dès leur liaison avec les récepteurs phagocytaires (Tapper, 1996; Tapper et al., 2002).

L'évolution du phagosome au cours de la maturation se fait de la même façon séquentielle que pour les endosomes. Dans un premier temps, le phagosome interagit avec le compartiment endosomal précoce, mis en évidence par un enrichissement en Rab 5. Puis, les marqueurs présents au niveau du phagosome évoluent et l'on voit apparaître Rab7 ou les protéines LAMP (qui semblent jouer un rôle dans la fusion des lysosome avec le phagosome (Huynh et al., 2007)) caractéristiques des endosomes tardifs et des lysosomes respectivement. Parallèlement, on constate également la perte de marqueurs précoces qui sont recyclés vers des compartiments plus précoces (Pitt et al., 1992). Il y a sélection et séparation de protéines présentes au niveau du phagosome au cours de sa maturation, ce qui suggère un processus actif et non une évolution passive du phagosome par fusion avec des compartiments différents. Ce concept est renforcé par des approches qui montrent que des phagosomes tardifs isolés ne sont capables de fusionner *in vitro* qu'avec des lysosomes isolés de

macrophages et non avec des endosomes tardifs, suggérant là aussi que le phagosome régule lui-même le dialogue avec la voie endosomale lors de la maturation (Jahraus et al., 1998).

Pour accompagner la maturation du phagosome il est nécessaire de séparer les composants des membranes du phagosome et des endosomes impliqués pendant les étapes de fusions/fissions entre ces compartiments. Une solution consiste en la formation de “raft” ou radeaux lipidiques qui concentrent certaines protéines dans des micro-domaines de la membrane du phagosome. La présence de la flotillin, spécifique de ces micro-domaines, augmente avec la maturation du phagosome et permet le recrutement de protéines importantes telles que l’actine, certaines sous-unités de protéines G trimériques ou encore la pompe à protons V-ATPase (Dermine et al., 2001). Ainsi, l’apport de cette V-ATPase entraîne une acidification du phagosome et la dégradation de la particule par des protéases bénéficiant du milieu acide. Une autre solution est apportée par le concept de “Kiss and Run” qui permet aux vésicules endosomales de ne pas fusionner totalement avec le phagosome et de n’échanger que certaines protéines membranaires et une partie du contenu de la vésicule. En effet, les vésicules ne fusionnent que partiellement avec le phagosome et enchaînent directement avec une étape de fission ce qui permet à la vésicule endosomale de se détacher du phagosome en gardant une partie de son contenu (Desjardins, 1995).

Finalement, le phagolysosome obtenu redirige les différentes particules dégradées vers des compartiments de recyclages vers la membrane plasmique (pour la présentation d’antigènes dans le cas de l’immunité chez les vertébrés supérieurs) ou le réticulum endoplasmique pour la réutilisation des nutriments générés (dans le cas des amibes). Une autre partie, inutilisable, sera, elle, évacuée par la cellule dans un phénomène de réjection de déchets inertes dans le milieu extracellulaire.

8. Recyclage des particules internalisées et présentation de l’antigène

La présentation de l’antigène est une voie particulière de recyclage au sein de cellules du système immunitaire. La présentation de l’antigène résulte donc du recyclage des peptides antigéniques issus de pathogènes éliminés, en vue de stimuler des cellules T, acteurs de la réponse immunitaire adaptative (voir page 11). Afin d’être fonctionnelle la présentation du peptide doit se faire en présence du CMH de classe I ou II. C’est ce complexe entre CMH et peptide antigénique qui est reconnu par les récepteurs spécifiques des cellules T, les TCR.

Dans le cas du CMH de classe I, les protéines défectueuses du soi, par exemple, sont transportées dans le cytoplasme puis dégradées en peptides par le protéasome, un système complexe de dégradation de protéines défectueuses ou en fin de vie. Ces peptides de 8 à 16 acides aminés sont ensuite pris en charge par des transporteurs spécialisés, les TAP (Transporter associated with Antigen Processing) (van Endert et al., 2002), dans le réticulum endoplasmique où se forme l'association entre CMH et peptide antigénique par interaction entre le CMH et les TAP dans une forme de "complexe de chargement". Le complexe CMH-peptide antigénique peut alors être redirigé vers la membrane plasmique en vue de l'activation de cellules T cytotoxiques.

Le CMH de classe II, quant à lui, nécessite une interaction avec la protéine chaperonne Ii qui permet l'assemblage et le transport du CMH II vers la voie endosomale dans laquelle Ii est dégradé au cours de plusieurs étapes pour aboutir à une interaction en le CMH II et un peptide issu de cette dégradation, le CLIP (Class II associated invariant chain peptide). Le chargement du peptide antigénique (issu de la dégradation de pathogènes) est ensuite pris en charge dans le compartiment lysosomal. Lors de la maturation du phagosome, l'interaction avec la voie endosomale, et plus particulièrement avec les lysosomes, entraîne la formation d'un phagolysosome, compartiment compétent pour la production de peptides antigéniques compatibles avec le CMH de classe II (Ramachandra et al., 1999). De plus, les antigènes produits sont également susceptibles d'être redirigés vers le compartiment lysosomal par des événements de fusion/fission, compartiment où ils peuvent interagir avec le CMH de classe II (Beatty et al., 2000; von Delwig et al., 2003). Les complexes CMH II-antigène sont ensuite recyclés vers la membrane plasmique en vue de l'interaction avec les cellules T.

Une troisième voie de recyclage d'antigènes vers la surface cellulaire permet la présentation de peptides exogènes en association avec le CMH de classe I, phénomène appelé présentation croisée. Cependant, la question de la régulation de cet assemblage est l'objet d'études intenses. Une explication possible a été fournie par l'équipe de Michel Desjardins qui stipule que des protéines du réticulum endoplasmique sont présentes sur le phagosome à différents stades de sa formation et de sa maturation (Garin et al., 2001), suggérant que le phagosome est "compétent pour la présentation croisée" (Houde et al., 2003). Le CMH pourrait alors se lier directement dans le phagosome à des peptides exogènes issus de la dégradation de bactéries. Depuis, la présence du CMH de classe I sur le phagosome a pu être confirmée par différents groupes (Ackerman et al., 2003; Guernonprez et al., 2003; Houde et al., 2003). L'acquisition progressive par le phagosome d'enzymes nécessaires à la dégradation

des particules internalisées permettrait la production des peptides de 8 à 10 acides aminés capables de former un complexe avec le CMH. Cette voie constitue donc une troisième alternative de trafic cellulaire pouvant aboutir à la présentation de l'antigène et déclencher la réponse immunitaire adaptative (Figure 11).

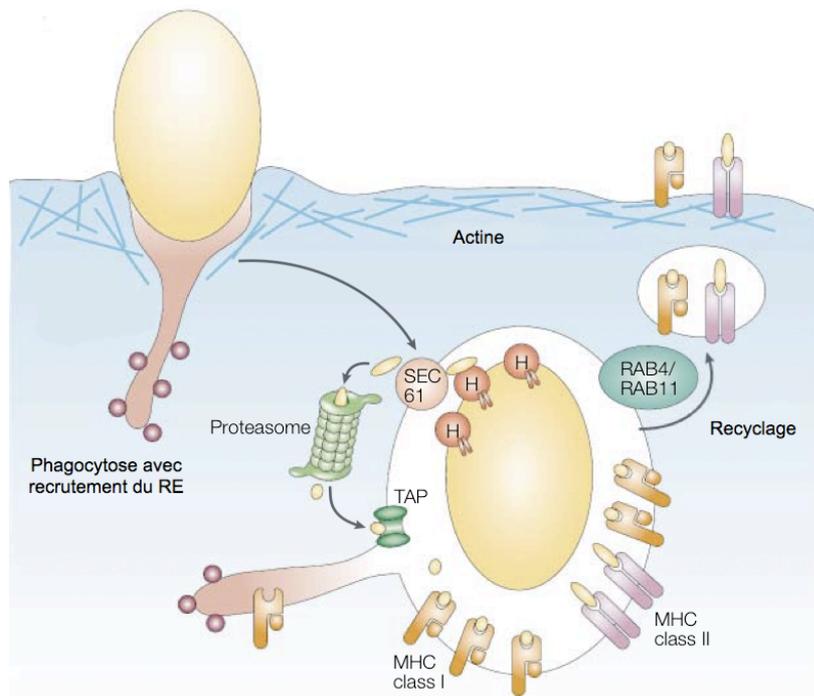


Figure 11 : La présentation croisée de l'antigène (adapté de (Desjardins, 2003). Le recrutement du réticulum endoplasmique (RE) au cours de la formation du phagosome fournit les protéines nécessaires à la présentation de l'antigène. Les particules sont dégradées par les hydrolases (H) et les peptides générés peuvent soit interagir avec le CMH II ou être transportés dans le cytoplasme (par la protéine Sec61) où ils sont apprêtés par le protéasome. Les peptides résultant du protéasome sont re-transportés dans le

phagosome par les transporteurs TAP et interagissent avec le CMH I. Les deux formes de CMH peuvent ensuite être recyclés vers la membrane plasmique par un processus dépendant de GTPases de la famille Rab.

Conclusion

Comme le montrent les différents exemples de recrutement de membrane lors de la phagocytose, le trafic membranaire est nécessaire à la mise en place du processus de phagocytose en même temps que la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ce trafic membranaire implique divers compartiments de la voie endosomale ou du réticulum endoplasmique et fait appel à de nombreux acteurs déjà mis en évidence dans d'autres processus cellulaires de trafic membranaire ou d'exocytose. C'est dans ce contexte que mon travail de thèse m'a conduit à étudier divers acteurs du trafic membranaire et du réarrangement du cytosquelette d'actine susceptibles de jouer un rôle au cours de la phagocytose, dont la phospholipase D.

RESULTATS I

FONCTION ET DYNAMIQUE DE LA PHOSPHOLIPASE D AU COURS DE LA PHAGOCYTOSE

I. Introduction à la Phospholipase D

Au cours de la phagocytose, de nombreux événements de trafic membranaire sont nécessaires à la formation et la maturation du phagosome. Or, dans la signalisation régulant ces processus, les lipides jouent un rôle important et font l'objet d'intenses études. Ils permettent notamment la formation de plateformes de signalisation, le recrutement et/ou l'activation de protéines ou participent à la fusion de vésicules avec la membrane plasmique. La phospholipase D (PLD) fait partie des enzymes produisant un de ces lipides de signalisation et a pu être impliquée dans l'exocytose (Vitale et al., 2002) ou au cours de la phagocytose (Serrander et al., 1996). Cependant, le rôle et la régulation de la PLD au cours de la phagocytose n'ont pas encore été déterminés avec certitude. C'est pourquoi nous avons étudié sa fonction dans le processus de phagocytose.

1. Structure de la PLD et synthèse du PA

La PLD est une enzyme catalysant la formation d'acide phosphatidique (PA) à partir de phosphatidylcholine (PC), un constituant majeur des membranes lipidiques, par hydrolyse (Figure 12). L'utilisation d'alcool primaire à la place de l'eau pour l'activité de transphosphatidylation de la PLD entraîne la formation de phosphatidyl-alcool à la place du PA et court-circuite sa fonction. Découverte chez les plantes, l'activité catalytique de la PLD est conservée au cours de l'évolution puisque des protéines proches de la PLD sont présentes aussi bien chez les levures et les bactéries que chez *C. elegans* ou la drosophile (pour revue voir (McDermott et al., 2004).

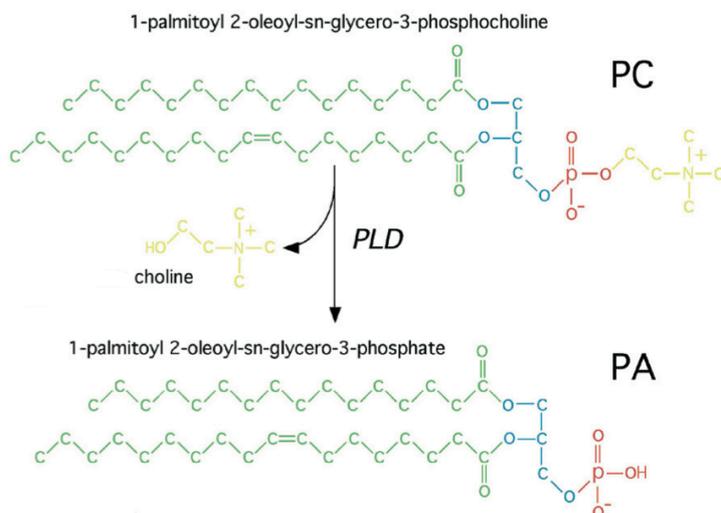


Figure 12 : Production de PA par la PLD (adapté de (Jenkins and Frohman, 2005).

La PLD hydrolyse la PC et libère ainsi de la choline et du PA. L'autre réaction enzymatique de la PLD est la transphosphatidylation entre la PC et un alcool primaire. Le groupe phosphatidyl de la PC est transféré sur l'alcool pour produire du phosphatidyl-alcool. Cette réaction court-circuite la production de PA et permet ainsi d'inhiber son action biologique.

Le PA est un lipide abondant dans les membranes biologiques et sa synthèse peut se faire par des voies alternatives à la PLD (figure 13). La contribution de la PLD à la production de PA peut sembler mineure, mais sa localisation au niveau de sites de signalisation spécifiques et sa régulation au cours des processus auxquels elle participe permettent une production régulée au niveau spatial et temporel.

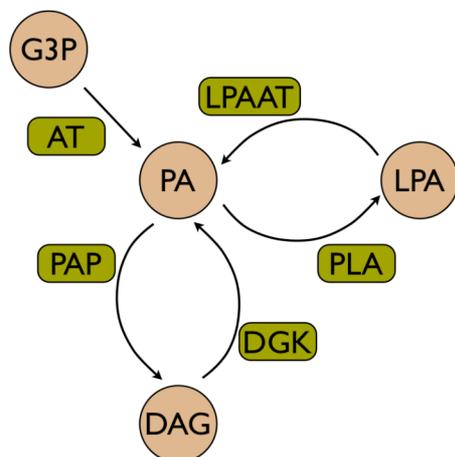


Figure 13 : Voies alternatives de production de PA.

LPA : acide lysophosphatidique. **LPAAT** : LPA acétyltransférase.
PLA : phospholipase A. **PAP** : Phosphatidic Acid Phosphatase.
DGK : Diacylglycerol Kinase. **G3P** : Glycérol 3 phosphate. **AT** : Acyltransférase.

Chez les mammifères, il existe deux isoformes de PLD. La PLD1 est une protéine de 1072 acides aminés et la PLD2, une protéine de 933 acides aminés dont l'activité basale est supérieure à celle de la PLD1. Dans des cellules stimulées en revanche, la PLD2 est peu active tandis que l'activité de la PLD1 est plus sensible à divers activateurs et constitue un apport plus important en PA que l'activité de la PLD2. Les deux isoformes de la PLD ont des structures proches même s'il existe des différences dans leur régulation et leur localisation. La structure primaire de la PLD nous renseigne ainsi sur les possibilités de régulation par différentes protéines ou phospholipides membranaires ainsi que sa localisation subcellulaire (Figure 14).

Tout d'abord, la PLD possède quatre régions (nommées I à IV) formant deux motifs HKD dont la mutation provoque une perte de l'activité catalytique. Ces quatre régions, formant le domaine catalytique actif permettant la production de PA, nécessitent une apposition par repliement de la protéine qui entraîne la dimérisation intramoléculaire deux par deux de ces régions. Cette dimérisation pose la question de l'existence d'homo ou hétérodimère de PLD qui pourraient ainsi former des plateformes de signalisation plus large (Kam and Exton, 2002). Parmi les domaines connus au sein de la PLD, on trouve en partie N-terminale un domaine PH capable de lier les phosphoinositides tels que le PI(4,5)P₂. Ce domaine de liaison semble nécessaire à la localisation fonctionnelle des deux isoformes de la PLD qui nécessite ainsi la formation de domaines membranaires riches en PI(4,5)P₂ et la mutation de ce domaine entraîne des relocalisations de la PLD (Hodgkin et al., 2000; Sciorra

et al., 2002). Le domaine PH conditionnerait donc la localisation de la PLD1 vers des compartiments intracellulaires comme le Golgi (Colley et al., 1997b; Sung et al., 1999a), des compartiments de la voie endosomale et des lysosomes (Toda et al., 1999) ainsi que des granules de sécrétion (Brown et al., 1998). La PLD2 en revanche serait présente principalement à la membrane plasmique (Colley et al., 1997a; Honda et al., 1999) et en bordure du Golgi (Freyberg et al., 2001; Freyberg et al., 2002). De plus, des expériences de délétion de la partie N-terminale incluant le domaine PH entraînent une augmentation de l'activité de la PLD1 due aux GTPases, suggérant une forme de régulation négative par cette région de la protéine (Sung et al., 1999b; Sung et al., 1999a). En plus du domaine PH, les deux isoformes de la PLD possèdent un motif polybasique de liaison aux phosphoinositides qui pourrait jouer plus directement un rôle dans la stimulation de l'activité catalytique de la PLD puisque la mutation de ce motif entraîne une perte de cette activité (Sciorra et al., 1999). Par ailleurs, un domaine PX permet la liaison à divers autres phosphoinositides tels que PI(4)P et différents types de PIP₂ et PIP₃, mais ce domaine ne semble jouer un rôle que dans la localisation de la protéine (Du et al., 2003). C'est donc la combinaison de divers phosphoinositides au sein des membranes qui permettrait une régulation précise de la localisation de la PLD.

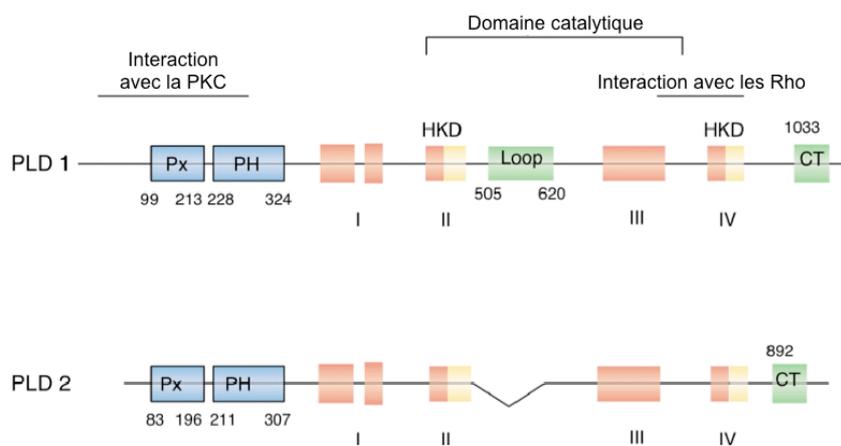


Figure 14 : Structure et domaines de la PLD1 et de la PLD2 (Freyberg et al., 2003). Loop représente un domaine d'activation. CT représente un domaine C-terminal important pour l'activité enzymatique.

Bien que les domaines de liaison à la PKC, à ARF et aux GTPases de la famille Rho n'aient pas été déterminés, ces trois types de protéines sont des régulateurs connus de la PLD. En effet, la partie N-terminale de la PLD est importante pour sa régulation par la PKC tandis que la partie C-terminale permet la régulation par les GTPases Rho et ARF. Par ailleurs, ces trois régulateurs de la PLD sont également connus pour être impliqués dans la phagocytose et pourraient jouer un rôle dans l'activation de la PLD lors de ce processus (pour revue voir (McDermott et al., 2004).

2. Fonctions de la PLD

La PLD joue un rôle dans divers types de trafics membranaires (comme le transport de vésicules et l'exocytose régulée) qui sont susceptibles d'expliquer l'implication de la PLD au processus de phagocytose.

a. Transport vésiculaire

Le transport vésiculaire a été décrit comme une fonction potentielle de la PLD en raison du rôle de ARF (ADP Ribosylation Factor), un régulateur de la PLD, dans le trafic vésiculaire. De plus, la localisation cellulaire de la PLD au niveau de différents compartiments de la voie endosomale et de l'appareil de Golgi est en accord avec un rôle dans le transport de membrane. Dans des cellules de mammifères, les deux isoformes de la PLD semblent être présentes sur le Golgi avec la PLD2 présente principalement à la périphérie du Golgi et sur des vésicules péri-golgiennes, suggérant un rôle de la PLD dans le transport de vésicules golgiennes (Freyberg et al., 2001; Freyberg et al., 2002). Par ailleurs, la surexpression de PLD1 humaine dans des cellules pituitaires entraîne l'augmentation du bourgeonnement de vésicules de sécrétion du réseau trans-golgien. De plus, ce bourgeonnement est inhibé par l'expression de mutants inactifs de la PLD et semble bien être dépendant du PA puisque des alcools primaires, détournant la production de PA, inhibent également le phénomène de bourgeonnement (Chen et al., 1997). Chez la levure, une isoforme de la PLD, Spo14, est nécessaire notamment au phénomène de sporulation qui nécessite la formation de membrane autour des noyaux haploïdes. Ces membranes s'accumulent autour des noyaux par fusion de vésicules, phénomène qui semble être dépendant de Spo14 (Rudge et al., 1998). De plus, un rôle dans la sécrétion chez la levure est proposé pour la PLD, se distinguant ainsi du rôle dans la sporulation (Rudge et al., 2001; Rudge et al., 2002).

b. Exocytose

La PLD semble jouer un rôle important dans la voie de sécrétion de différents types cellulaires. La sécrétion régulée est inhibée par l'utilisation d'alcools primaires, qui prouve l'implication du PA, dans des cellules myéloïdes (Stutchfield and Cockcroft, 1993), ou des cellules neuroendocrines (Vitale et al., 2001). La PLD est également nécessaire à la régulation

de l'exocytose dans d'autres types cellulaires comme les cellules β pancréatiques qui sécrètent de l'insuline (Hughes et al., 2004) ou encore dans la dégranulation chez les neutrophiles (Mansfield et al., 2002). Dans des cellules PC12, la présence de la PLD1 à la membrane plasmique est corrélée avec la translocation d'ARF6, connu pour réguler la PLD, lors de la stimulation de l'exocytose. De plus, la translocation de ARF6 est nécessaire à l'exocytose et entraîne l'activation de la PLD dans des fractions de membrane plasmique (Caumont et al., 1998). Des expériences d'ampérométrie et de capacitance sur des cellules chromaffines transfectées avec un domaine de liaison au PA suggèrent une régulation des étapes tardives de l'exocytose (Vitale et al., 2002; Zeniou-Meyer et al., 2007). Cette régulation par la PLD et le PA a pu également être mise en évidence dans des neurones où la PLD1, localisées à la membrane plasmique au niveau de sites d'exocytose, favoriserait la fusion des membranes (Humeau et al., 2001). La PLD, activée par ARF, joue également un rôle dans la dégranulation de mastocytes, probablement en activant la production de PI(4,5)P₂ (Way et al., 2000). Dans ce modèle cellulaire, la PLD1 est présente sur des granules de sécrétion tandis que la PLD2 est localisée à la membrane plasmique. De plus, après stimulation, la PLD1 subit une translocation avec les granules vers la membrane plasmique. Les deux isoformes de la PLD semblent donc être nécessaires à la dégranulation mais jouer un rôle dans différentes étapes comme le suggère la différence de localisation (Choi et al., 2002).

c. La phagocytose

De nombreuses publications ont fait état d'un rôle potentiel de la PLD et de l'acide phosphatidique dans la régulation de la phagocytose. La plupart de ces études ont inhibé la PLD par l'utilisation d'alcools primaires, entraînant une inhibition de la signalisation du PA au cours de la phagocytose. Pour exemple, le groupe de Kusner a pu montrer l'activation de la PLD au cours de la phagocytose FcR dépendante (Kusner et al., 1999) ou complément dépendante (Kusner et al., 1996) entre autres. D'une part, la CRP (C-Reactive Protein), capable de lier et d'activer le récepteur FcR, entraîne l'activation de la PLD et une augmentation de la phagocytose (Bodman-Smith et al., 2002). D'autre part, la stimulation des récepteurs CR3 par des anticorps spécifiques de ce récepteur, montre que la PLD est directement activée par CR3 (Serrander et al., 1996). Au cours de la phagocytose par ce récepteur, la Cytochalasin D un inhibiteur de la polymérisation de l'actine entraîne une inhibition de la PLD, suggérant une régulation par le cytosquelette d'actine lors de la phagocytose. Le céramide, un second messager lipidique, est un régulateur négatif connu de

la PLD (Venable et al., 1996) et entraîne une inhibition de la phagocytose, indiquant là encore une implication de la PLD dans ce processus (Suchard et al., 1997).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc l'implication de la PLD et du PA dans la régulation de la phagocytose. Il est à souligner que ces études ont principalement utilisé des agents pharmacologiques inhibiteurs de la production de PA. Les régulateurs en amont de la PLD au cours de la phagocytose, quant à eux, ont fait l'objet de peu d'études. Cependant, certains acteurs connus de la régulation de la PLD sont susceptibles d'être impliqués dans cette régulation au cours de la phagocytose.

3. Régulateurs potentiels de la PLD

La régulation de la PLD est complexe et dépend de nombreux facteurs comme le type cellulaire, la voie de signalisation activée, l'isoforme impliquée... Malgré tout, un certain nombre de régulateurs font consensus. La PKC, les GTPases de la famille Rho ainsi que les GTPases ARF sont connus pour leur rôle de régulateur de l'activité de la PLD au cours de divers processus cellulaires et ont également été impliqués au cours de la phagocytose.

a. Protéine Kinase C

La PKC est capable de réguler l'activité de la PLD (Xie et al., 1998) en se liant à la partie N-terminale avant le domaine PX (Hammond et al., 1997). De plus, il semblerait que l'activité catalytique de la PKC ne soit pas nécessaire à l'activation de la PLD et pourrait indirectement dépendre de la PLC (Lee et al., 1994). Dans ce cas, la PKC pourrait stimuler la formation d'un complexe fonctionnel impliquant la PLD. Par ailleurs, la PLD et la PKC sont colocalisées dans des rafts lipidiques à la membrane plasmique pendant la phagocytose (Mansfield et al., 2005) et un lien entre activation des récepteurs au complément, production de PA par la PLD et activation de la PKC, a pu être mis en évidence indiquant une relation entre PLD, PKC et phagocytose (Fallman et al., 1992). Les auteurs suggèrent également la mise en place d'une boucle de rétroaction positive entre la PKC et la PLD.

b. GTPases de la famille Rho

Différentes familles de GTPases sont susceptibles de jouer un rôle dans l'activation de la PLD puisque l'addition de GTP γ S, un équivalent non hydrolysable du GTP, entraîne une activation de la PLD. Ainsi des GTPases de la famille Rho, comme RhoA, Rac1 et Cdc42, peuvent participer directement à l'activation de la PLD1 comme le montrent des expériences *in vitro* (Hammond et al., 1997; Min and Exton, 1998; Hodgkin et al., 1999). Par ailleurs, des expériences visant à définir les sites de liaison de la PLD avec ces différents régulateurs ont permis de montrer que RhoA possédait un site dans sa boucle d'activation (Switch I), site également important chez Cdc42 pour sa liaison GTP dépendante à la PLD (Bae et al., 1998). De plus, des expériences utilisant différentes toxines, pour inhiber des GTPases Rho, ont montré leur implication dans l'activation de la PLD. La toxine C3 de *Clostridium botulinum* inhibe RhoA et empêche l'activation de la PLD suite à différents traitements dans des fibroblastes (Malcolm et al., 1996). Bien que le rôle des Rho dans la régulation de la PLD n'ait pas été étudié au cours de la phagocytose, de nombreuses études démontrent l'importance des Rho dans le déroulement de ce processus comme cela est décrit dans l'introduction sur les mécanismes moléculaires de la phagocytose (page 21).

c. GTPases de la famille ARF

Des études sur l'activité de la PLD dans des neutrophiles ont permis de déterminer l'existence d'un autre facteur d'activation de la PLD dépendant du GTP, un Facteur d'ADP-ribosylation, ARF (Brown et al., 1993; Brown et al., 1995). Parmi les ARF connues pour leur capacité à activer la PLD, on trouve ARF1 (Brown et al., 1993), ARF3 (Brown et al., 1995), ARF5 et ARF6 (Brown et al., 1995; Caumont et al., 1998). Par ailleurs, des modifications des protéines ARF comme par exemple la myristoylation pourrait faire varier l'association des protéines ARF avec la membrane ainsi que leur capacité d'activation de la PLD (Brown et al., 1993; Brown et al., 1995). La Brefeldine A, un inhibiteur de facteurs d'échange de ARF, permet de bloquer l'activation de la PLD dans différents types cellulaires ou certaines de ses fonctions, comme l'activation de la PLD par la stimulation de récepteurs muscariniques dans des cellules HEK (Rumenapp et al., 1995). Dans des fractions de membranes enrichies en marqueurs du Golgi, Ktistakis et collaborateurs ont pu déterminer que l'activation de la PLD était également sensible à la Brefeldin A (Ktistakis et al., 1995). Ainsi, les auteurs en viennent à suggérer un rôle de la PLD dans le transport de vésicules depuis le Golgi (Moss and

Vaughan, 1998). Cependant, la Brefeldin A ne permet pas d'inactiver toutes les formes de ARF et certaines expériences utilisent des mutants inactifs de ARF afin de démontrer son rôle. Ainsi, des mutants dominant négatifs ont permis de montrer leur rôle dans l'activation de la PLD par ARF1 et ARF6 suite à la stimulation par le PDGF (Platelet derived Growth Factor) ou les esters de phorbol. Ces expériences démontrent des liens entre activité de la PLD et activation par des protéines ARF, bien que différents types de régulation soient envisageables. ARF pourrait interagir directement avec la PLD et réguler son activité (Liang et al., 1997). Mais l'activation de la PLD pourrait aussi se faire de façon indirecte par l'intermédiaire de la PI(4)P5 Kinase dont le produit, le PI(4,5)P₂ permet l'augmentation de l'activité de la PLD dans des cellules HL60, une lignée myéloïde (Martin et al., 1996). Dans le cadre de la phagocytose, la relation entre ARF et activation de la PLD n'a pas encore été établie.

4. Objectifs

Bien que de nombreuses études aient montré l'importance de la PLD pour la phagocytose, la localisation, la dynamique ou les isoformes de la PLD impliquées n'ont pas fait l'objet d'investigations poussées. Ce qui est également vrai pour la dynamique du PA. La production de PA permet de réguler des cascades de signalisation, recruter ou activer des protéines, modifier la composition lipidique des membranes ou encore en changer la courbure et faciliter la fusion entre deux membranes. La PLD est donc susceptible de jouer de nombreux rôles au cours de la phagocytose. **C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les isoformes de la PLD au cours de la phagocytose.** Nous avons testé l'implication de la PLD endogène en utilisant une approche par ARN interférence et mutations fonctionnelles. De plus, en utilisant des constructions couplées à la GFP, nous avons pu observer leur localisation et leur dynamique au cours de la phagocytose dans notre modèle de lignée de macrophages murins, les RAW 264.7 stimulée par des billes de latex couplées à des IgG afin d'activer les récepteurs FcR. Les résultats obtenus ont été publiés dans Traffic et sont exposés dans l'article ci-joint.

II. Résultats sur la Phospholipase D

Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis

Corrotte M, Chasserot-Golaz S, Huang P, Du G, Ktistakis NT, Frohman MA, Vitale N,
Bader MF, Grant NJ

Traffic. 2006 Mar;7(3):365-77.

Dynamics and Function of Phospholipase D and Phosphatidic Acid During Phagocytosis

Matthias Corrotte, Sylvette Chasserot-Golaz, Ping Huang, Guangwei Du, Nicholas T. Ktistakis, Michael A. Frohman, Nicolas Vitale, Marie-France Bader, Nancy J. Grant

Traffic, 2006, Vol.7, N° 3, Pages 365-377

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00389.x>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

III. Discussion sur le rôle de la PLD au cours de la phagocytose

Notre étude sur l'implication de la PLD au cours de la phagocytose nous a permis de déterminer que les deux isoformes de la PLD jouent un rôle dans ce processus. Au cours de nos expériences, la surexpression de formes sauvages ou constitutivement actives de la PDL1 et de la PLD2 entraînent une augmentation de la phagocytose tandis que des mutants inactifs l'inhibent. Cependant, la confirmation du rôle de la PLD endogène dans la phagocytose provient de l'utilisation d'ARN interférence. En effet, l'inhibition de l'expression de la PLD1 et/ou de la PLD2 entraîne une diminution importante du niveau de phagocytose. Des études plus anciennes avaient montré que l'activité de la PLD était nécessaire à la phagocytose, issue entre autres des récepteurs FcR (Kusner et al., 1999) et CR3 (Kusner et al., 1996), en court-circuitant la production d'acide phosphatidique (PA) par des alcools primaires. Cependant, l'inhibition de l'activité de la PLD ne permet pas de déterminer l'isoforme responsable de la dynamique de production du PA au cours de la phagocytose. Au cours de ma thèse, le laboratoire de David Kusner, a pu impliquer la PLD1 et la PLD2 dans la phagocytose par l'utilisation de mutants dominant négatifs qui inhibent tous deux la phagocytose (Iyer et al., 2004), ce qui confirme nos résultats impliquant la PLD1 et la PLD2 endogènes dans la phagocytose.

De plus, les expériences de localisation et de dynamique de ces protéines montrent que la PLD1 est localisée sur un compartiment vésiculaire de type endosomes tardifs et lysosomes et est recrutée au niveau du phagosome pendant sa formation et sa maturation. La PLD2 est, elle, localisée principalement à la membrane plasmique et au niveau du phagosome pendant sa formation. La PLD2 est ensuite rapidement exclue du phagosome au moment de sa fermeture. Enfin, le PA est produit au niveau du phagosome pendant sa formation et après son internalisation.

1. Localisation de la PLD

Au cours de la phagocytose de particules opsonisées avec des IgG dans des macrophages murins, les cellules Raw 264.7, nous avons mis en évidence la localisation de la PLD1 sur des endosomes tardifs (positifs pour VAMP7) et des lysosomes (positifs pour la Cathepsin D). En accord avec nos résultats, la plupart des études concernant la localisation de la PLD1 montrent qu'elle se situe sur des compartiments de types endosomes tardifs et lysosomes (Brown et al., 1998; Toda et al., 1999). Les expériences de l'équipe de Kusner

montrent également une localisation sous forme de vésicules (marquage ponctué dans les cellules) mais ne parviennent pas à déterminer le compartiment (Iyer et al., 2004). Il est à noter que contrairement à la majorité des études, nous avons utilisé des cellules vivantes transfectées avec des constructions de la PLD couplées à la GFP. En effet, nos expériences ont montré que la fixation au PFA 4%, pourtant couramment utilisée, entraînait une importante modification de la localisation des constructions PLD-GFP et de l'aspect des compartiments vésiculaires. En conséquence, les observations de cellules vivantes co-transfectées avec les plasmides de la PLD-GFP et des constructions de marqueurs couplés à la RFP nous ont paru plus représentatives de la réalité que des cellules fixées.

La PLD2 semble être principalement localisée à la membrane plasmique dans des cellules vivantes ce qui correspond à la localisation la plus fréquemment observée pour cette isoforme (Colley et al., 1997a; Honda et al., 1999). Dans l'étude du groupe de Kusner, la PLD2 est décrite comme étant de type vésiculaire (Iyer et al., 2004). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par l'utilisation de macrophages d'origines différentes ou, au vue de nos propres observations, en raison de la fixation des cellules qui pourrait modifier la localisation de la PLD2. D'un autre côté, des expériences de surexpression de la PLD2 dans la même lignée de macrophage que la notre montrent une localisation à la membrane plasmique avec un recrutement au niveau du phagosome dans des cellules vivantes, confirmant nos résultats (Cheeseman et al., 2006).

L'utilisation de cellules vivantes transfectées avec des constructions PLD-GFP permet d'observer la phagocytose en temps réel par vidéo-microscopie. Ainsi, nous avons pu montrer que la PLD1, présente sur une population de vésicules, était recrutée au niveau du site de phagocytose dès le début de la phagocytose et après internalisation. Dans le cas de la PLD2, le recrutement au site de phagocytose est suivi par une exclusion de la membrane du phagosome à partir de sa fermeture, indiquant que seule la PLD1 est susceptible de jouer un rôle dans la maturation du phagosome (Figure 14).

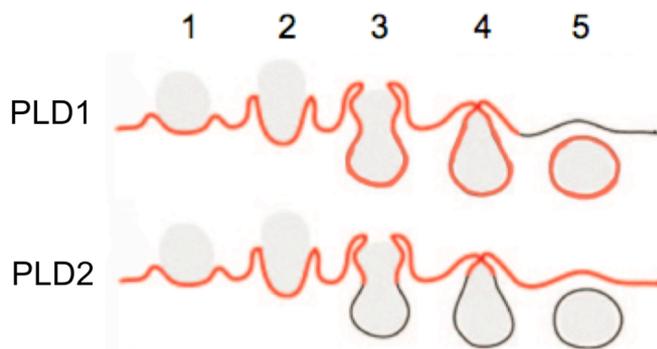


Figure 14 : Dynamique de la PLD1 et de la PLD2 au cours de la phagocytose. 1 à 5 représentent les étapes morphologiques de la formation du phagosome (voir détails figure 4 page 18).

En comparaison, l'étude de Iyer et coll. montre un recrutement de la PLD1 au niveau du phagosome mais pas de la PLD2 bien que les auteurs concluent à une implication des deux formes de la PLD dans le processus de phagocytose (Iyer et al., 2004). Cependant, il est à noter que leurs expériences de localisation de la PLD2 ne montrent pas de temps de phagocytose inférieur à 15 minutes alors que nos résultats montrent que la phagocytose peut se dérouler en moins de 5 minutes et que la PLD2 est exclue du phagosome dans ce laps de temps, ce qui est en accord avec les résultats sur la PLD2 de Cheeseman et collaborateurs (2006). Ces observations valident donc l'utilisation de la vidéo-microscopie aussi bien pour l'étude de la localisation de la PLD que pour sa dynamique au cours de la phagocytose.

2. Rôle du PA dans la signalisation

Il est important de pouvoir déterminer le lieu de production du PA afin d'identifier ses effecteurs potentiels et son rôle au cours de la phagocytose. C'est pourquoi nous avons utilisé une sonde spécifique du PA issue de la protéine Raf1, couplée à la GFP. Nous avons pu mettre en évidence que le PA était produit au niveau du site de phagocytose dès le début de la phagocytose et après internalisation, suggérant un rôle de ce lipide dans la formation et la maturation du phagosome. Le PA est susceptible de participer à la signalisation, soit en servant de substrat pour former d'autres lipides comme le DAG et le LPA, soit en activant ou en recrutant des protéines capables de lier le PA, soit, comme le suggère son rôle dans les étapes tardives de l'exocytose, en facilitant la fusion des membranes (Jenkins and Frohman, 2005).

La dynamique de divers phosphoinositides et du DAG est maintenant assez bien connue au cours de la phagocytose et a fait l'objet d'une revue complète (Swanson and Hoppe, 2004). Le DAG peut-être produit à partir de PA par l'activité de phosphohydrolases (Sciorra and Morris, 1999) et sa dynamique est donc susceptible de dépendre de l'activité de la PLD en amont. De plus, PA et DAG sont de potentiels co-activateurs de la PKC (Jose Lopez-Andreo et al., 2003) au cours de la phagocytose. Afin de pouvoir comparer la dynamique du PA et d'autres lipides au cours de la phagocytose, il serait nécessaire d'effectuer des expériences de FRET en vidéo-microscopie avec un mélange de sondes spécifiques du PA couplées à deux fluorophores différents et co-transfectées dans les macrophages, qui permettraient de déterminer la dynamique exacte de production de PA.

La colocalisation de la PLD2 et de la PI(4)P5 Kinase au niveau d'extensions membranaires (Honda et al., 1999) et l'activation de la PI(4)P5 Kinase par le PA (Jenkins et al., 1994) suggèrent un lien entre le PA et la production de PI(4,5)P₂ lors de processus d'extension de pseudopodes. De plus, cette cascade de signalisation a pu être impliquée dans le réarrangement de l'actine (Ishihara et al., 1998) et plus particulièrement au cours de la phagocytose (Scott et al., 2005). La PI(4)P5 Kinase est spécifiquement recrutée au cours de la formation du phagosome et le PI(4,5)P₂ est produit avec la même dynamique et disparaît du phagosome après sa fermeture (Botelho et al., 2000). Ainsi, le PI(4,5)P₂ est impliqué dans le réarrangement du cytosquelette lors de la formation du phagosome par le recrutement de protéines de régulation de l'actine comme le complexe Arp2/3 ou la gelsolin (Yeung et al., 2006).

Ces données et nos résultats concernant la localisation du PA au cours de la phagocytose suggèrent un lien entre l'activité locale de la PLD et la production de PI(4,5)P₂ nécessaire à la régulation de l'actine au cours de ce processus. Dans notre modèle, c'est la PLD2 qui est déjà présente à la membrane plasmique au début de l'extension des pseudopodes. Nous pouvons donc suggérer que la production de PA par la PLD2 pourrait activer localement la PI(4)P5 Kinase et la production de PI(4,5)P₂. Le PI(4,5)P₂ pourrait ensuite réguler le remodelage de l'actine nécessaire à la formation des pseudopodes en recrutant des protéines capable de lier le PI(4,5)P₂ (Figure 15). De plus, la production locale de PI(4,5)P₂ pourrait également recruter ou activer la PLD1 présente sur les endosomes et insérée au niveau du phagosome.

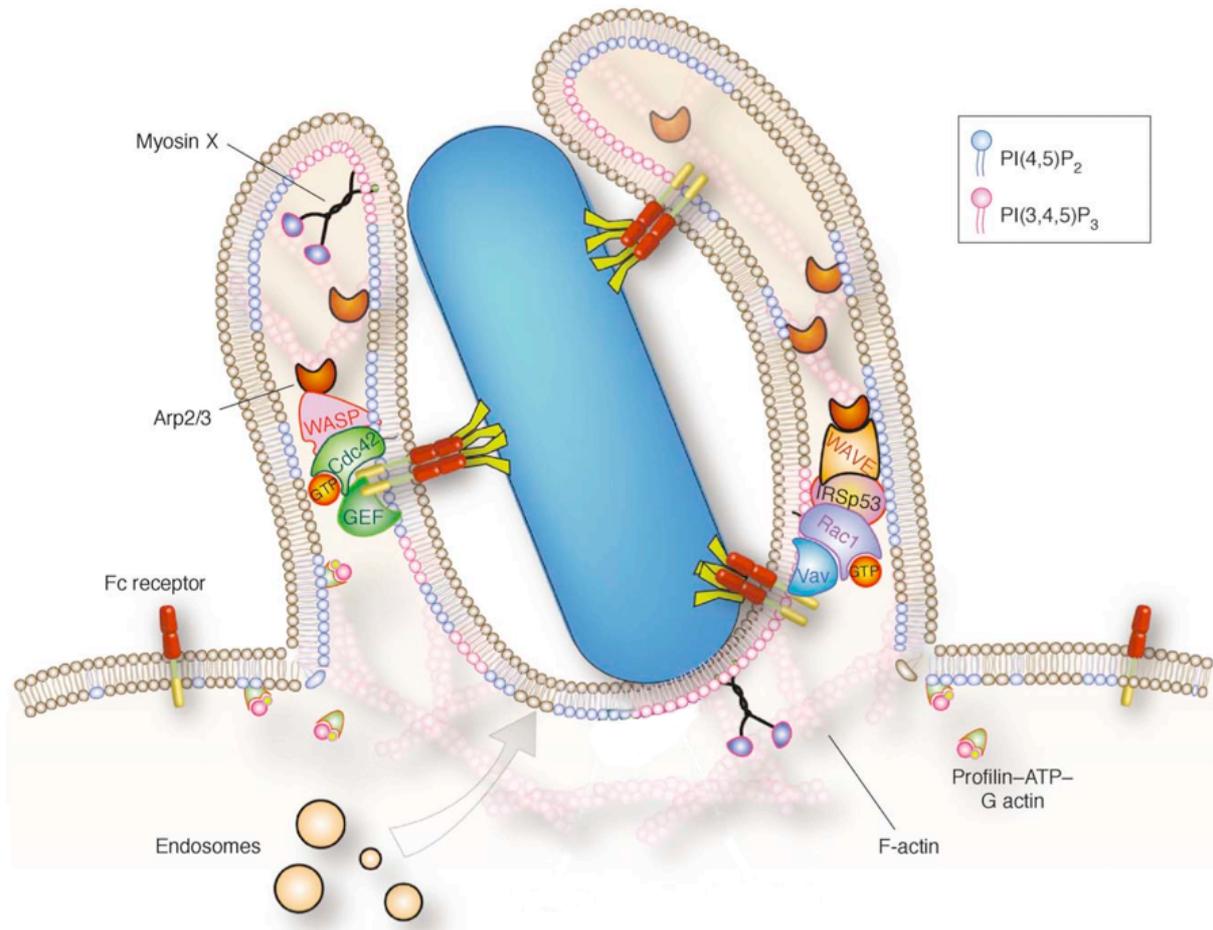


Figure 15 : Localisation et fonction du PI(4,5)P₂ et du PI(3,4,5)P₃ au cours de la phagocytose (Yeung et al., 2006). Le PI(4,5)P₂ produit au niveau des pseudopodes est susceptible de recruter des protéines du remodelage de l'actine (WASP/WAVE qui active le complexe Arp2/3, ou la profiline). Le PI(3,4,5)P₃, produit à partir du PI(4,5)P₂ et présent au niveau du phagosome, peut jouer un rôle dans le recrutement de la myosine X.

Dans la mesure où la PLD1 et la PLD2 sont localisées différemment, il est logique de penser que leur fonction au cours de la phagocytose est différente. L'acide phosphatidique produit par la PLD1, présente sur des vésicules de type endosomes tardifs et lysosomes, pourrait par exemple recruter ou activer des protéines nécessaires au trafic membranaire. Bien que le site de liaison du PA ne soit pas connu, les protéines ARF et SNARE semblent interagir avec le PA (Manifava et al., 2001). ARF6 est un régulateur connu du recrutement de membrane pendant la phagocytose (Niedergang et al., 2003) et joue un rôle dans la régulation de l'exocytose régulée par la PLD dans des cellules neuroendocrines (Vitale et al., 2002). Le PA pourrait dans ce cas permettre de recruter ou d'activer ARF6 au niveau de la PLD1 et engendrer une boucle de rétroaction positive. La question de savoir si ARF6 est activé pour réguler la PLD ou si la PLD active ARF6 pour réguler le trafic membranaire reste ouverte. Des expériences visant à séparer les fonctions de ARF dans le trafic membranaire et le

réarrangement de l'actine pourraient permettre de répondre à cette question. Dans nos conditions de phagocytose, des mutants de ARF6 constitutivement actifs mais incapables d'activer la PLD, inhibent-ils la phagocytose ? Des expériences sur l'invasion de *Chlamydia* dans des cellules HeLa montrent par exemple que ARF6 régule l'actine et non la PLD lors de l'internalisation de cette bactérie (Balana et al., 2005).

Étant donné que le PA semble produit au niveau du phagosome après internalisation, il est donc susceptible de participer à l'étape de maturation. Une étude portant sur *Mycobacterium tuberculosis*, une bactérie capable d'inhiber la maturation du phagosome pour éviter sa propre dégradation, indique que l'activation de la PLD induit l'acidification et donc la maturation du phagosome et permet donc la dégradation de la bactérie (Greco et al., 2006). Quel pourrait être le rôle du PA pendant cette étape ? La protéine RCP (Rab Coupling Protein) est un régulateur de Rab11, une GTPase impliquée dans le trafic de vésicules de recyclage (Lindsay et al., 2002). Or, la protéine RCP possède un domaine C2 capable de lier le PA (Lindsay and McCaffrey, 2004) et semble recrutée au niveau du phagosome (Damiani et al., 2004). Dans ces conditions, il est possible que la production de PA par la PLD1 après internalisation du phagosome permette le recrutement de la protéine RCP afin de réguler Rab11 et ainsi le recyclage de peptides issus de la dégradation dans le phagosome. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de tester la dynamique de vésicules positives pour Rab11 par vidéo-microscopie afin de déterminer leur interaction avec le phagosome dans des conditions normales ou en absence de PLD1.

3. Un rôle dans la fusion de vésicules avec la membrane du phagosome ?

Une des questions intéressantes soulevée par le recrutement de vésicules PLD1 positives vers le phagosome est la possibilité d'un rôle du PA dans la fusion de ces vésicules avec le phagosome. En effet, la production de PA a été associée à l'exocytose de vésicules dans des cellules neuroendocrines et des neurones, et plus particulièrement dans les étapes tardives de l'exocytose (Humeau et al., 2001; Vitale et al., 2002). L'hypothèse serait que des domaines de PA (qui possède des propriétés fusogènes) changeraient la courbure de la membrane (Kooijman et al., 2003) et faciliterait ainsi le rapprochement et la fusion des membranes (Siegel, 1999) (Figure 16). De plus, des protéines du complexe SNARE, sont capables de lier le PA, comme la protéine Spo20 (équivalent de SNAP25) chez la levure (Coluccio et al., 2004) ou Sso2p (équivalent de la syntaxin) (Liu et al., 2007). Cette interaction est susceptible de jouer un rôle dans sa localisation de spo20 avec la membrane

cible mais aussi de réguler la fonction de fusion du complexe SNARE (Neiman, 1998; Nakanishi et al., 2006). En effet, le PA pourrait faciliter la fusion des membranes en créant une interaction supplémentaire entre le complexe et la membrane qui jouerait sur le changement de conformation du complexe nécessaire à la fusion (Liu et al., 2007). Cette facilitation de la fusion pourrait également passer par les propriétés fusogènes du PA (Kooijman et al., 2003) et dans ce cas la liaison entre PA et protéines SNARE permettrait d'enrichir en PA la membrane au niveau du site de fusion (Liu et al., 2007). Différentes protéines du complexe SNARE spécifiques pour chaque type de compartiment jouent un rôle dans l'apport de membrane nécessaire à la formation du phagosome (Bajno et al., 2000; Braun et al., 2004; Hatsuzawa et al., 2006). Ainsi, l'interaction entre le PA et certaines protéines SNARE, pourrait réguler leur localisation et/ou la fusion des membranes vésiculaire et phagosomale (Figure 17).

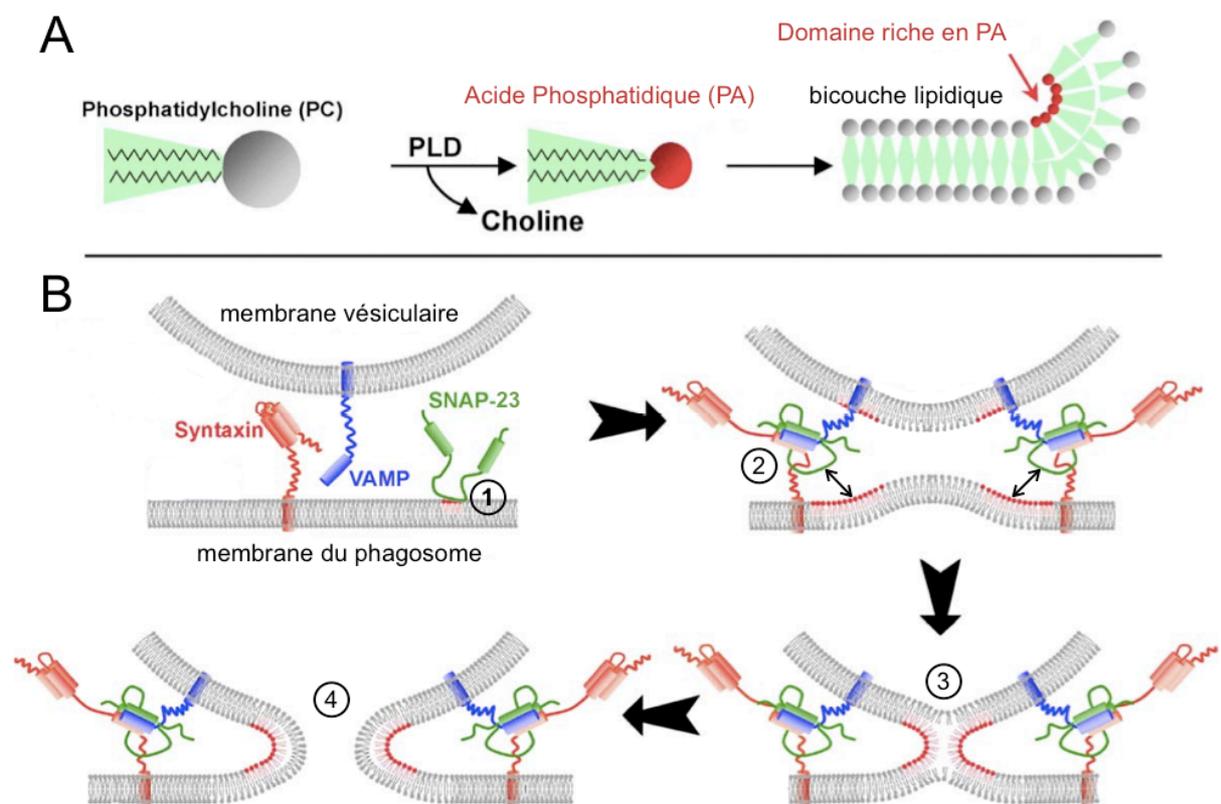


Figure 16 : Rôle du PA dans la fusion membranaire (adapté de (Bader et al., 2004)). **A** : La petite taille de la tête hydrophile du PA, comparée à la PC, provoque une courbure négative de la membrane. **B** : 1) Recrutement de la SNAP23 par le PA (en rouge). 2) Formation du complexe SNARE et rapprochement des membranes par la courbure et l'interaction entre PA et protéines SNARE. 3) Héli-fusion des membranes grâce au PA. 4) Fusion de la vésicule avec le phagosome.

4. Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus dans notre étude sur la PLD au cours de la phagocytose, et les rôles connus des deux isoformes de la PLD et du PA, nous permettent d'émettre quelques hypothèses quant au rôle de la PLD dans ce processus. Dans un premier temps, la PLD2 déjà présente à la membrane plasmique, est susceptible de jouer un rôle dans la signalisation, peut-être par la stimulation de la production de PI(4,5)P₂ par la PI(4)P5 Kinase ou dans le recrutement de protéines comme RCP/Rab11 ou des protéines SNARE comme la syntaxin ou la SNAP23, l'isoforme de la SNAP25 présente dans les macrophages. Dans un second temps, la signalisation issue de la reconnaissance de la particule par les récepteurs FcR engendre le recrutement de vésicules des compartiments endosomaux afin de permettre l'extension des pseudopodes, parmi lesquelles des vésicules PLD1 positives. La PLD1 est susceptible de jouer un rôle dans le recrutement, par son activation potentielle de ARF6 et dans la phase d'exocytose de ces vésicules au niveau de la membrane du phagosome en facilitant la fusion entre membranes, fonctions susceptibles d'être remplies aussi par la PLD2. De plus, la production de PA au cours de la maturation du phagosome pourrait jouer un rôle dans les événements de fusion/fission nécessaires aux interactions avec la voie endosomale. Le PA pourrait aussi réguler Rab11 qui joue un rôle dans le recyclage de peptides issus de la dégradation par les endosomes de recyclage. Par ailleurs, le rôle des différentes isoformes de la PLD dans la stimulation de la production de PI(4,5)P₂ ou dans la régulation de ARF6 est susceptible d'entraîner des boucles de rétroaction positive dans la mesure où ces deux éléments sont également des régulateurs connus de l'activité de la PLD, provoquant ainsi une amplification du signal aboutissant à l'internalisation de la particule par phagocytose. La PLD semble en mesure de réguler divers aspects de la signalisation et du trafic membranaire au cours de la phagocytose. Les interactions de la PLD avec certains phosphoinositides, les GTPases Rho et ARF peuvent participer à la régulation de la PLD au cours de la phagocytose séparément, à différentes étapes de la phagocytose ou en synergie au cours du processus. Par ailleurs, d'autres régulateurs de la PLD sont connus, comme les GTPases de la famille Ral, mais n'ont pas encore été impliqués dans le processus de phagocytose. Seule l'étude systématique de ces régulateurs permettrait de déterminer lesquels jouent effectivement un rôle dans la régulation de la PLD au cours de la phagocytose.

RESULTATS II

IMPLICATION DES GTPASES RAL DANS LA PHAGOCYTOSE

I. Introduction aux GTPases Ral

Les GTPases Ral régulent la PLD dans divers types cellulaires en synergie avec ARF6 (Luo et al., 1998) un régulateur du recrutement de membrane au cours de la phagocytose. Les GTPases Ral, par l'intermédiaire d'effecteurs comme l'exocyste ou la RalBP1, sont également impliquées dans le trafic membranaire et le réarrangement du cytosquelette d'actine (van Dam and Robinson, 2006), deux fonctions participant à la mise en place du phagosome. Bien que les GTPases Ral n'aient pour l'instant pas été impliquées dans la phagocytose, ces différentes fonctions en font un candidat intéressant pour la régulation du processus de phagocytose.

1. Structure des GTPases Ral

Les protéines RalA et RalB font partie de la superfamille des GTPases Ras, connues pour être des proto-oncogènes, et partagent 85% d'identité. Les GTPases Ral alternent, comme toutes les GTPases entre un état inactif, lié au GDP, et un état actif, lié au GTP (Takai et al., 2001) (voir Figure 6 sur le cycle des GTPases). Leur structure primaire met en évidence un certain nombre de domaines de liaison avec des lipides et d'interaction avec divers effecteurs, en particulier la PLD, la RalBP1 et deux membres de l'exocyste (Figure 17). Des domaines d'interaction avec les effecteurs sont présents sur les deux isoformes bien que quelques différences de régulation existent au niveau C-terminal, notamment la sérine 194 de RalA, phosphorylable par la kinase Aurora A.

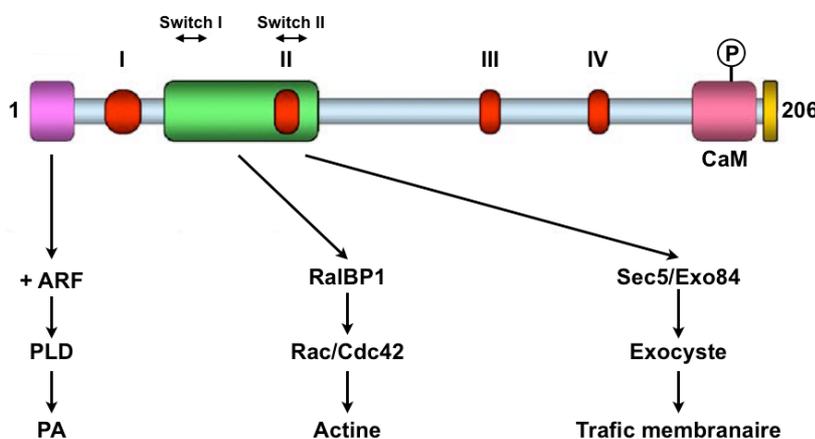


Figure 17 : Structure primaire des GTPases Ral (adapté de (van Dam and Robinson, 2006)). Les domaines I à IV forment le site de liaison du GTP. P représente la Sérine 194. Les domaines switch changent de conformation suite à la liaison au GTP et participent à l'activation des effecteurs. CaM : Calmoduline.

2. Activation des GTPases Ral

L'activation des GTPases Ral est régulée par des GEF principalement dépendantes de voies de signalisation impliquant Ras, telle que l'activation de récepteurs Tyrosine kinase, de récepteurs couplés aux protéines G ou encore de second messagers intracellulaires comme le calcium ou le DAG (Feig, 2003). L'activation de GEFs de Ral peut aussi être Ras-indépendante (Bhattacharya et al., 2002). Une voie supplémentaire de régulation de Ral peut aussi passer par la calmoduline et l'activation par le calcium (Wang et al., 1997).

a. La stimulation de Ral par Ral-GDS

Ral GDS (Ral GDP Dissociation Stimulator) est une GEF de Ral caractérisée pour son homologie avec des GEF de Ral chez la levure et présentant une interaction avec les deux isoformes de Ral (Albright et al., 1993). D'autres GEF de Ral ont été mises en évidence, comme Rgl, Rlf et Rgr (pour revue voir (Feig et al., 1996). Cependant, seule la régulation par Ral-GDS sera discutée.

La surexpression de Ras entraîne une augmentation de l'activité de GEF de Ral-GDS illustrant cette voie de signalisation (Urano et al., 1996). L'activation de Ral-GDS peut se faire par une interaction directe avec Ras (White et al., 1996) qui entraîne ainsi la translocation de Ral-GDS au niveau de la membrane plasmique et donc le recrutement et l'activation de Ral (Kishida et al., 1997). Cette régulation a pu être observée dans divers types cellulaires dont les cellules COS où Ras présent à la membrane plasmique entraîne la translocation et l'activation de Ral-GDS et donc de Ral au niveau de la membrane plasmique (Matsubara et al., 1999). Par ailleurs, l'activation de Ral-GDS peut être indépendante de la voie Ras. En effet, l'activation de la PI(3) Kinase permet la phosphorylation de la PDK1 (un effecteur de la PI(3) Kinase) qui entraîne son interaction avec Ral-GDS. Cette interaction semble avoir pour conséquence l'ouverture de Ral-GDS et la libération de son domaine effecteur ce qui permet l'activation de Ral (Tian et al., 2002). Ainsi, l'activation de Ral-GDS peut se faire directement par la voie Ras ou indirectement par l'activation de la voie PI(3) Kinase/ PDK1 et entraîne la translocation de Ral-GDS et l'activation de Ral.

b. La régulation par la calmoduline

Le lien entre calmoduline (CaM) et Ral a été mis en évidence par chromatographie d'affinité qui a permis la découverte d'une protéine de 28kDa définie comme étant RalA (Wang et al., 1997). Des expériences *in vitro* ont ensuite pu montrer la pertinence du calcium et de la CaM dans l'activation de Ral (Park, 2001). Des expériences de double hybride et d'immunoprécipitation ont également montré l'interaction entre Ral et la CaM et ont permis de déterminer que plusieurs sites de liaison à la CaM sont présents sur les Ral avec un seul site calcium dépendant (Clough et al., 2002). L'activation de Ral dans des neutrophiles par une stimulation au fMLP, un peptide chimiotactique, semble également partiellement dépendante du calcium comme le montre la déplétion en calcium dans ces cellules (M'Rabet et al., 1999). RalA participe également à l'exocytose calcium dépendante de vésicules de sécrétion dans des cellules endothéliales. Cette sécrétion peut être inhibée par la trifluoperazine, un inhibiteur de la CaM, qui inhibe également l'activation de RalA dans ces cellules (de Leeuw et al., 2001). Dans des cellules HeLa, la PLC δ 1 forme un complexe inhibiteur avec la CaM. La stimulation des cellules entraîne l'entrée de calcium et le recrutement de Ral dans le complexe inhibiteur PLC/CaM par une affinité plus importante entre CaM et Ral. Ral, activée par la CaM peut alors activer la PLC reversant ainsi l'effet inhibiteur de la CaM (Sidhu et al., 2005). L'ensemble de ces expériences démontrent une régulation de Ral par le calcium et la CaM.

3. Fonctions cellulaires

Parmi les fonctions des GTPases Ral, on trouve en plus de l'oncogénèse, la prolifération cellulaire (Chien and White, 2003), la migration cellulaire (Gildea et al., 2002), la régulation de la formation de filopodes (Sugihara et al., 2002), la différenciation (de Ruyter et al., 2000), la réorganisation du cytosquelette (Bhattacharya et al., 2002), le transport vésiculaire (Moskalenko et al., 2002), l'exocytose de vésicules synaptiques (Polzin et al., 2002) ou encore l'endocytose de récepteurs (Nakashima et al., 1999; Jullien-Flores et al., 2000). Parmi ces fonctions, seules les plus pertinentes pour mon sujet de recherche seront détaillées, comme la réorganisation du cytosquelette, le transport vésiculaire ou encore l'exocytose qui sont susceptibles de jouer un rôle au cours de la phagocytose .

a. Réarrangement du cytosquelette d'actine

L'activation de la RalBP1 permet aux Ral de moduler directement le cytosquelette d'actine. En effet, la RalBP1 possède une activité GAP pour Rac et Cdc42 (Cantor et al., 1995; Jullien-Flores et al., 1995; Park and Weinberg, 1995). Un rôle de la RalBP1 a été mis en évidence dans le maintien de l'intégrité de l'œuf pendant la gastrulation chez le xénope (Lebreton et al., 2004). Pendant le développement de l'œil chez la drosophile, Ral semble contrôler l'activité de RhoA (Sawamoto et al., 1999) dans la régulation de l'actine. La formation de lamellipodes semble également dépendante de l'activation de la RalBP1 par RalA (Takaya et al., 2004). RalA-GTP peut également lier et activer la filamine, une protéine de réticulation de l'actine capable de relier l'actine et les membranes, pour induire la formation de filopodes sans passer par une activation préalable de Cdc42 qui régule normalement ce processus (Ohta et al., 1999). De plus, dans des cellules cancéreuses, la migration dépendante du réarrangement du cytosquelette d'actine, est inhibée par la déplétion de RalB (et non RalA) qui provoque la disparition de fibres d'actines observées pendant la migration (Oxford et al., 2005).

Ainsi, les GTPases Ral sont susceptibles de réguler le cytosquelette d'actine dans différents processus tels que formation d'extensions membranaires ou migration cellulaire par des voies agissant directement sur la voie Rac/Cdc42 ou RhoA, ou indirectement par l'activation de la filamine qui stimule la réticulation de filaments préexistants. L'activité GAP de la RalBP1 inhibe la polymérisation de l'actine en inactivant les GTPases Rho. L'apparent paradoxe entre le rôle négatif de Ral sur les GTPases Rho et leur implication dans des phénomènes nécessitant des réarrangements de l'actine comme l'extension de filopodes peut s'expliquer par la nécessité pour ces processus d'une dynamique de l'actine et pour les GTPases de cycler entre leur état actif et inactif pour remplir leur fonction. Les Ral participeraient donc à la modulation d'un processus dynamique de réarrangement de l'actine.

b. Trafic membranaire

Le premier argument pour un rôle de Ral dans le trafic vésiculaire est sa localisation. En effet, Ral est capable de cycler entre la membrane plasmique et des compartiments vésiculaires intracellulaires d'endocytose et d'exocytose comme par exemple des vésicules synaptiques (Ngsee et al., 1991; Bielinski et al., 1993) ou encore des granules denses de plaquettes humaines (Mark et al., 1996). Le rôle de Ral dans des phénomènes de trafic vésiculaire, est principalement lié à son interaction avec le complexe de l'exocyste (Brymora et al., 2001; Moskalenko et al., 2002; Polzin et al., 2002), un complexe de 8 protéines mis en évidence chez la levure, puis caractérisé chez les mammifères (Kee et al., 1997) et jouant un rôle dans le recrutement et l'arrimage de vésicules au niveau de sites d'exocytose (Figure 18).

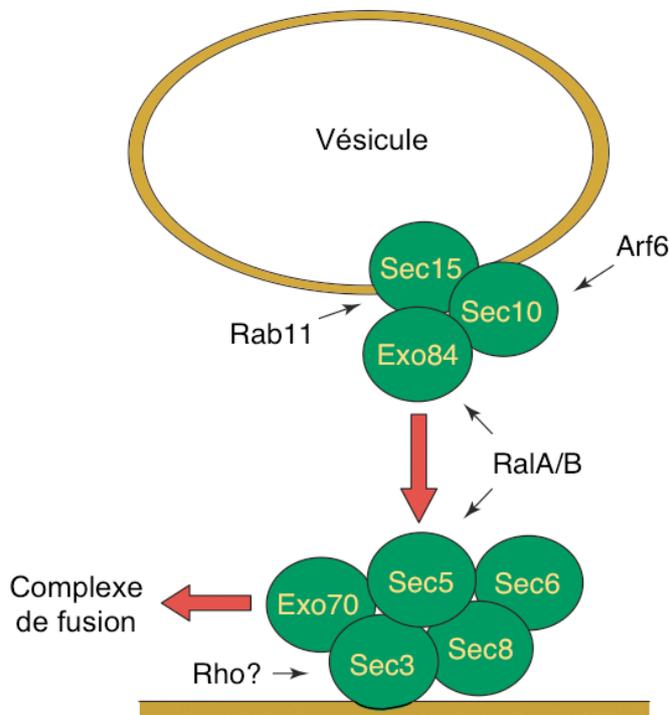


Figure 18 : Le complexe de l'exocyste (adapté de (Camonis and White, 2005)). Le complexe est formé de 8 protéines. Le modèle proposé se présente sous la forme de deux sous-complexes dont l'assemblage par interaction entre Exo84 (vésiculaire) et Sec5 (membranaire) est régulé par RalA et RalB. Les autres interactions montrées permettent de voir que l'exocyste est régulé de façon précise. De plus, Rab11 et ARF6 sont connus pour leur rôle dans le trafic membranaire.

Sec5 et Exo84 interagissent donc directement de façon GTP dépendante avec RalA ou RalB (Moskalenko et al., 2002; Moskalenko et al., 2003; Jin et al., 2005), indiquant que l'activation de Ral régule la formation du complexe de l'exocyste. Dans des cellules épithéliales, la déplétion de RalA entraîne le désassemblage du complexe et interfère avec le recrutement de protéines spécifiques vers la membrane basolatérale alors que RalB intervient dans la survie cellulaire (Moskalenko et al., 2002). La régulation de l'exocyste par RalA joue aussi un rôle dans l'exocytose de vésicules au niveau de sites spécifiques dans des cellules neuroendocrines (Moskalenko et al., 2002; Moskalenko et al., 2003) ou encore le recrutement de vésicules synaptiques au niveau des sites d'exocytose où Ral pourrait participer à la

plasticité synaptique (Polzin et al., 2002). Pour appréhender la complexité du fonctionnement de Ral dans ce phénomène, il est intéressant de noter que la surexpression de RalB catalytiquement actif ne modifie pas l'apport vésicules vers la membrane basolatérale, suggérant que seul RalA régule ce phénomène. En revanche, dans le cas de la migration cellulaire, RalB semble être le régulateur de l'exocyste nécessaire à l'apport de membrane au niveau du site de migration (Rosse et al., 2006). Ral participe donc à de nombreux événements de recrutement de membrane dans divers types cellulaires et les deux isoformes de Ral régulent l'exocyste dans différentes fonctions.

Ral pourrait jouer un rôle au cours de la phagocytose par l'intermédiaire de la régulation de la PLD. Les GTPases Ral sont capables d'interagir avec la PLD et ARF6 pour former un complexe actif (Luo et al., 1998). Or, ARF6 a été impliqué dans le recrutement de membrane au cours de la phagocytose (Niedergang et al., 2003) et la PLD pourrait participer à la régulation de ce phénomène. De plus, la PLD semble jouer un rôle dans les étapes tardives de l'exocytose régulée (Humeau et al., 2001; Vitale et al., 2001) et sa régulation dans ce contexte peut dépendre de ARF6 et de RalA (Vitale et al., 2002; Vitale et al., 2005). Ral est donc susceptible de participer à la fusion de vésicules avec la membrane du phagosome. Là encore, la régulation de la fusion membranaire impliquant la PLD au cours de la formation ou la maturation du phagosome, telle qu'elle est décrite dans le chapitre précédent, pourrait impliquer les GTPases Ral en amont de la PLD (Corrotte et al., 2006).

4. Objectifs

Dans le contexte des différents rôles de Ral dans la réorganisation de l'actine et la régulation du trafic membranaire, il est possible que Ral soit impliqué également dans la régulation de la phagocytose, dans la mesure où ce processus nécessite ces deux aspects pour la formation du phagosome. **Nous avons donc cherché à démontrer un rôle des GTPases Ral dans le processus de phagocytose**, tout d'abord en utilisant des outils moléculaires permettant la diminution de l'expression des deux isoformes ainsi que des formes mutées ou non pour quantifier la phagocytose et mesurer leur apport dans ce phénomène. Nous avons cherché à caractériser les compartiments cellulaires où sont localisés RalA et RalB, à observer leur dynamique de localisation ainsi que leurs effecteurs connus au cours de la phagocytose.

II. Résultats sur les GTPases Ral

Les protocoles expérimentaux appliqués dans les expériences suivantes sont décrits dans l'Annexe 2 : Matériels et Méthodes (page 101).

1. Présence et activation des GTPases Ral au cours de la phagocytose

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence la présence et l'activation des GTPases Ral dans les cellules RAW 264.7 au repos et stimulées par des billes de latex de 3 μ m recouvertes d'IgG qui déclenchent la phagocytose par les récepteurs FcR. Pour détecter les formes actives, liées au GTP, nous avons utilisé une approche par "pull-down", c'est-à-dire l'utilisation d'un domaine de liaison aux Ral-GTP pour précipiter RalA et RalB actives. Les résultats sont présentés dans la Figure 19. RalA et RalB sont déjà activées à 5 minutes et cette activation augmente au moins jusqu'à 20 minutes. Les deux isoformes de Ral sont donc présentes dans les macrophages murins et sont activées au cours de la phagocytose.

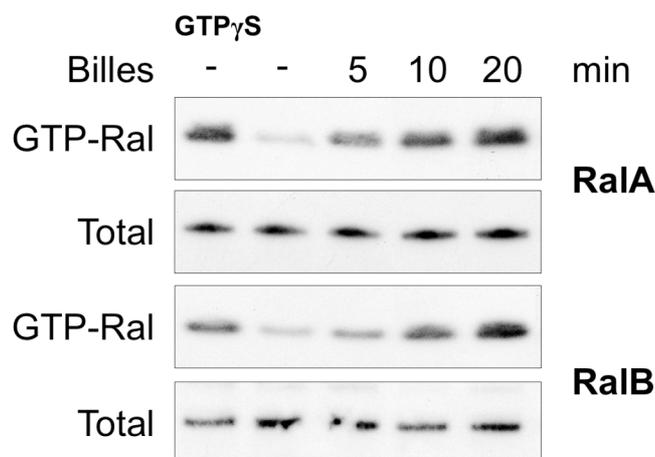


Figure 19 : Activation des GTPases Ral au cours de la phagocytose. Précipitation des formes GTP de RalA et RalB dans des cellules stimulées ou non pour la phagocytose avec des billes couplées aux IgG pendant 5, 10 ou 20 minutes. Les cellules sont lysées et les extraits incubés avec le domaine de liaison aux Ral-GTP de la RalBP1. Les lysats des cellules non stimulées incubés avec du GTP γ S servent de contrôle positif. Les précipités sont ensuite analysés par immunoréplique avec des anticorps dirigés contre RalA et RalB et montrent la quantité de Ral-GTP présente dans chaque condition. En parallèle, 1 à 2% des extraits (10 μ g de protéines pour RalA et 20 μ g pour RalB) sont analysés, la quantité totale de RalA et RalB reste relativement constante.

2. Localisation et dynamique des GTPases Ral au cours de la phagocytose

La localisation des GTPases Ral a été étudiée au cours de la phagocytose. En raison du manque d'anticorps dirigés contre la protéine RalB utilisable en immunohistochimie, nous présentons uniquement les résultats obtenus pour RalA endogène (Figure 20A). Dans les macrophages, RalA endogène se présente sous la forme de points dispersés à travers le cytoplasme, parfois soulignant la membrane plasmique, suggérant un compartiment vésiculaire. Au cours de la phagocytose, le marquage de RalA est concentré au niveau du phagosome à des temps courts (5 minutes) comme le montre l'augmentation de fluorescence autour des billes en voie d'internalisation. 30 minutes après l'internalisation des particules, le marquage de RalA semble plus faible autour du phagosome. Afin de disposer d'outils moléculaires fiables pour l'étude du rôle des GTPases Ral au cours de la phagocytose, nous avons examiné la localisation de constructions de RalA et RalB couplées à un "tag" myc ou à la GFP dans des macrophages après fixation. La localisation de RalA-myc ou RalA-GFP dans les cellules RAW 264.7 se répartit entre des structures cytoplasmiques ponctuées ou floues et la membrane plasmique. Au cours de la phagocytose, RalA-myc ou RalA-GFP sont présentes au niveau du phagosome en formation après 5 minutes de phagocytose, mais semblent disparaître de la plupart des phagosomes après fermeture et internalisation, comme le suggère la diminution du marquage sur les phagosomes internalisés.

Les constructions RalB-myc et RalB-GFP sont localisées principalement à la membrane plasmique et dans des structures cytoplasmique ponctuées suggérant comme pour RalA un compartiment vésiculaire (Figure 20B). RalB-myc et RalB-GFP sont présentes au niveau du site de phagocytose pendant la formation du phagosome mais leur marquage diminue au niveau de la membrane des phagosomes internalisés.

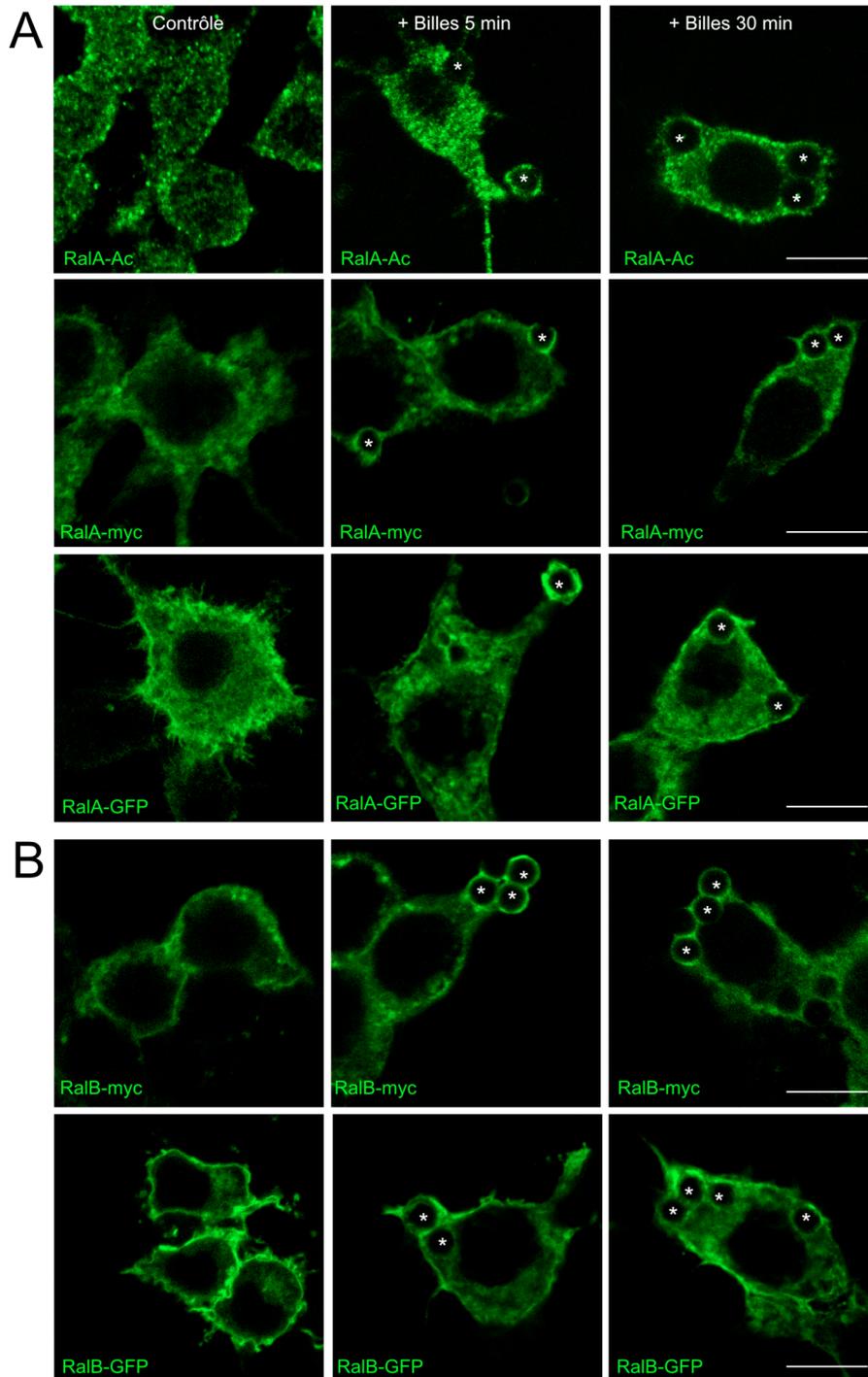


Figure 20 : Localisation de RalA et RalB dans les cellules RAW 264.7. Images confocales de macrophages stimulés ou non avec des billes couplées avec des IgG pendant 5 ou 30 minutes. A) Immunomarquages dirigés contre RalA (RalA-Ac) et myc (RalA-myc) et cellules transfectées avec RalA-GFP. B) Immunomarquage de RalB-myc et cellules transfectées RalB-GFP. Les * indiquent les billes en voie d’internalisation. Barres = 10µm.

Pour déterminer la dynamique de RalA et RalB, nous avons réalisé des séries d’images confocales de macrophages vivants au cours de la phagocytose. Dans les cellules vivantes, la nature vésiculaire du compartiment intracellulaire marqué par RalA et RalB est plus évidente que dans les cellules fixées. Dans la Figure 21A, RalA est présente à la

membrane plasmique et sur des vésicules intracellulaires. Lors de l'internalisation de particules RalA est recrutée au niveau du phagosome en formation, surlignant de façon intense la particule lors de la formation de la cupule (têtes de flèche). Puis, au moment de la fermeture du phagosome, la partie interne du phagosome perd le marquage de RalA-GFP (flèches) qui disparaît au fur et à mesure de la membrane du phagosome jusqu'à l'internalisation complète. Il est à noter que la membrane des phagosomes internalisés est plus faiblement marquée que les vésicules intracellulaire positives pour RalA. Dans le cas de RalB-GFP, le marquage est similaire à RalA mais plus intense à la membrane plasmique que sur les vésicules intracellulaires (Figure 21B). Au cours de la phagocytose, le marquage est concentré au niveau de la cupule par rapport à la membrane plasmique, et RalB entoure progressivement la particule jusqu'à la fermeture du phagosome. Dès lors, le marquage de RalB-GFP diminue au niveau de la membrane du phagosome au fur et à mesure de son internalisation, de la même façon que RalA-GFP.

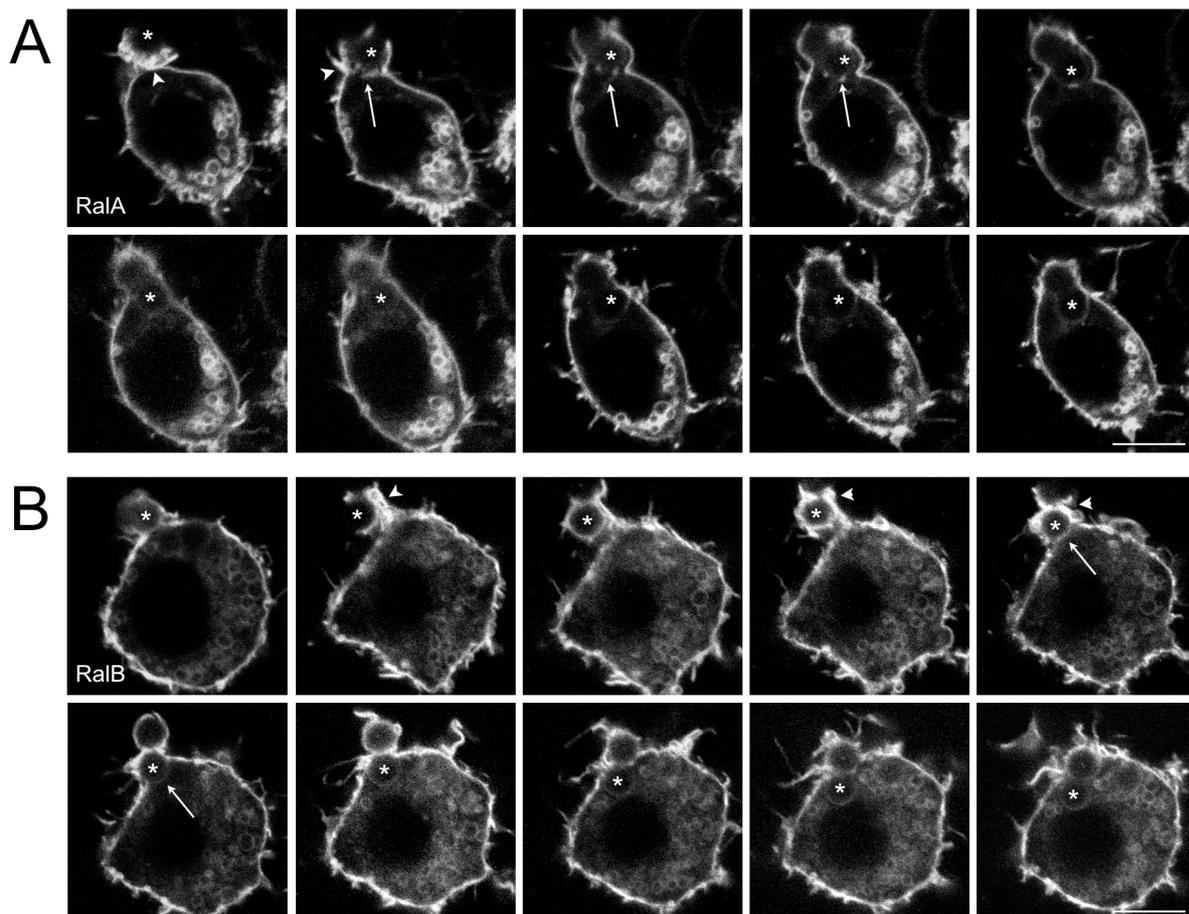


Figure 21 : Dynamique des GTPases Ral au cours de la phagocytose. Séries d'images confocales de cellules vivantes exprimant RalA-GFP (A) ou RalB-GFP (B) et stimulée avec des billes couplées à des IgG. Les * indiquent les billes en voie d'internalisation, les têtes de flèches indiquent le marquage plus intense et les flèches la baisse du marquage. Les images ont été prises environ toutes les minutes. Barre = 10µm.

Ces résultats, en accord avec nos précédentes observations, suggèrent que les GTPases Ral sont recrutées au niveau du site de phagocytose puis sont progressivement exclues du phagosome après son internalisation. Dans l'ensemble ces résultats suggèrent un rôle de RalA et RalB dans les premières étapes de la phagocytose.

3. Détermination des compartiments intracellulaires de RalA et RalB

Afin de déterminer les compartiments contenant RalA et RalB nous avons utilisé une approche par co-expression de RalA ou RalB-GFP avec la cathepsin D-RFP ou l'ajout dans les cellules transfectées de transferrine ou de LysoTracker. La transferrine est caractéristique des endosomes précoces et de recyclage et le LysoTracker est dirigé dans les endosomes tardifs et les lysosomes. La cathepsin D est une enzyme spécifique des lysosomes (Figure 22). Dans les cellules vivantes contrôles transfectées avec RalA-GFP, RalA est présente à la membrane plasmique et sur des vésicules marquées avec la cathepsin D et le LysoTracker et peu avec la transferrine. Dans le cas de RalB, le même type de marquage est observé dans les cellules contrôles qu'avec RalA. Cependant, après stimulation, RalA et RalB semblent être partiellement co-localisés avec la transferrine, ce qui suggère qu'en plus de la membrane plasmique et des endosomes tardifs et des lysosomes, les protéines Ral pourraient s'associer à une population d'endosomes de recyclage. Dans les cellules stimulées, les compartiments vésiculaires marqués par RalA et RalB sont parfois présentes à proximité des phagosomes internalisés. Dans l'ensemble, ces résultats confirment une localisation des deux isoformes des GTPases Ral entre la membrane plasmique et un compartiment vésiculaire de la voie endosomale, principalement les endosomes tardifs et les lysosomes. Cette localisation semble dynamique et pourrait dépendre de l'état d'activation de la cellule comme le montre la colocalisation partielle observée avec la transferrine dans les cellules stimulées.

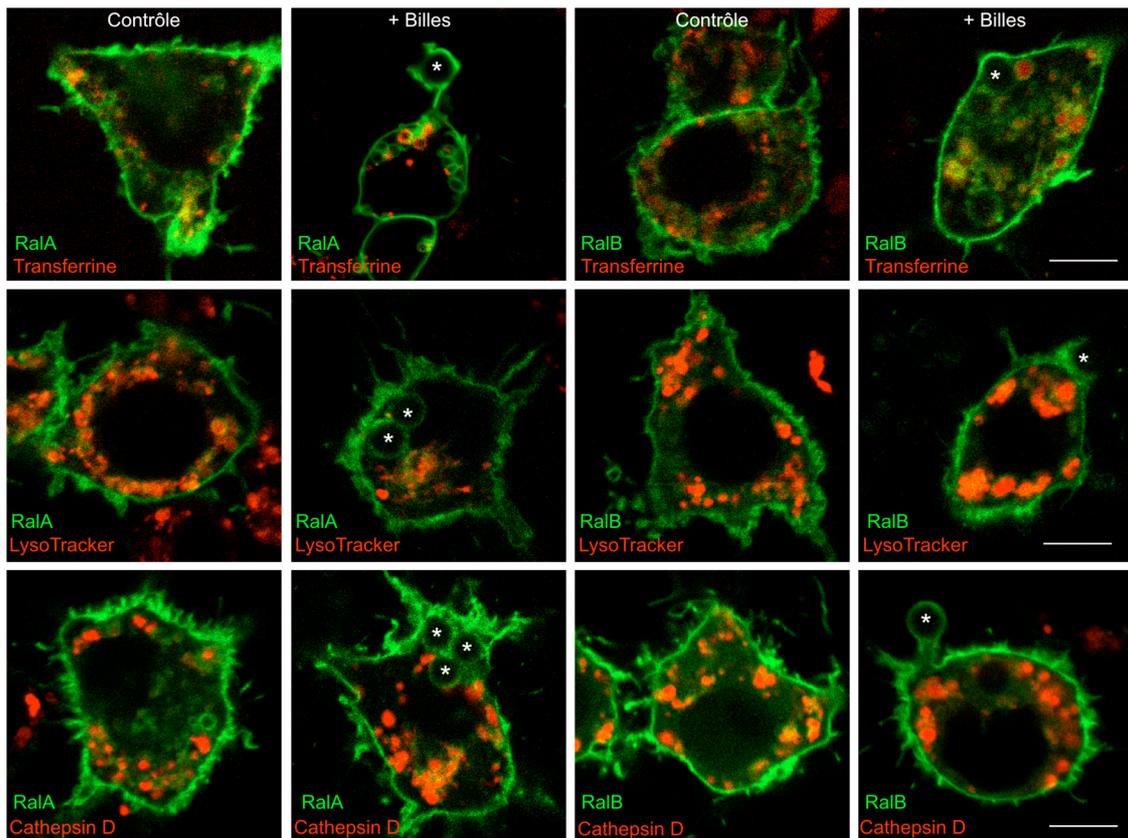


Figure 22 : Identification des compartiments intracellulaires des GTPases Ral. Images confocales de macrophages vivants transfectés avec RalA-GFP ou RalB-GFP. Les macrophages sont soit co-transfectés avec la cathepsin D-RFP ou incubés préalablement avec de la transferrine-Alexa-568 ou du LysoTracker DND99. Les macrophages sont au repos (contrôle) ou stimulés par des billes couplées à des IgG. Les * indiquent les billes en voie d'internalisation. Barre = 10 μ m.

La localisation périphérique des GTPases Ral suggère un lien avec le cytosquelette d'actine qui se présente sous la forme d'un réseau cortical sous la membrane plasmique dans les macrophages. Afin de déterminer si les GTPases Ral sont co-localisées avec l'actine dans ces cellules, nous avons réalisé un marquage de l'actine filamentaire avec de la phalloïdine couplée à la Rhodamine dans des cellules transfectées avec RalA-GFP ou RalB-GFP et stimulées ou non pour la phagocytose. Les résultats présentés dans la Figure 23 montrent qu'une partie de RalA et RalB est présente à la membrane plasmique dans les cellules au repos. Les deux isoformes colocalisent partiellement avec l'actine filamentaire en bordure des cellules au repos. Dans les cellules stimulées, l'actine filamentaire présente un marquage plus intense au niveau de la cupule de phagocytose et présente une co-localisation avec RalA et RalB dont le marquage est également plus intense autour du phagosome naissant.

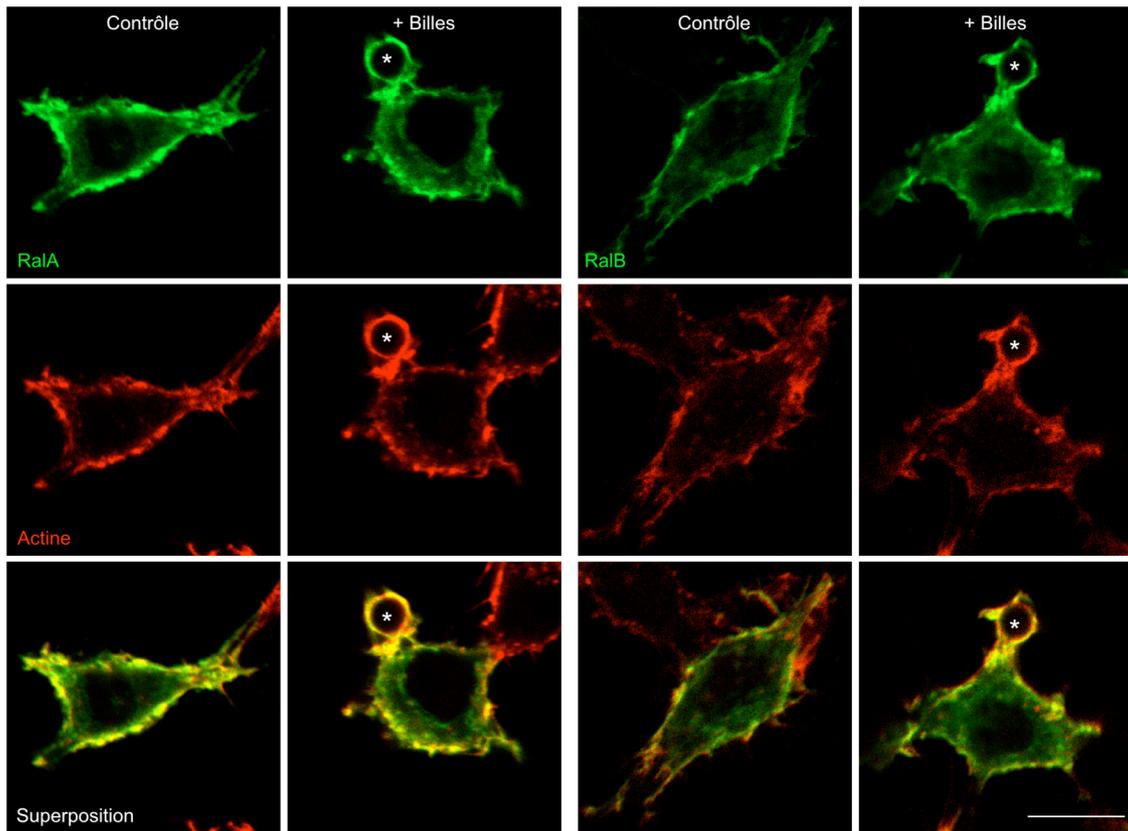


Figure 23 : Co-localisation des GTPases Ral avec le cytosquelette d'actine. Images confocales de cellules transfectées avec RalA ou RalB-GFP. Les cellules sont au repos (contrôle) ou incubées en présence de billes couplées à des IgG. Après fixation, l'actine filamentaire est marquée avec de la Phalloïdine couplée à la Rhodamine. Les * indiquent les billes internalisées. Barre = 10 μ m.

Dans l'ensemble, ces résultats sur la localisation des GTPases Ral montrent que RalA est localisée sur un compartiment d'endosomes tardifs et co-localise partiellement avec l'actine corticale dans des cellules RAW 264.7. RalB est également présente sur des vésicules de type endosomes tardifs et lysosomes mais co-localise également avec des endosomes précoces dans des cellules stimulées. Une partie importante des GTPases Ral semble co-localisée avec l'actine corticale en périphérie des cellules. Ces résultats suggèrent que RalA et RalB pourraient jouer un rôle dans le trafic membranaire par leur présence sur des vésicules intracellulaires et dans le réarrangement du cytosquelette par leur localisation en périphérie cellulaire au moment de la formation du phagosome.

4. Effet et localisation de différents mutants de RalA et RalB au cours de la phagocytose

Afin de déterminer l'implication des GTPases Ral au cours de la phagocytose, les macrophages ont été transfectés avec des constructions sauvages (WT) ou mutantes constitutivement actives (CA) ou catalytiquement inactives (DN) de RalA et RalB et la phagocytose est quantifiée suite à ces transfections. Dans la Figure 24A, RalA CA et RalA DN présentent une localisation intracellulaire ponctuée de type vésiculaire et parfois en périphérie cellulaire semblable à celle observée pour la forme sauvage. Dans le cas de RalB CA et DN le marquage est principalement localisé à la membrane plasmique et présente également une forme ponctuée cytoplasmique comme dans le cas de la forme sauvage. Ces observations suggèrent que la localisation des formes CA et DN des GTPases Ral ne présente pas de différences significatives avec les formes sauvages.

La quantification de la phagocytose dans ces cellules se fait en comparant le nombre de billes internalisées entre les cellules transfectées et les cellules non transfectées dans les mêmes champs. Des cellules contrôles sont transfectées avec la GFP pour vérifier que la transfection des cellules n'interfère pas avec la fonction phagocytaire. Les quantifications sont résumées dans les graphiques de la Figure 24B. La surexpression de RalA sauvage entraîne une augmentation de la phagocytose entre $34,2\% \pm 6,4$ à 5 minutes et $30,6\% \pm 3,1$ à 30 minutes, la construction constitutivement active une augmentation de $35,4\% \pm 3$ à 5 minutes et $33,5\% \pm 7,1$ tandis que le mutant inactif inhibe la phagocytose de $28,4\% \pm 1,6$ à 5 minutes et $25,8\% \pm 4$ à 30 minutes. Dans le cas de RalB, la surexpression de RalB sauvage, active ou inactive conduit à une inhibition de la phagocytose de 20 à 40% (WT: $20,9\% \pm 5,9$ à 5 minutes et $23,6\% \pm 2,5$ à 30 minutes. CA : $38,3\% \pm 12,8$ à 5 minutes et $34,1\% \pm 6,5$ à 30 minutes. DN : $33\% \pm 3,7$ à 5 minutes et $27,5\% \pm 9,8$ à 30 minutes). Ces constructions inhibent partiellement la capacité phagocytaire des macrophages et les résultats indiquent que RalA semble jouer un rôle positif au cours de la phagocytose tandis que RalB joue un rôle négatif. L'inhibition de la forme inactive de RalB pourrait être due à un besoin de la protéine d'alterner entre état actif et inactif pour jouer son rôle dans la phagocytose.

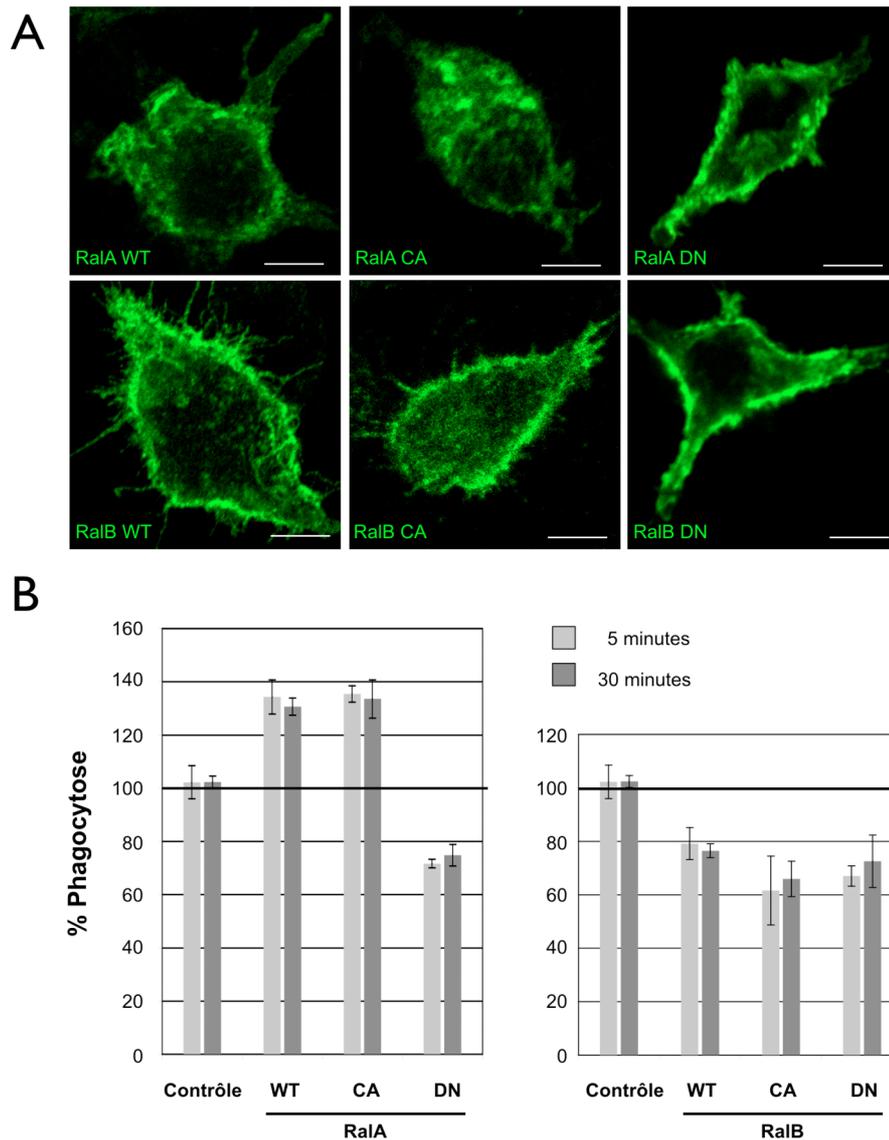


Figure 24 : Effet de RalA et RalB sauvages et mutées sur la capacité phagocytaire. A) Images confocales de macrophages transfectés avec la GFP seule (contrôle) ou les formes sauvages (WT), constitutivement actives (CA) ou inactives (DN) de RalA et RalB (couplées au tag myc), révélées avec un anticorps anti-RalA et anti-myc respectivement. Barre = 10µm B) Quantification de la phagocytose dans les cellules transfectées avec les différentes constructions RalA et RalB. La capacité phagocytaire des cellules transfectées est présentée en pourcentage de phagocytose par rapport aux cellules non transfectées dans les mêmes champs. Les barres d'erreurs représentent les erreurs-types et les % représentent la moyenne de trois expériences indépendantes dont les variations sont significatives (test de Student $P < 0,05$).

5. Effet de la déplétion de RalA et RalB endogènes sur la phagocytose

Afin de confirmer le rôle des GTPases Ral dans la phagocytose, nous avons inhibé l'expression de RalA et RalB endogènes par des approches d'ARN interférence (ARNi) duplex dont le taux de transfection avoisine les 85%. Dans la Figure 25A, l'inhibition de l'expression de RalA (environ 80%) et RalB (environ 95%) est montrée par immunoréplique d'extraits protéiques totaux de cellules transfectées démontrant l'efficacité des ARNi duplex dirigés contre RalA ou RalB. Les quantifications des effets des ARNi duplex dirigés contre RalA et RalB, sur la capacité phagocytaire sont résumées dans le graphique de la Figure 25B. L'inhibition de l'expression de RalA entraîne une inhibition de la phagocytose (21,6% ± 7 à 5 minutes et 21,9% ± 4,4 à 30 minutes) tandis que l'inhibition de l'expression de RalB conduit à une augmentation du niveau de phagocytose (43,6% ± 10,3 à 5 minutes et 25,9 ± 2,7 à 30 minutes). Lorsque l'expression des deux isoformes de Ral est inhibée, le niveau d'inhibition de la phagocytose se situe entre 15,1% ± 13,3 à 5 minutes et 33,2% ± 2,3 à 30 minutes.

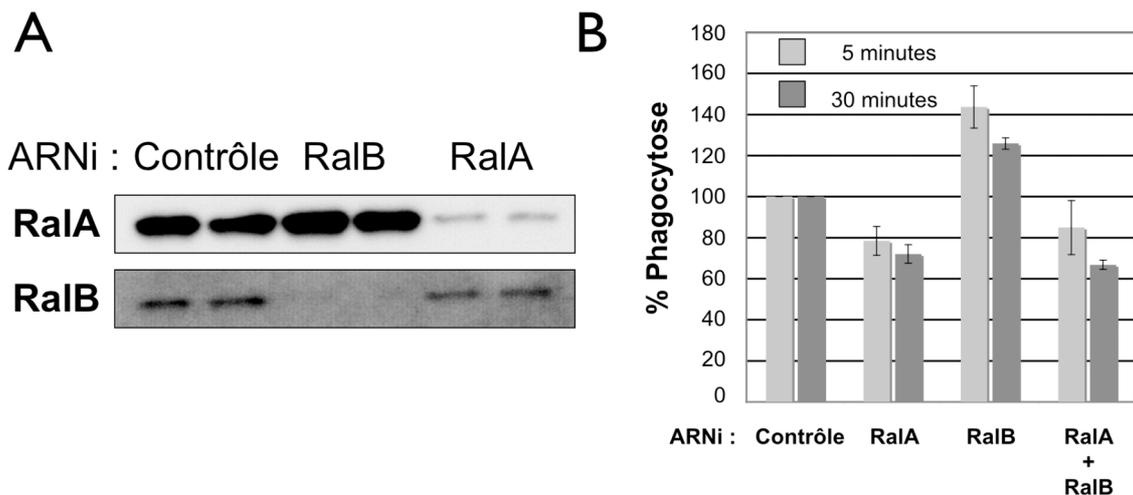


Figure 25 : Implication des GTPases Ral endogènes dans le processus de phagocytose. Les cellules sont transfectées 48h avec des ARNi aléatoires (contrôle) ou dirigés contre RalA ou RalB pour diminuer l'expression de ces protéines. A) Vérification de l'efficacité des ARNi duplex sur l'expression de RalA et RalB endogènes par immunoréplique révélant RalA et RalB. B) Capacité phagocytaire des macrophages transfectés avec des ARNi contrôle ou dirigés contre RalA et/ou RalB, présentée en pourcentage de phagocytose par rapport aux cellules contrôles. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types. Les % représentent 3 expériences indépendantes dont les variations sont significatives (test de Student $P < 0,05$).

Les GTPases Ral endogènes sont donc impliquées dans le processus de phagocytose, avec des effets opposés comme le montraient nos précédentes observations sur les effets des constructions WT et CA de RalA et RalB et suggèrent un rôle positif pour RalA et un rôle négatif pour RalB dans la phagocytose. Les effets partiels des ARNi sur la capacité

phagocytaire suggèrent plutôt un rôle modulateur de RalA et RalB au cours de la phagocytose plutôt qu'un rôle essentiel.

6. L'exocyste, un effecteur potentiel de Ral au cours de la phagocytose

Les différences fonctionnelles entre RalA et RalB au cours de la phagocytose pourraient être dues à l'interaction avec différentes protéines effectrices. C'est pourquoi nous avons tenté d'identifier leurs partenaires. La localisation et l'implication connues des GTPases dans divers types de trafic membranaires, nous ont conduit à explorer la possibilité d'une implication du complexe de l'exocyste, dont les Ral sont des régulateurs connus, au cours de la phagocytose. Pour cela, nous avons déterminé la localisation de Exo84, un membre du complexe localisé généralement sur des compartiments vésiculaires recrutés vers le site d'exocytose. Dans les macrophages, le marquage d'Exo84 se présente sous la forme de points de fluorescence répartis dans le cytoplasme, suggérant une localisation vésiculaire (Figure 26A). Au cours de la phagocytose, Exo84 est observé au niveau des phagosomes en formation, visualisé par une intensification du marquage autour des billes en cours d'internalisation. Après fermeture du phagosome le marquage d'Exo84 semble plus faible autour du phagosome.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à démontrer la formation du complexe au cours de la phagocytose par une approche d'immunoprécipitation suivant le protocole de Rossé et collaborateurs (Rosse et al., 2006). L'immunoprécipitation de Sec8, un membre de l'exocyste présent à la membrane plasmique permet de co-précipiter Exo84, présent sur des vésicules intracellulaires, en cas de formation du complexe. Au repos, en l'absence de formation du complexe, Exo84 n'est pas co-précipité. Nous avons utilisé cette technique sur des macrophages au repos et stimulés pour la phagocytose. Les résultats des immunorépliques sont présentés dans la Figure 26B. Dans les cellules au repos, l'immunoprécipitation de Sec8 permet de détecter les protéines Sec8, Sec5 (un membre de l'exocyste présent à la membrane plasmique avec Sec8) et une faible quantité de Exo84. Dans les cellules stimulées pendant 30 minutes, la quantité de Sec8 et Sec5 précipitée reste stable tandis qu'une quantité plus importante de Exo84 est précipitée, indiquant une interaction accrue entre Sec8 et Exo84 et donc la formation du complexe dans les cellules stimulées. Dans ces précipités, RalA et RalB ont pu être détectés mais ne présentent pas de différences d'interaction en fonction de la stimulation (résultats non présentés). Afin de déterminer l'isoforme de Ral potentiellement

responsable de la régulation de la formation de l'exocyste, nous avons surexprimé RalA-myc ou RalB-myc dans les macrophages et vérifié que les quantités de RalA-myc et RalB-myc dans les extraits totaux étaient similaires (résultats non montrés). Une analyse de la formation du complexe est présentée dans la Figure 26C et montre que les deux GTPases Ral sont co-immunoprécipitées avec Sec8. En condition stimulée, une quantité légèrement plus importante de RalA semble être précipitée, suggérant une interaction plus importante entre RalA et l'exocyste au cours de la phagocytose.

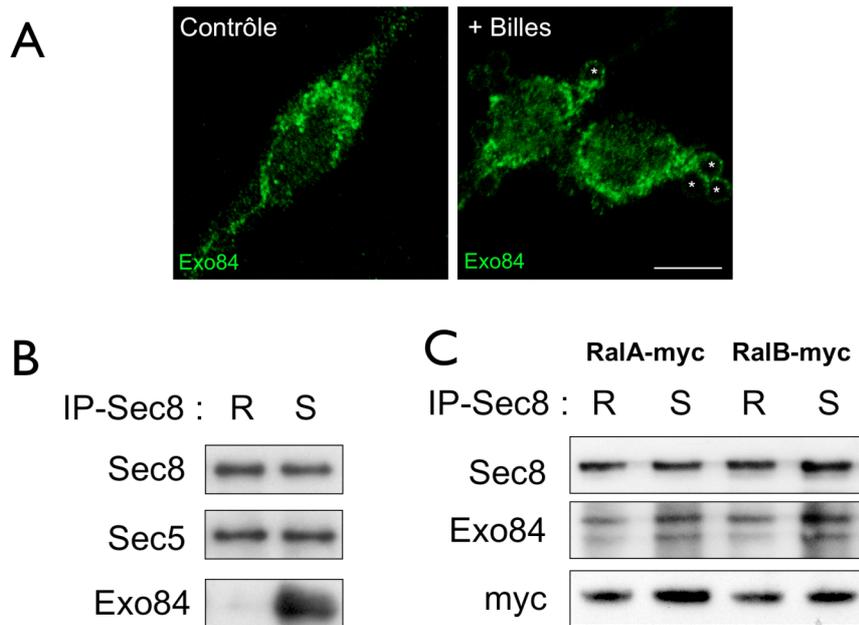


Figure 26 : Formation de l'exocyste au cours de la phagocytose. Les cellules RAW 264.7 sont incubées (+ billes) ou non (contrôle) pendant 30 minutes en présence de billes couplées à des IgG. A) Images confocales de macrophages après immunomarquage de Exo84. Les * indiquent les billes en voie d'internalisation. Barre = 10µm B) Immunoprécipitation de Sec8 dans des macrophages au repos (R) ou stimulés avec des billes-IgG (S). Les immunoprécipités sont analysés par immunoréplique pour la présence de Sec8, Sec5 et Exo84. C) Immunoprécipitation de Sec8 à partir de cellules transfectées avec RalA-myc et RalB-myc, au repos (R) ou stimulées (S) pour la phagocytose. La présence de Sec8, Exo84 et myc est détectée dans les immunoprécipités par immunoréplique.

7. La PLD interagit avec les GTPases Ral au cours de la phagocytose

Dans la mesure où la PLD est un effecteur connu des GTPases Ral et joue un rôle important au cours de la phagocytose, nous avons cherché à mettre en évidence un lien entre ces deux protéines. Pour cela, nous avons transfecté les cellules avec des constructions PLD1-HA et PLD2-HA et effectué une expérience d'immunoprécipitation de ces constructions en

conditions repos et stimulées afin de vérifier l'interaction avec RalA ou RalB. L'immunoréplique de la Figure 27 présente les résultats de l'analyse des immunoprécipités du tag HA. RalA est détectée dans les précipités issus des cellules transfectées avec la PLD1 et la PLD2-HA. Dans les deux cas, la quantité de RalA détectée dans les précipités des cellules au repos est plus importante que dans ceux des cellules stimulées. Il est à noter que la PLD1 est plus faiblement exprimée que la PLD2 mais le rapport entre PLD1 et RalA est environ de 1 tandis que le rapport entre PLD2 et RalA est d'environ 4, indiquant une interaction plus importante avec la PLD1 à des niveaux d'expression similaires. Dans les mêmes conditions, la protéine RalB n'est pas détectée, suggérant une absence d'interaction ou une quantité de RalB trop faible pour être détectée. Nous avons co-transfecté des macrophages avec les constructions PLD1-HA et RalA-myc ou RalB-myc et effectué la même expérience d'immunoprécipitation (résultats non présentés). L'analyse des résultats montre qu'une interaction entre la PLD et RalB est possible dans les conditions de surexpression bien qu'aucune variation n'est observée entre les conditions repos et stimulé.

Transfection : PLD1-HA PLD2-HA

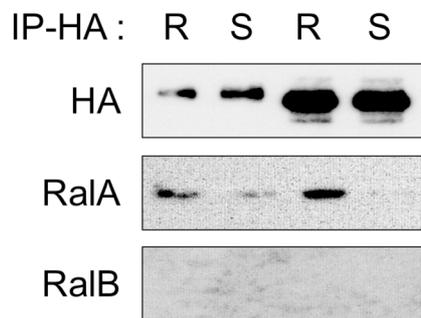


Figure 27 : Interaction entre la PLD et RalA dans des cellules au repos. Immunoprécipitation du tag HA dans des cellules transfectées avec la PLD1-HA ou la PLD2-HA au repos (R) ou stimulées (S). Les immunoprécipités sont analysés par immunoréplique et révélés avec des anticorps dirigés contre le tag HA, RalA et RalB.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les GTPases Ral sont capables d'interagir avec la PLD dans les cellules RAW 264.7 et que RalA semble interagir préférentiellement avec la PLD1 et la PLD2 dans les cellules au repos. Ces résultats préliminaires doivent encore être confirmés.

III. Discussion sur les GTPases Ral au cours de la phagocytose

Nos travaux sur les GTPases Ral dans le cadre de la phagocytose nous ont permis de déterminer que RalA avait un rôle positif sur la phagocytose tandis que RalB avait un rôle négatif lorsqu'elles sont surexprimées, indiquant que les deux isoformes de Ral régulent probablement la phagocytose par l'intermédiaire de différents effecteurs. De plus, dans des cellules vivantes, des constructions de Ral couplées à la GFP sont réparties entre la membrane plasmique et des vésicules intracellulaires faisant partie de la voie endosomale. Les deux formes de Ral cyclent donc entre ces deux compartiments en fonction de l'état d'activation de la cellule. De plus, lors de la phagocytose, les deux formes de Ral sont présentes au niveau du phagosome en formation mais disparaissent du phagosome après fermeture indiquant qu'elles jouent un rôle dans la formation du phagosome. Cette étude est la première à impliquer les GTPases Ral dans le processus de phagocytose.

1. Rôle des GTPases Ral au cours de la phagocytose

Nous avons démontré par l'utilisation d'ARN interférence et de mutants de RalA et RalB que les deux formes de Ral modulaient la phagocytose. RalA semble jouer un rôle positif au cours de la phagocytose dans la mesure où l'inhibition de son expression entraîne une baisse de la phagocytose et sa surexpression une augmentation. Au contraire de RalB qui semble moduler négativement la phagocytose puisque la diminution de son expression entraîne une augmentation de la phagocytose. Il est important de noter que les effets modérés de l'inhibition de RalA et RalB sur la phagocytose indiquent que les GTPases Ral semblent capables de moduler l'activité des macrophages mais ne sont pas essentielles à la phagocytose.

RalA et RalB sont des protéines partageant les mêmes effecteurs et régulateurs. En conséquence, RalA et RalB peuvent réguler les mêmes fonctions bien qu'elles aient souvent été étudiées comme une seule protéine. Cependant, des effets opposés des deux isoformes ont été observés dans diverses études. RalA est responsable de l'apport de vésicules à la membrane basolatérale de cellules épithéliales tandis que RalB régule la survie cellulaire (Moskalenko et al., 2002). Dans certaines formes de cancers, RalA participe à la croissance tumorale et RalB semble plus importante pour la mise en place de métastases (Lim et al., 2006). Dans des cellules cancéreuses RalA régule la prolifération tandis que RalB semble responsable de la survie cellulaire (Chien and White, 2003). Dans ces cellules, l'idée d'une

balance entre les deux isoformes a été proposée, conduisant à l'une ou l'autre fonction (Camonis and White, 2005). Les deux isoformes de Ral jouent donc fréquemment des rôles différents comme dans notre étude.

2. Localisation des GTPases Ral au cours de la phagocytose

La localisation intracellulaire des GTPases Ral n'a pas fait l'objet d'études poussées et nos propres observations ne permettent pas de définir précisément leur compartiment mais indiquent que RalA et RalB se répartissent entre la membrane plasmique et une population de vésicules endosomales et lysosomales. Dans des cellules COS ou HeLa, les GTPases Ral se répartissent entre la membrane plasmique et un compartiment d'endosomes de recyclage au cours du cycle cellulaire, indiquant que leur localisation peut dépendre de l'activité ou du cycle cellulaire (Chen et al., 2006). Dans des cellules PC12, RalA a été décrite comme étant localisée dans des vésicules de sécrétion (Vitale et al., 2005; Li et al., 2007) ou à la membrane plasmique (Vitale et al., 2005) et RalB est décrite également dans ces deux compartiments (Li et al., 2007). Dans une étude sur le recrutement de vésicules au niveau de la membrane basolatérale, les auteurs montrent que RalA et non RalB joue un rôle dans ce processus, expliquant cette différence de fonction par la localisation de RalA au niveau d'endosomes de recyclage tandis que RalB est présente à la membrane (Shipitsin and Feig, 2004).

Selon le type cellulaire et l'état d'activation de la cellule, les deux isoformes de Ral peuvent donc être présentes au niveau de différents compartiments vésiculaires ou la membrane plasmique. Nos propres observations montrent une localisation de RalA et RalB dans ces compartiments. Les différences fonctionnelles observées quant au rôle des GTPases Ral dans la régulation de la phagocytose peuvent dans ce cas être dues à des effecteurs différents.

3. Effecteurs potentiels du rôle négatif de RalB au cours de la phagocytose

Le fait que les deux formes de Ral soient recrutées au niveau de la cupule de phagocytose mais progressivement exclues du phagosome après sa fermeture correspond déjà à une indication de leur fonction potentielle. En effet, lors de la formation du phagosome, différents processus sont nécessaires à l'extension des pseudopodes, dont le réarrangement du

cytosquelette d'actine. Dans ce contexte, les GTPases Ral sont susceptibles de réguler la fonction de la RalBP1 qui possède une activité GAP pour diverses GTPases de la famille Rho, dont Rac et Cdc42 (Cantor et al., 1995), notamment impliqués dans la régulation de l'actine au cours de la phagocytose. Cette activité GAP sous-entend que RalB pourrait suractiver la RalBP1 pour inhiber la polymérisation de l'actine qui entraînerait l'inhibition de la phagocytose. La RalBP1 a été impliquée dans divers processus cellulaires nécessitant des modulations dynamiques de l'actine (Lebreton et al., 2004; Takaya et al., 2004). Nous avons aussi observé que la surexpression de mutants DN de RalB entraînait également une inhibition de la phagocytose, ce qui semble paradoxal. Cependant, il faut considérer que la réorganisation du cytosquelette au cours de la phagocytose est un processus dynamique qui nécessite l'élongation de filaments, la réticulation afin de former des réseaux ainsi que la dépolymérisation de l'actine lors de l'internalisation du phagosome. Il est donc possible que l'activation comme l'inhibition de la fonction de RalB entraîne une inhibition de la phagocytose. Des expériences d'immunoprécipitation de RalA ou RalB permettraient de déterminer si la RalBP1 est bien liée à l'une ou l'autre isoforme et si cette liaison change au cours de la phagocytose. De plus, l'utilisation d'ARNi permettrait de démontrer un rôle de la RalBP1 dans le processus de phagocytose.

4. Effecteurs potentiels du rôle positif de RalA au cours de la phagocytose

Le rôle positif de RalA pendant la phagocytose suggère la régulation d'effecteurs différents que ceux régulés par RalB. Nous proposons deux effecteurs susceptibles de participer à la fonction de RalA, la PLD, qui est connue pour être régulée par Ral en synergie avec ARF6, et l'exocyste, un complexe permettant de recruter des vésicules au niveau de sites d'exocytose. Dans certaines cellules les deux isoformes de Ral sont capables au cours du même processus de réguler à la fois la PLD et l'exocyste comme c'est le cas dans l'arborisation de neurites où RalA régule l'exocyste et RalB la PLD (Lalli and Hall, 2005). Il est donc possible que RalB participe tout de même à la régulation de la PLD, bien que dans ce cas, son effet sur la phagocytose devrait être positif étant donné l'effet de la PLD sur la phagocytose (Corrotte et al., 2006).

Nos expériences d'immunoprécipitation de la PLD montrent une interaction avec RalA endogène dans les cellules au repos et une interaction avec les deux formes de Ral dans les cellules transfectées avec RalA et RalB-myc. De nombreuses études impliquent une cascade de signalisation Ral/PLD, comme dans l'endocytose constitutive de récepteurs au glutamate qui semble dépendante d'une interaction entre Ral et la PLD2 (Bhattacharya et al., 2004). La transformation de cellules entraîne également l'activation de la PLD par RalA (Jiang et al., 1995; Frankel et al., 1999), une activation qui semble être dépendante des GTPases ARF (Kim et al., 1998; Luo et al., 1998) et plus particulièrement ARF6 (Xu et al., 2003). ARF6 a également été impliquée dans la régulation de l'apport de membrane au niveau du phagosome (Niedergang et al., 2003), indiquant la possibilité d'un complexe entre ARF6 et RalA pour l'activation de la PLD. Afin de déterminer la possibilité de cette régulation au cours de la phagocytose, des mutants de ARF6 incapable de lier la PLD pourraient être utilisés dans des cellules phagocytaires. Il est également nécessaire de déterminer si RalA (ou RalB le cas échéant) participe à la régulation de la PLD au cours de la phagocytose en mesurant l'activité de la PLD dans des cellules transfectées avec des ARNi dirigés contre RalA ou RalB.

La localisation de RalA et RalB sur des vésicules endosomales et lysosomales nous suggère un rôle dans le trafic membranaire au cours de la phagocytose. Or, la régulation du trafic membranaire par les GTPases Ral passe par la régulation de l'exocyste. Par exemple, le recrutement d'endosomes de recyclage dans le processus de cytokinèse est dépendant de la formation du complexe de l'exocyste, régulée par RalA (Chen et al., 2006). RalA régule également l'exocyste dans une forme d'exocytose GTP-dépendante dans des cellules neuroendocrines (Wang et al., 2004) ou dans l'extension de lamellipodes qui nécessite également l'insertion de membrane (Takaya et al., 2004), rôle qui présente des similarités avec l'extension de pseudopodes au cours de la phagocytose. RalA est donc susceptible de réguler cette étape du processus de phagocytose. RalB, qui a déjà été impliqué dans la migration cellulaire (Lim et al., 2006), pourrait également réguler la formation de l'exocyste au cours de la phagocytose (Rosse et al., 2006), mais ce rôle est peu probable en raison de l'effet négatif de RalB incompatible avec une régulation de l'exocyste.

Récemment, un argument en faveur d'une régulation de l'apport membranaire par l'exocyste au cours de la phagocytose a été apporté par une étude sur les protéines extraites à partir de phagosomes isolés de drosophiles. Quelques 617 protéines sont présentes sur le phagosome de la drosophile et Stuart et collaborateurs ont choisi d'illustrer la pertinence de

leur approche systématique en étudiant par ARNi l'implication de l'exocyste dans la phagocytose (Figure 28) (Stuart et al., 2007). L'inhibition de l'expression de membres de l'exocyste entraîne effectivement une baisse de la phagocytose dans des macrophages de drosophile ainsi que dans une lignée de macrophages de mammifères. Cependant, les régulateurs de l'exocyste au cours de la phagocytose doivent encore être déterminés.

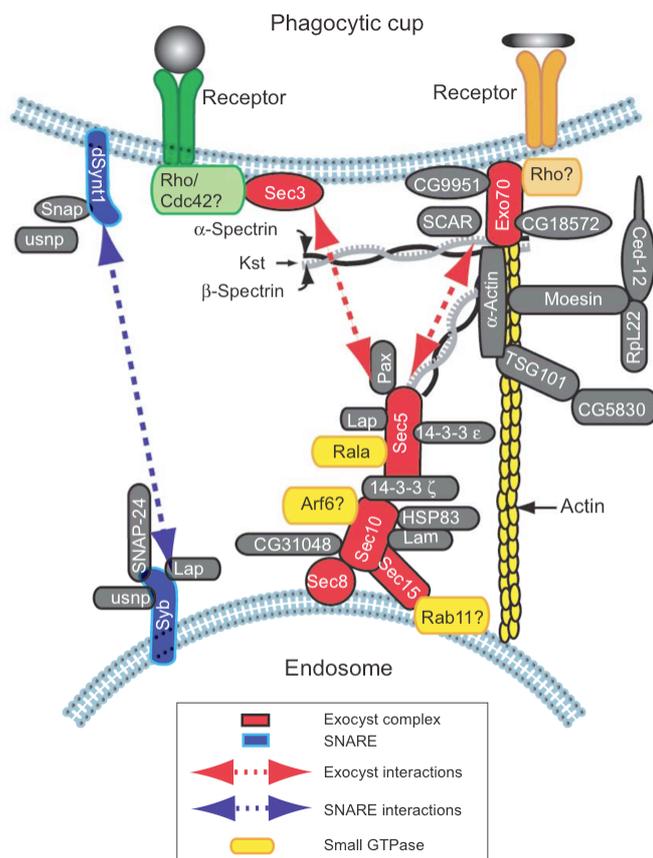


Figure 28 : Modèle représentant les protéines impliquées dans le recrutement de membrane au cours de la phagocytose (Stuart et al., 2007). Dans ce modèle le complexe de l'exocyste et ses régulateurs (en jaune), dont RalA fait partie, permettent l'arrimage de la vésicule avec le phagosome tandis que les protéines SNARE entraînent la fusion à proprement parler. Le nombre de protéines découvertes lors de cette étude systématique des protéines du phagosome illustre la complexité de la phagocytose et de sa régulation.

Bien que cette étude démontre l'implication de l'exocyste au cours de la phagocytose, sa formation et sa régulation n'ont pas été mises en évidence. Nos résultats préliminaires sur l'implication de l'exocyste dans la phagocytose montrent que le complexe est formé suite à la stimulation de la phagocytose. Cependant, il reste à démontrer que l'une des deux isoformes de Ral participe réellement à la formation du complexe pendant ce processus. Dans ce but, nous avons cherché à déterminer une interaction entre l'exocyste et les GTPases Ral au cours de la phagocytose par immunoprécipitation et nos résultats préliminaires montrent que les deux formes semblent se lier à l'exocyste. Pour déterminer précisément quelle isoforme est susceptible de réguler l'exocyste, nous avons prévu d'inhiber l'expression de l'une ou l'autre isoforme de Ral et de vérifier la formation du complexe dans ces conditions.

5. Conclusion

Ces résultats obtenus sur les GTPases Ral au cours de la phagocytose démontrent que les formes endogènes de RalA et RalB sont impliquées dans ce processus. De plus, les effets opposés des deux isoformes suggèrent que des effecteurs différents interviennent en aval des GTPases Ral. L'exocyste et la PLD sont deux effecteurs connus de RalA et RalB qui interagissent avec les GTPases dans les macrophages et pourraient donc participer à leurs fonctions au cours de la phagocytose, nous permettant ainsi de dessiner le rôle potentiel des GTPases Ral au cours de la phagocytose. Dans un premier temps, lors de la formation du phagosome, les vésicules positives pour RalA pourraient être recrutées au niveau de la cupule de phagocytose et RalA jouer un rôle dans la formation de l'exocyste qui permettrait d'arrimer ces vésicules au phagosome. Dans un deuxième temps, RalA pourrait activer la PLD et faciliter ainsi la fusion des vésicules avec la membrane du phagosome. Ces deux fonctions sont compatibles avec le rôle positif de RalA au cours de la phagocytose. Le rôle de RalB pourrait passer par une activation de l'activité GAP de la RalBP1 entraînant l'inhibition de GTPases Rho et la dépolymérisation de l'actine au moment de la fermeture du phagosome et de son internalisation. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent une modulation de la phagocytose par les GTPases Ral qui pourraient dans ce cas jouer des rôles avec d'autres protéines comme ARF6 pour l'activation de la PLD. Des expériences complémentaires faisant par exemple appel à l'utilisation systématique d'ARNi sont nécessaires pour déterminer avec exactitudes les effecteurs de chaque isoforme au cours de la phagocytose.

DISCUSSION GENERALE

1. Résultats et hypothèses de travail

Ma thèse de doctorat a porté sur la régulation de la phagocytose par la PLD, une enzyme permettant de modifier la composition lipidique des membranes dans divers types de processus comme la signalisation, le trafic membranaire et la fusion de vésicules et par les GTPases Ral, impliquées dans le trafic membranaire et la dynamique du cytosquelette. Nos études ont donc permis d'apporter des éléments pour expliquer le rôle de la PLD dans la phagocytose. En effet, la PLD avait jusque là été impliquée dans la phagocytose par son activité mais aucune indication sur le rôle précis des deux isoformes ou leur dynamique n'était connu. Nous avons pu démontrer l'implication des deux isoformes de la PLD au niveau endogène, leur dynamique de localisation et la localisation de la production de PA au cours de la phagocytose. Ces résultats apportent un nouvel éclairage concernant la régulation de la phagocytose. Par ailleurs, nous avons étudié les GTPases Ral dont le rôle dans la phagocytose n'avait jusqu'à maintenant pas été mis en évidence. Notre étude sur les effets et la localisation des protéines Ral au cours de la phagocytose permet d'ouvrir de nouvelles possibilités de régulation de la formation du phagosome tant au niveau des réarrangements de l'actine que de l'apport de membrane en raison de leurs effecteurs potentiels. Ces nouvelles voies de régulation appellent à étendre notre étude aux effecteurs connus de ces GTPases dans le contexte de la phagocytose.

Les résultats que nous avons obtenus et les techniques employées m'amènent à discuter un certain nombre de points comme l'utilisation de cellules vivantes pour l'étude de la phagocytose et du recrutement de membrane. La distinction entre régulation de l'actine et de l'apport de membrane par les GTPases Ral et la PLD sera également discutée, ainsi que les voies de régulation possible pour l'apport de membrane, l'importance de la taille de la particule pour la régulation de la phagocytose et des compartiments intracellulaires recrutés pour compenser l'internalisation du phagosome.

La formation du phagosome nécessite l'extension de pseudopodes autour de la particule grâce à la polymérisation d'actine et à l'insertion de membrane pour compenser l'internalisation du phagosome. Les deux protéines que nous avons étudiées ont pour intérêt d'être capables de réguler ces deux aspects de la formation du phagosome (Figure 29).

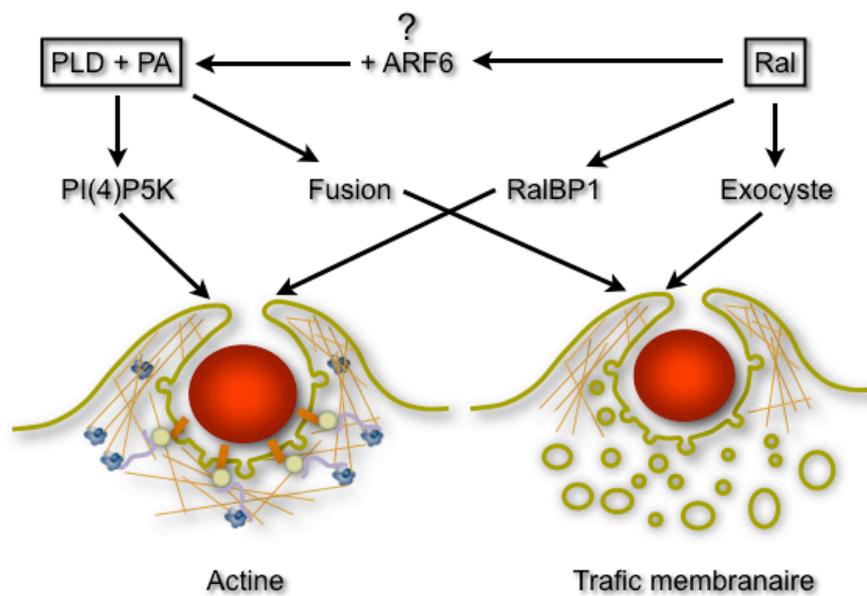


Figure 29 : Fonctions de la PLD et de Ral dans le réarrangement de l'actine et le trafic membranaire lors de la formation du phagosome.

a. Régulation par la PLD

La PLD est susceptible d'une part d'activer la PI(4)P5K dont le produit, le PI(4,5)P₂, permet de recruter des protéines de régulation de la dynamique de l'actine et d'autre part de réguler l'apport de membrane, soit en régulant des acteurs du trafic membranaire comme ARF6 ou le complexe SNARE, soit en facilitant la fusion des membranes par ses propriétés de courbure de la membrane. Ces deux rôles dans le réarrangement de l'actine et l'apport de membrane peuvent être joués par l'une ou l'autre des deux isoformes de la PLD impliquées dans la phagocytose. Nous proposons un lien entre la localisation de ces isoformes et leur fonction dans le processus de phagocytose. Dans un premier temps, les fonctions de signalisation et de réarrangement du cytosquelette pourraient être jouées par la PLD2 dont la présence à la membrane plasmique et donc au niveau du site de phagocytose en fait le candidat logique pour la régulation des premières étapes de la formation du phagosome. Dans un second temps, la PLD1, dont la localisation sur des vésicules intracellulaires et la dynamique indiquent un rôle dans l'apport de membrane, pourrait faciliter le recrutement de membrane par la régulation de ARF6 ou la fusion des membranes. Bien sûr ces hypothèses sont encore à démontrer.

b. Régulation par les GTPases Ral

Les fonctions des GTPases Ral au cours de la phagocytose pourraient être également réparties entre réarrangement de l'actine et insertion de membrane. La première indication pour cette hypothèse est la différence d'effet de RalA et RalB au cours de la phagocytose qui implique la régulation d'effecteurs différents. Parmi les effecteurs connus des GTPases Ral, la RalBP1, la PLD et l'exocyste retiennent l'attention pour leurs fonctions respectives. La RalBP1 possède une activité GAP pour les GTPases Rac et Cdc42, deux protéines impliquées dans la dynamique de l'actine au cours de la phagocytose. L'effet négatif de RalB au cours de la phagocytose peut s'expliquer par cet effecteur dans la mesure où l'inhibition de Rac ou Cdc42 au cours de la phagocytose entraînerait une diminution de la polymérisation de l'actine nécessaire à l'extension des pseudopodes (Massol et al., 1998). La PLD, bien sûr, est un effecteur intéressant puisque nous l'avons déjà impliqué dans la régulation de la phagocytose. De plus, l'activation de la PLD par les protéines Ral pourrait être dépendante d'une interaction avec ARF6 un régulateur connu de l'apport de membrane au cours de la formation du phagosome. L'exocyste permet le recrutement et l'arrimage de vésicules au niveau d'un site d'exocytose et sa régulation par les GTPases Ral a été mise en évidence dans divers processus cellulaires. L'exocyste joue également un rôle dans la phagocytose (Stuart et al., 2007) et constitue donc une cible logique pour les GTPases Ral et plus particulièrement RalA dont le rôle positif au cours de la phagocytose pourrait passer par cet effecteur.

2. Étude du trafic membranaire dans des cellules vivantes

Dans le but de démontrer un rôle de la PLD1 dans la fusion des vésicules avec la membrane du phagosome, j'ai effectué pendant trois mois des expériences de mesure de la capacité membranaire des macrophages pendant la phagocytose dans le laboratoire du Dr Rettig à Homburg en Allemagne. Ces expériences, qui visaient à montrer la régulation de l'insertion par la PLD, n'ont abouti à aucun résultat, les cellules refusant de phagocyter lorsqu'elles étaient patchées. Ces échecs nous ont conduit à rechercher d'autres méthodes pour l'étude de l'apport de membrane au cours de la phagocytose. En dehors de ces mesures de capacité membranaire, seule la vidéo microscopie et la microscopie électronique présentent la résolution spatiale ou temporelle nécessaire pour étudier et visualiser le recrutement de membrane au cours de la formation du phagosome.

L'étude de la phagocytose dans des cellules vivantes comporte plusieurs avantages mais également des inconvénients qu'il s'agit de comprendre. Tout d'abord, la surexpression de protéines fluorescentes pose le problème d'une modulation du rôle endogène de la protéine en raison de son expression trop importante et d'une localisation potentielle dans des compartiments dont elle est normalement absente. De plus, l'insertion d'une protéine fluorescente peut entraîner des modifications de l'activité ou de la régulation de la protéine d'intérêt. Ces facteurs sont donc importants à vérifier avant d'effectuer des études sur des cellules vivantes. Ensuite, l'expression de protéines fluorescente et l'étude de leur dynamique en temps réel présentent de nombreux avantages comme la visualisation exacte de leur localisation au cours du phénomène de phagocytose, ce que la fixation des cellules rend impossible puisque malgré la synchronisation par centrifugation des particules, il est difficile d'appréhender le début réel de l'internalisation. La phagocytose est un processus idéal pour l'étude de la dynamique de protéines dans des cellules vivantes dans la mesure où le site d'activation de la phagocytose est facilement identifiable et provoque une dynamique polarisée des protéines recrutées. De plus, la possibilité de faire varier la taille et le type de particule est un avantage pour visualiser facilement le recrutement et comparer la localisation de protéines d'intérêt.

Par ailleurs, notre propre expérience montre que la fixation de cellules pour étudier la localisation de protéines fluorescentes peut entraîner des changements de localisation ou des destructions de la structure des compartiments vésiculaires et fausser ainsi les résultats. Dans les cellules vivantes en revanche, la dynamique des protéines fluorescentes, sous réserve d'une localisation correcte de la protéine surexprimée, reflète plus exactement la réalité. La dynamique de protéines ou de marqueurs fluorescents permet donc de suivre le mouvement des vésicules intracellulaires vers leur destination finale. L'utilisation de techniques d'imagerie du vivant comme le FRET peut permettre d'affiner les connaissances sur la dynamique des protéines comme l'ont montré les études menées sur la dynamique des GTPases Rho au cours de la phagocytose (Hoppe and Swanson, 2004). Le TIRF (Axelrod et al., 1983) qui permet de visualiser les événements d'exocytose ou de recrutement de protéines au niveau de la membrane plasmique pourrait aussi être utile dans des expériences de phagocytose "frustrée" (Eng et al., 2007), où des anticorps recouvrent la lamelle de culture et les macrophages sont sédimentés à 4°C. Après changement de milieu à 37°C, le macrophage tente en quelque sorte de phagocyter la lamelle recouverte d'anticorps (qui constitue ainsi une très grosse particule) et déclenche la signalisation de la phagocytose ainsi que le recrutement

de vésicules, visible en TIRF au moment de leur approche près de la membrane plasmique. Il serait ainsi possible de déterminer la dynamique exacte de recrutement des différents compartiments, par exemple positifs pour la PLD1 ou pour les GTPases Ral (c'est à dire les endosomes tardifs et les lysosomes) et de visualiser leur exocytose si tel est le cas.

L'autre façon de déterminer le rôle d'une protéine dans le recrutement de membrane consiste à utiliser la microscopie électronique qui permet de visualiser finement la structure de la cellule et plus particulièrement la zone de phagocytose et d'observer l'état du recrutement de membrane dans des cellules traitées comparées à des cellules contrôles. Il serait ainsi possible de repérer un défaut de recrutement ou de fusion de membrane au niveau du phagosome par l'augmentation de la quantité de vésicules autour du phagosome en formation.

3. Régulation du cytosquelette d'actine au cours de la phagocytose.

La PLD et les GTPases Ral sont susceptibles de réguler le réarrangement de l'actine au cours de la phagocytose par l'intermédiaire de différents effecteurs. Ce réarrangement de l'actine est important pour l'extension des pseudopodes et est régulé par divers acteurs impliqués dans la phagocytose. L'activation des récepteurs FcR entraîne la stimulation des GTPases de la famille Rho. Cdc42 semble contrôler la localisation et l'activation de WASP et d'Arp2/3 en synergie avec le PI(4,5)P₂ et entraîner la polymérisation de l'actine nécessaire à l'extension des pseudopodes. De son côté Rac1 semble impliquée dans la fermeture du phagosome et conduit à l'activation des protéines WAVE/Scar en amont de Arp2/3. Plusieurs autres protéines régulant la dynamique de l'actine sont dépendantes directement ou indirectement des GTPases Rac et Cdc42 au cours de la phagocytose comme la gelsoline et la cofiline jouant sur la fragmentation ou la dépolymérisation de l'actine respectivement. Ces régulations peuvent dépendre de kinases sous le contrôle de Rac ou Cdc42 ou encore de la présence de PI(4,5)P₂ dans l'environnement du phagosome (Castellano et al., 2001).

a. Régulation par la PLD

Les phosphoinositides sont des régulateurs importants du recrutement de protéines à la membrane plasmique et ont été impliqués dans le réarrangement de l'actine lors de la formation du phagosome (Yeung et al., 2006). La PLD2 est localisée à la membrane plasmique et peut donc être activée dès le début de la signalisation de la phagocytose, entraînant l'activation de la PI(4)P5 et la production de PI(4,5)P₂ qui permet le recrutement de diverses protéines du réarrangement du cytosquelette d'actine. D'autre part le PI(4,5)P₂ est capable d'activer la PLD et participerait ainsi à une boucle de rétroaction positive qui pourrait amplifier le signal issu des récepteurs phagocytaires. Cette boucle positive pourrait réguler le recrutement rapide et massif de protéines de régulation de l'actine comme le complexe Arp2/3 et entraîner une polymérisation de l'actine adaptée à la taille des particules entourées par les pseudopodes. Dans ce cas, plus il y aurait de récepteurs activés lors de la phagocytose et plus cette boucle de rétroaction pourrait augmenter la polymérisation de l'actine.

Le PI(4,5)P₂ peut ensuite être métabolisé par la PI(3) Kinase en PI(3,4,5)P₃ qui recrute d'autres types de protéines comme la myosine dont le rôle au cours de la phagocytose est de créer les forces de tension sur la membrane pour l'extension des pseudopodes. La PLD pourrait donc être à la base de la signalisation permettant la polymérisation de l'actine et la force contractile tirant sur la membrane lors de l'extension des pseudopodes. Il serait intéressant de vérifier la production de PI(4,5)P₂ dans des cellules dont l'expression de la PLD2 a été inhibée préalablement pour voir si cette cascade de signalisation est réellement présente dans les macrophages lors de la phagocytose. La localisation de la PI(4)P5 Kinase pourrait être comparée avec celle de la PLD2 et la production de PI(4,5)P₂ localisée avec une sonde spécifique dans des expériences de vidéomicroscopie.

b. Régulation par les GTPases Ral

Par la suite, après formation et fermeture du phagosome, le cytosquelette constitue une barrière qu'il faut dépolymériser afin de permettre l'internalisation du phagosome. En accord avec ce principe, l'étude de l'activité des GTPases de la famille Rho impliquées dans la polymérisation de l'actine au cours de la phagocytose montre que ces GTPases sont inactivées après la fermeture du phagosome (Hoppe and Swanson, 2004). RalB pourrait participer à l'inactivation des GTPases Rho lors de cette étape par l'intermédiaire de la RalBP1 qui possède une activité GAP qui inhibe les GTPases Rho. Pour impliquer spécifiquement RalB

dans cette étape du processus, il est nécessaire de déterminer sa dynamique d'activité exactement. Pour cela, des études utilisant des outils d'imagerie du vivant sont nécessaires, comme le FRET qui permettrait, par l'utilisation de sondes fluorescente capables d'interagir avec la forme active liée au GTP de RalB, de déterminer la localisation de RalB-GTP. Des constructions de RalA couplé à un domaine de liaison à RalA-GTP et comportant deux fluorophores ont été utilisées pour étudier la régulation de la PI(3) Kinase et permettent de localiser précisément la protéine active (Yoshizaki et al., 2006). L'utilisation d'une sonde similaire pour RalB et RalA dans des cellules phagocytaires permettrait de distinguer leur dynamique d'activation et donc leur fonction au cours de la phagocytose. L'utilisation de cellules vivantes dans ce contexte semble donc tout indiquée pour une étude visant à déterminer la dynamique de ces protéines.

4. Régulation de l'apport de membrane

L'apport membranaire au cours de la phagocytose est démontré par l'implication de divers membres du complexe SNARE au cours de la phagocytose qui implique la fusion entre vésicules et membrane du phagosome. La Vamp3, marqueur des endosomes de recyclage, est nécessaire à la formation du phagosome. En effet, la toxine tétanique qui clive la Vamp3 empêche la formation du complexe SNARE et donc la fusion de vésicules avec la membrane plasmique et inhibe également la phagocytose (Hackam et al., 1998). La Vamp7 est présente sur des vésicules de type endosomes tardifs et semble jouer un rôle dans l'apport de membrane au cours de la phagocytose (Braun et al., 2004). La syntaxine 18 est, elle, spécifique du réticulum endoplasmique et a pu être impliquée dans la phagocytose (Hatsuzawa et al., 2006). Ces études démontrent donc que l'exocytose focale de vésicule au cours de la phagocytose répond aux mêmes critères que l'exocytose régulée classique impliquant les protéines SNARE. Ces protéines peuvent également servir à discriminer les divers compartiments impliqués dans l'apport de membrane au cours de la phagocytose. L'étude sur le rôle du PA dans la formation du complexe SNARE *in vitro* (Liu et al., 2007) suggère que la PLD pourrait éventuellement réguler la SNAP23 ou la syntaxine et les changements de conformation du complexe SNARE nécessaires à l'exocytose focale au cours de la phagocytose dans les macrophages. Ce rôle de la PLD dans la régulation des protéines SNARE (Liu et al., 2007) est susceptible d'être joué par la PLD2 déjà présente à la membrane du phagosome tandis que la facilitation de la fusion des membranes (Kooijman et al., 2003)

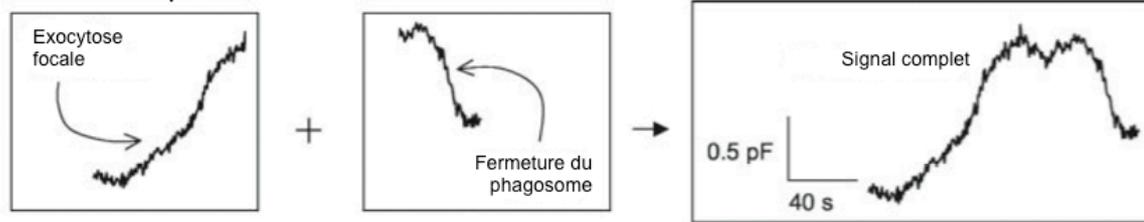
peut être dépendante des deux isoformes, la PLD1 régulant également les événements de fusion et fission qui interviennent au cours de la maturation du phagosome.

Le trafic membranaire au cours de la phagocytose est également régulé par d'autres acteurs. ARF6 est connu pour son rôle dans le trafic membranaire (D'Souza-Schorey et al., 1998) et joue un rôle dans le recrutement d'endosomes précoces (Niedergang et al., 2003) qui pourrait passer par la régulation, en synergie avec les GTPases Ral, de la PLD. Parmi les acteurs du recrutement et de l'arrimage de vésicules avec un site d'exocytose, l'exocyste a été impliqué récemment dans la phagocytose (Stuart et al., 2007) et ses sous unités sont régulées par différents acteurs du trafic membranaire. ARF6 est présent sur les endosomes précoces et peut interagir avec Sec10. Les GTPases de la famille Rho et plus particulièrement Cdc42 semblent réguler la localisation de Sec3 qui servirait de point de repère pour la localisation et la formation du complexe (Guo et al., 2001; Zhang et al., 2001). L'interaction de Rab11 avec la protéine de l'exocyste Sec15 est GTP dépendante (Zhang et al., 2004) et permet de réguler la localisation de Rab11 (Wu et al., 2005) importante pour le trafic d'endosomes de recyclage impliqués dans la formation et la maturation du phagosome (Cox et al., 2000; Damiani et al., 2004). L'exocyste est donc un candidat idéal pour le recrutement et l'arrimage de vésicules au niveau du phagosome et représente sans doute un acteur central de ce processus en raison de son interaction possible avec de nombreux autres acteurs de la phagocytose (Camonis and White, 2005) et pourrait être régulé par RalA.

5. L'insertion de membrane compense l'internalisation du phagosome

Au départ, le phagosome était considéré comme dérivant totalement d'une invagination de la membrane plasmique, mais certaines observations indiquent que la surface globale de la cellule ne change pas suite à la phagocytose même dans le cas de l'ingestion de grandes particules. Des expériences de mesure de capacitance en patch clamp ont permis de démontrer que la capacité membranaire de la cellule évolue entre la formation et la fermeture du phagosome (Figure 30) indiquant que l'insertion de membrane accompagne la formation du phagosome (Holevinsky and Nelson, 1998), confirmant ainsi les indications apporté par les études sur les protéines SNARE.

Mesure de capacitance



Modèle

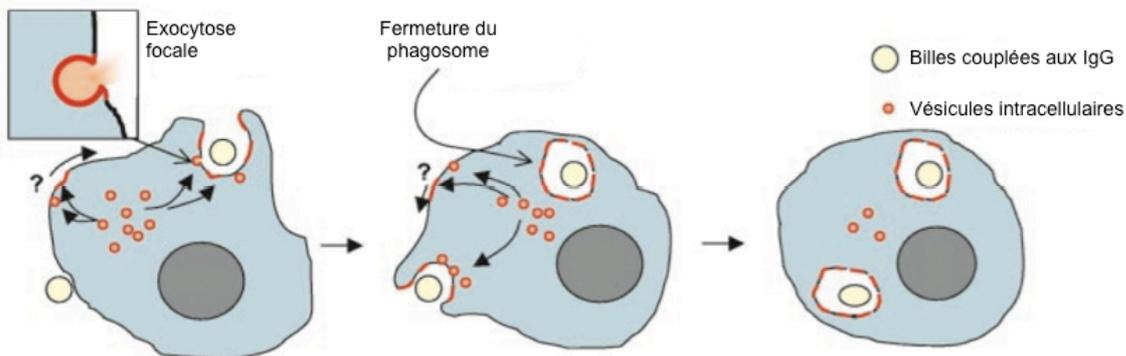


Figure 30 : Modèle de l'exocytose focale expliquée par la capacité membranaire (adapté de (Di et al., 2003)). Dans une première phase d'exocytose focale, des vésicules sont insérées au niveau du phagosome afin de compenser l'internalisation du phagosome après fermeture (deuxième phase). En conséquence, le signal en capacitance montre une augmentation du signal pendant la phase de formation du phagosome, suivie d'une diminution rapide au moment de la fermeture du phagosome.

Il est donc important de définir les conditions dans lesquelles la signalisation entraîne ce recrutement de membrane. Nous avons déterminé dans notre étude, que la phagocytose de billes de latex de 3 et 6 μ m entraînait le recrutement de vésicules PLD1 positives, définies comme des endosomes tardifs et des lysosomes. Cependant, il est possible que des particules différentes, plus petites, n'auraient pas entraîné le recrutement de ces compartiments vers le site de phagocytose. Certaines expériences suggèrent que le niveau de recrutement de membrane est dépendant de la taille ou de la quantité de particules à internaliser. Les variations de capacité membranaire sont dépendantes de la taille de la particule internalisée, suggérant que la taille du phagosome fait varier la quantité de vésicules à faire fusionner avec la membrane plasmique (Holevinsky and Nelson, 1998). La PI(3) Kinase, un acteur important de la réorganisation de lipides impliqués dans le trafic de membranes, est activée au cours de la phagocytose et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques entraîne une baisse du niveau de phagocytose indépendante de la réorganisation du cytosquelette d'actine (Araki et al., 1996). Les effets d'inhibiteurs de la PI(3) Kinase sont dépendants de la taille de la particule à ingérer

indiquant que l'importance de l'insertion membranaire est proportionnelle à la taille de la particule (Cox et al., 1999). Cette relation entre taille de la particule et recrutement de vésicule entraîne les questions suivantes : 1) Est-ce que les différents compartiments sont recrutés en fonction de la taille de la particule ? 2) La PLD et les GTPases peuvent-elles être impliquées en fonction de la taille de la particule à internaliser ?

Les compartiments endosomaux ont longtemps constitué l'essentiel des sources connues de membranes au cours de la formation du phagosome. Les endosomes précoces ou de recyclages semblent être recrutés rapidement comme l'illustrent les études sur la relocalisation et le rôle de la Vamp3 (Bajno et al., 2000) et de Rab11 (Cox et al., 2000) dans ce processus. Les endosomes tardifs sont également des sources de membranes recrutées au cours de la phagocytose comme le montre la localisation de la Vamp7 au cours de ce processus (Braun et al., 2004). Aucune étude ne semble montrer de modulation du recrutement de ces compartiments en fonction de la taille des particules, contrairement aux lysosomes et au réticulum endoplasmique.

a. Recrutement des lysosomes

Les lysosomes participent à la formation et la maturation du phagosome. En plus de l'apport de membrane, la destruction de bactéries par les enzymes lysosomales est une des raisons avancées de l'exocytose de lysosomes vers le phagosome. Plusieurs expériences ont montré le recrutement de marqueurs spécifiques des lysosomes dès le début de la phagocytose et la formation du phagosome dans des neutrophiles (Tapper et al., 2002; Czibener et al., 2006). Une étude sur le rôle des lysosomes dans la formation du phagosome montre qu'ils ne sont impliqués que dans le cas de particules de grande taille ($> 3\mu\text{m}$) ou nombreuses, indiquant que le recrutement de lysosomes est régulé par la taille de la particule (Czibener et al., 2006). Dans notre étude, les vésicules PLD1 positives correspondent à des endosomes tardifs et des lysosomes, confirmant ainsi le recrutement de ces deux compartiments vers le phagosome. Dans nos expériences, les particules utilisées pour déclencher la phagocytose sont de grandes tailles ($3\mu\text{m}$ ou $6\mu\text{m}$) et correspondent donc aux conditions décrites pour le recrutement des lysosomes. Par conséquent, la PLD1 pourrait ne jouer un rôle que dans la phagocytose de grandes particules. Dans ces conditions, il serait donc intéressant de tester l'implication de la PLD1 lors de la phagocytose de petites particules (entre $0,5$ et $1\mu\text{m}$).

Dans le cas des GTPases Ral, nos expériences de localisation montrent que les deux isoformes sont également localisées sur des endosomes tardifs et lysosomes (colocalisation avec LysoTracker et cathepsin D) et qu'elles peuvent donc jouer un rôle dans la régulation du trafic membranaire au cours de la formation et de la maturation du phagosome. Les GTPases Ral étant connues pour réguler la PLD dans un complexe avec ARF6, un acteur du recrutement de vésicule lors de la phagocytose, il est possible que la formation de ce complexe actif comprenant Ral/ARF6/PLD soit nécessaire au recrutement de lysosomes lors de la phagocytose de grandes particules. Il existe une indication pour une modulation de l'action de ARF6 en fonction de la taille de la particule. Dans l'étude de Balana et collaborateurs, l'invasion par la bactérie Chlamydia est dépendante de ARF6 mais ne conduit pas à l'activation de la PLD mais à une régulation du cytosquelette d'actine (Balana et al., 2005). La taille de Chlamydia est de 0,3 μ m et pourrait constituer une particule trop petite pour déclencher une signalisation entraînant l'activation de la PLD par ARF6 pour réguler l'apport de membrane.

Le recrutement de vésicules PLD1 positives définies comme étant des endosomes tardifs et des lysosomes, pourrait également être dépendant de la taille des particules et être régulé par le calcium et la Synaptotagmine VII comme l'a suggéré une étude récente sur le recrutement de lysosomes (Czibener et al., 2006). Ce point mériterait d'être examiné en faisant varier la concentration en calcium extracellulaire et la taille des billes utilisées pour déclencher la phagocytose dans des cellules transfectées avec la PLD1.

b. Recrutement du réticulum endoplasmique

Parmi les sources de membranes nécessaires à la formation du phagosome, il est surprenant de compter aussi le réticulum endoplasmique (RE), comme l'ont montré des expériences de protéomique du phagosome (Garin et al., 2001) ainsi que des expériences biochimiques et de microscopie électronique montrant la présence de marqueurs du RE comme la calnexine sur la membrane du phagosome dès sa formation (Gagnon et al., 2002). La vision de l'implication du RE comme source de membrane a cependant été contestée par le groupe de Grinstein dans une étude importante sur diverses protéines du réticulum endoplasmique et avec de nombreuses approches techniques (Touret et al., 2005). Cependant, d'autres laboratoires ont depuis obtenus des résultats impliquant des protéines du réticulum endoplasmique tel que calnexin et calreticuline (deux protéines capables de lier le calcium) (Muller-Taubenberger et al., 2001; Guermonprez et al., 2003) ou encore des protéines du

complexe SNARE spécifiques de ce compartiment (Muller-Taubenberger et al., 2001; Guermonprez et al., 2003; Becker et al., 2005; Hatsuzawa et al., 2006) au cours de la phagocytose. L'un dans l'autre, ces résultats semblent démontrer un rôle du RE dans l'apport de membrane pendant la formation du phagosome. De plus, le recrutement du RE semble être régulé également par la taille de la particule à ingérer dans la mesure où pour la phagocytose de particules de 3 μ m implique des protéines SNARE du RE, ce qui n'est pas le cas pour l'ingestion de particules de 0,8 μ m (Becker et al., 2005). Ces données pourraient expliquer que certaines études ne parviennent pas à impliquer ce compartiment dans le processus de phagocytose. Pour ma part, l'implication fonctionnelle de certaines protéines du réticulum endoplasmique me semble importante pour la démonstration du rôle du réticulum endoplasmique dans ce processus.

Une étude sur le bourgeonnement de vésicules à partir du RE a montré que la PLD pouvait réguler la formation de ces vésicules par la protéine COPII (Pathre et al., 2003). Dans notre étude, nous n'avons pas cherché à montrer la présence de PLD sur des structures positives pour des marqueurs du RE. Sachant que la PLD peut réguler le bourgeonnement de vésicules du RE et l'apport de membrane au cours de la phagocytose, un lien entre les deux processus n'est pas exclu. Il serait donc intéressant de vérifier si la PLD ne colocalise pas également avec des marqueurs du RE au cours de la phagocytose dans les conditions nécessaires pour observer le recrutement de ce compartiment.

De plus, les effets des GTPases Ral dans la phagocytose de billes de 3 μ m montrent simplement une modulation du phénomène, suggérant qu'un rôle potentiel de Ral dans le trafic membranaire au cours de la phagocytose pourrait être dépendant de la taille de la particule. Des expériences faisant varier la taille (entre 0,5 et 6 μ m) et le nombre des particules permettrait de déterminer l'impact des GTPases Ral dans l'internalisation de petites particules et de comprendre leur importance dans la régulation de la phagocytose. De façon générale, les études sur le recrutement membranaire et même la régulation de l'actine au cours de la phagocytose devraient faire varier la taille des particules afin de déterminer leur impact. Ce type d'expériences a en effet pu montrer que les lysosomes et le RE se comportaient probablement comme des sources de membrane complémentaires lors de l'ingestion de grandes particules.

6. Conclusions

Nos résultats sur la PLD et les GTPases Ral et les données de la littérature nous ont amené à proposer un modèle hypothétique de la régulation de la phagocytose par ces protéines, résumé dans la Figure 31. Dans un premier temps, la PLD2, présente à la membrane plasmique, pourrait activer la PI(4)P5K dont le rôle est de réguler la polymérisation du cytosquelette d'actine. La PLD2 pourrait aussi participer à la régulation de la localisation d'acteurs de l'exocytose focale comme les protéines du complexe SNARE. Dans un deuxième temps, la GTPase RalA, présente sur des vésicules recrutées pendant la formation du phagosome, régulerait la formation de l'exocyste qui permettrait le recrutement et l'arrimage de ces vésicules au niveau du phagosome. Ensuite, la PLD1, activée par RalA, peut-être en complexe avec ARF6, pourrait faciliter l'étape de fusion des vésicules recrutées avec la membrane du phagosome en changeant la courbure des membranes. La dernière étape implique un rôle de RalB dans la dépolymérisation du cytosquelette d'actine afin de permettre la fermeture et l'internalisation du phagosome. RalB pourrait activer la RalBP1 et entraîner l'inhibition de Cdc42 ou Rac et conduire au démantèlement de l'actine. Par la suite, la PLD1 et les GTPases Ral, présentes sur des endosomes tardifs et des lysosomes, pourraient encore réguler le recrutement et la fusion de vésicules avec le phagosome lors des étapes de maturation.

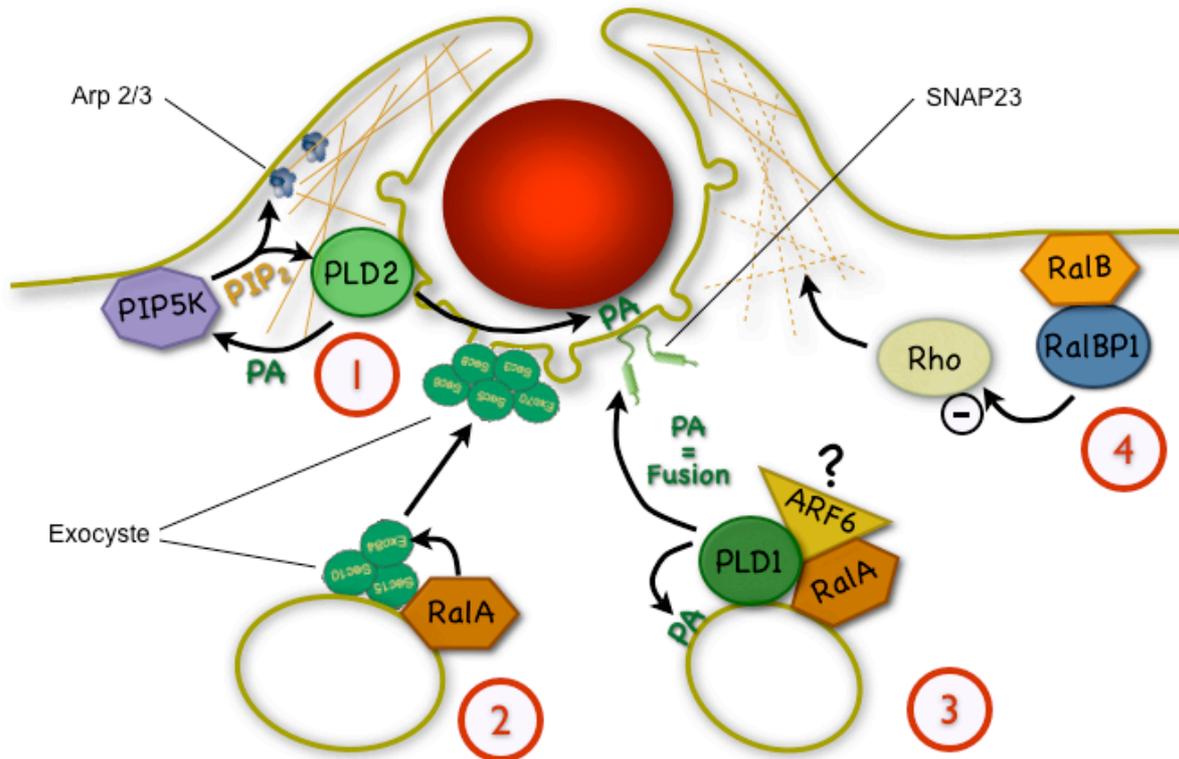


Figure 31 : La PLD et les GTPases Ral lors de la formation du phagosome. les quatre étapes sont : 1) régulation de la polymérisation de l'actine. 2) recrutement de vésicules au niveau du site de phagocytose. 3) régulation de la fusion des vésicules avec le phagosome. 4) régulation de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine lors de la fermeture du phagosome.

En définitive, au fur et à mesure des études menées sur le recrutement de membrane au cours de la phagocytose, divers compartiments aux rôles différents et aux modes de régulation différents surgissent et dessinent un schéma de plus en plus complexe. En effet, une caractéristique qui semble se confirmer au cours de ces études est la diversité des sources et des régulations car chaque type de compartiment est recruté en fonction de critères précis comme la taille ou le nombre des particules internalisées. Reste à dégager un schéma d'ensemble permettant de comprendre les conditions de l'implication de ces différents compartiments au cours de la phagocytose. On peut cependant déjà tracer la ligne générale suivante : le recrutement de membrane et/ou l'extension des pseudopodes au cours de la phagocytose sont dépendants de la taille de la particule. Plus la particule est de taille importante et plus il faut étendre les pseudopodes autour de celle-ci et donc polymériser d'actine et plus il faut de membrane pour compenser l'internalisation du phagosome. Ceci implique d'une part l'amplification du signal des récepteurs vers le réarrangement de l'actine

et d'autre part le recrutement de compartiments endosomaux de plus en plus tardifs comme les lysosomes, puis le réticulum endoplasmique. De plus, ce recrutement membranaire est dans tous les cas dépendant de la formation du complexe SNARE comme le montre les différentes études sur ces protéines au cours de la phagocytose. Enfin, on peut également postuler que chaque compartiment impliqué dans l'apport de membrane au cours de la formation du phagosome, joue un rôle supplémentaire dans la fonction phagocytaire. En effet, les lysosomes peuvent par exemple participer à l'acidification précoce du phagosome et à l'apport d'enzymes permettant ainsi de détruire rapidement l'agent pathogène en voie d'internalisation. Dans le cas du réticulum endoplasmique, on peut penser que la présentation de l'antigène constitue une fonction supplémentaire par rapport à l'apport membranaire à proprement parlé.

De nombreuses questions restent donc ouvertes quant à la régulation de l'actine et de la fusion des vésicules avec la membrane du phagosome ainsi que les voies de signalisations permettant de recruter spécifiquement tel ou tel compartiment et leur fonction exacte au cours de la phagocytose. Les réponses à ces questions impliquent la compréhension de la régulation par la taille de la particule, le rôle joué par les différents types de récepteurs et la fonction de chaque compartiment dans la formation et la maturation du phagosome.

ANNEXE

I. Annexe 1 : Ciesielski-Treska J et al., 2004

Lors de mon DEA, j'ai participé à l'élaboration de certaines expériences dans le cadre de l'article suivant :

Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia.

Ciesielski-Treska J, Grant NJ, Ulrich G, **Corrotte M**, Bailly Y, Haeberle AM,
Chasserot-Golaz S, Bader MF

Glia. 2004 Apr 15;46(2):101-15.

Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia

Jaroslava Ciesielski-Treska, Nancy J. Grant, Gabrielle Ulrich, Matthias Corrotte, Yannick Bailly, Anne-Marie Haerberle, Sylvette Chasserot-Golaz, Marie-France Bader

Glia, 2004, Vol. 46, N 2, Pages 101-115

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1002/glia.10363>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

II. Annexe 2 : Matériels et méthodes relatifs à l'étude des GTPases Ral

1. Culture cellulaire

Les macrophages murins de la lignée RAW264.7 ont été cultivés en milieu RPMI Glutamax 1640 (Gibco) (HEPES 10 mM, Na pyruvate 1 mM, β -mercapto-éthanol 0.05 mM, streptomycine 10^{-6} M et pénicilline 5×10^4 U/L) complémenté avec 10% de sérum bovin inactivé à 55°C pendant 30 min.

2. Anticorps

Pour les différentes expériences d'immunolocalisation (IL) et immunoréplique (IR), les anticorps primaires suivants ont été utilisé :

Tableau des anticorps primaires

Espèce	Cible	Dilution IR	Dilution IL	Marque
Souris	RalA	1:1000	1:200	BD Bioscience
Chèvre	RalB	1:500	/	Santa Cruz Biotechnology
Souris	Sec8	1:1000	/	BD Bioscience
Lapin	Sec5	1:500	/	Gentaur
Lapin	Exo84	1:500	1:100	Gentaur
Souris	β -Actine (clone AC-15)	1:10000	/	Sigma-Aldrich
Souris	myc (clone 4A6)	1:2000	1:300	Upstate Biotechnology
Souris	HA	1:1000		Covance

En IL, les anticorps secondaires (Molecular Probes) suivants ont été utilisés : chèvre anti-IgG humaines couplés à l'Alexa 488 ou 555, 1:1000 pour marquer les billes couplées aux IgG humaines. Les anticorps secondaires utilisés sont des chèvre anti-souris ou anti-lapin

couplés à l'Alexa 488 ou 555 selon le protocole, dilués à 1:1000 et un âne anti-chèvre couplé à l'Alexa 1:1000.

3. Plasmides

Les plasmides suivants ont été utilisés: RalA (simien X04328.1) sauvage (RalAWT) et formes mutées (RalA23V, RalA28N) intégrées à un plasmide pRK5 (Vitale et al., 2005), RalB (humain X15015.1) sauvage (RalB WT) et formes mutées, RalB23V and RalB28N intégrées au plasmide pRK5-myc, fournis par le Dr Allan Hall. RalA WT et RalB WT ont été clonés dans des vecteurs pRK5-myc et pEGFPC1 suivant le protocole de (Lalli and Hall, 2005). Les plasmides pCGN-PLD1b humaine (PLD1-HA) et pCGN-PLD2 murine (PLD2-HA) ont été fournis par le Dr M. Frohman (SUNY, New York, EU). Le plasmide contrôle correspond au vecteur vide pEGFPC1. Avant utilisation, les séquences de toutes ces constructions ont été vérifiées.

4. Clonage de RalA et RalB sauvages

Le clonage de constructions RalA WT et RalB WT s'est fait par PCR au sein des sites de restriction BamHI et XbaI. La première étape consiste à amplifier l'insert des plasmides RalA WT pRK5 et RalB WT pRK5 et à ajouter les sites de restrictions de par et d'autre des insert par PCR. La solution de PCR (ADN 20ng ; 5µL de tampon ; MgCl₂ 1,5µM ; dNTP 0,2mM ; primers 0,2µM ; Taq polymérase (Sigma) 2,5 U) est chauffée à 95°C pendant 5min puis subit 25 cycles de dénaturation (95°C ; 30s), d'hybridation (53°C, 30s) et élongation (72°C, 60s) puis est chauffée à 70°C pendant 10min. L'insert amplifié est ensuite purifié avec le kit de purification Qiagen. Les vecteurs pRK5-myc et pEGFPC1 sont ensuite amplifiés par transformation de bactéries (ces bactéries non méthylande sont utilisées car l'enzyme XbaI nécessite l'absence de méthylation sur son site de restriction) SC110 compétentes selon le protocole suivant. Les bactéries sont décongelées sur glace puis mélangé à l'ADN du vecteur (100µL de bactérie et 1µL d'ADN) puis incubées 10min sur glace. Ensuite, un choc thermique est appliqué à 42°C pendant 45s et les bactéries remise sur glace pendant 2min. Les bactéries sont ensuite cultivées dans 1mL de milieu LB liquide sans antibiotiques avec agitation pendant 45min à 37°C et finalement étalées (100 µL par boîte) sur boîte de LB solide avec antibiotique (Ampicilline pour pRK5-myc et Kanamycine pour pEGFPC1) et

cultivées une nuit. Les colonies résultant de cette transformation sont ensuite amplifiées et les vecteurs purifiés par miniprep selon le protocole du kit Qiagen. Les vecteurs ainsi amplifiés font l'objet de digestions avec BamHI et XbaI afin de pouvoir insérer les constructions RalA et RalB dans ces sites de restrictions. Les vecteurs digérés sont ensuite séparés sur gel d'agarose 1% par électrophorèse, les bandes contenant le vecteurs sont découpées et l'ADN purifiés grâce au kit de purification sur gel de Qiagen. La dernière étape consiste à insérer la séquence d'intérêt par ligation (vecteur 100ng ; insert 12,5µL) avec la ligase T4DNA pendant la nuit à 24°C. Le produit de ligation est ensuite amplifié par transformation de bactéries DH5α compétentes selon le même protocole que précédemment et purifié à l'aide du kit Qiagen.

5. Transfection des plasmides

Les cellules sont transfectées par électroporation suivant le Kit Electrobuffer (Cell Projects). Pour chaque transfection, environ 8×10^6 cellules sont resuspendues, centrifugées à 800rpm (90g) pendant 5min puis le milieu éliminé. Les cellules sont lavées dans 3mL de solution de lavage du kit, puis centrifugées et resuspendu dans 240µL de solution d'électroporation contenant 2,5mM d'ATP et 4mM de glutathion et 20µg d'ADN. La solution cellulaire est électroporée dans des cuves de 4mm à 230V et une capacitance de 950µF avec un électroporateur Biorad Gene Pulser Xcell. Après électroporation, les cellules sont diluées dans 1mL de milieu RMPI avec 10% sérum à 37°C puis remis en culture.

6. ARN interférences

Afin d'inhiber l'expression de RalA et RalB endogènes, les macrophages ont été transfectés avec des ARNi Stealth duplex spécifiques pour les formes murines de RalA et RalB ou avec un oligonucléotide contrôle par Lipofectamine RNAi max en suivant le protocole fournit par Invitrogen. A partir de 3 duplex testés pour chaque protéine, les ARNi duplex choisis pour RalA sont 5'-GGUAACAAGUCAGAUCUAGAAGAUUA-3' et 5'-UAUCUUCUAGAUCUGACUUGUUACC-3', et pour RalB, 5'-GCCUGACGCUUCAGUUCAUGUAUG-3' et 5'-CAUACAUGAACUGAAGCGUCAGGGC-3'. Après 48h, la diminution de l'expression de RalA et RalB a été examiné par immunoréplique et des tests de phagocytose ont été réalisés

sur des cellules transfectées. Le taux de transfection a été estimé à 85% en utilisant un oligo contrôle Alexa 555 (Invitrogen).

7. Préparation des billes couplées aux IgG et stimulation de la phagocytose

Pour stimuler la phagocytose, des billes de latex de 3 μ m (7×10^6 billes/ μ L ; Sigma) sont préalablement couplées à des IgG humaines. Les billes (20 μ L par exemple) sont lavées trois fois avec 1mL de tampon MES 25mM (pH 6,0) et centrifugées rapidement puis resuspendues dans 100 μ L de tampon MES et incubées avec 5 μ L d'IgG humaines (Zymed) pendant 45 min avec agitation à température ambiante. Après incubation les billes sont lavées deux fois avec du tampon MES et resuspendues dans du RPMI avec ou sans sérum selon le protocole de stimulation. La solution de billes est ensuite ajoutée aux cellules qui sont placées à 37°C pour déclencher la phagocytose. Dans certains cas, la phagocytose est synchronisée par centrifugation (800rpm, 2min à 20°C) des billes sur les cellules avant d'être placées à 37°C.

8. Etude des cellules vivantes

Afin de déterminer les compartiments contenant les GTPases Ral ou de suivre leur dynamique au cours de la phagocytose, les cellules RAW 264.7 sont transfectées avec les plasmides contenant RalA-GFP ou RalB-GFP. Les cellules sont co-transfectées avec la cathepsin D-RFP afin d'identifier le compartiment lysosomal. Pour la détermination des compartiments endosomaux, les cellules sont préalablement incubées dans du RPMI sans sérum pendant 2h puis la Transferrin-Alexa 568 (Molecular Probes) est dilué à 10 μ g/mL dans du RPMI sans sérum et ajouté aux cellules pendant 30min. Pour le marquage des compartiments acides (endosomes tardifs et lysosomes), les cellules sont utilisées dans les mêmes conditions que pour la Transferrin et le LysoTracker-DND-99 (Molecular Probes) est dilué à 50 nM dans du RPMI sans sérum et incubé pendant 30 à 60min avec les cellules puis le milieu est changé. Le milieu RPMI 10% sérum est remplacé par du milieu RPMI sans colorant (Gibco) ni sérum à 37°C et les cellules vivantes, incubées avec des billes couplées aux IgG sont analysées au microscope confocal.

9. Immunomarquage

Pour déterminer la localisation endogène de RalA ou Exo84, les cellules sont cultivées sur lamelle de verre (12mm) puis incubées ou non en présence de billes-IgG sans synchronisation à 37°C pour déclencher la phagocytose avec environ 5 billes par cellule pendant 5 ou 30 minutes. La phagocytose est ensuite stoppée par deux lavages au PBS (phosphate buffer saline) froid et par fixation dans une solution de fixation au PFA (paraformaldéhyde 4%, tampon NaPO₄ 0,125M) pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec du PFA contenant 0,2% de TritonX-100 (PFA-TritonX-100) pendant 5 minutes puis saturées avec 10% de sérum de chèvre dans du PBS pendant 1 h à température ambiante. Les cellules sont incubées pendant 2h à température ambiante ou la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans une solution de PBS complétementé avec 1% de sérum de chèvre, puis lavées 3 fois 5min avec du PBS. Les anticorps secondaires, dilués dans une solution de PBS complétementé avec 1% de sérum de chèvre, sont incubés avec les cellules pendant 30 minutes et lavés 3 fois min au PBS. Les lamelles sont ensuite montées sur lames avec du Mowiol.

10. Microscopie confocale

Les images sont prises au microscope confocal à balayage laser ZEISS Axiovert 510 avec le programme ZEISS LSM permettant d'effectuer des coupes virtuelles de 0,2 à 0,3µm, le pinhole utilisé étant de 0,7µm. Les protéines fluorescentes sont visualisées à l'aide d'un laser Hélium/Néon, capable d'exciter les fluorophores à la longueur d'onde de 543nm émettant dans le rouge (rhodamine, RFP ou Alexa 555 ou 568), et d'un laser Argon, capable d'exciter les fluorophores à la longueur d'onde de 488nm émettant dans le vert (GFP ou Alexa 488). Les images 8 bits générées sont ensuite exportées en format TIFF et examinées avec Adobe Photoshop.

11. Quantification de la phagocytose

Les cellules sont transfectées avec les formes sauvages ou mutées de RalA et RalB ou avec des ARNi. Les billes-IgG sont ajoutées aux cellules à raison de 25 billes par cellule et centrifugée à 500 rpm pendant 2min pour synchroniser la phagocytose puis placées à 37°C pour déclencher la phagocytose. La phagocytose est ensuite stoppée à 5 ou 30 minutes (sauf

indication contraire) par lavage avec du PBS froid et les cellules fixées au PFA. Les billes externes sont ensuite marquées avec des anticorps de chèvres anti-IgG humaines couplés à l'Alexa 555. Les cellules transfectées sont ensuite perméabilisées avec une solution de PFA-Triton-X100 pendant 5min et lavées au PBS et les constructions Ral sont ensuite marquées par des anticorps dirigés contre myc selon les transfections.

Les billes internalisées, non marquées à l'Alexa 555, sont visualisées au contraste de phase et les cellules et les billes marquées sont visualisées en épifluorescence. Les images sont prises avec un microscope inversé ZEISS Axiovert 200 équipé du logiciel Axiovision et d'illumination à épifluorescence avec un objectif à grossissement 40 fois et d'une caméra AxioCam Mrm. Les images 16 bits sont exportés en format JPG et examinées avec Adobe Photoshop. Dans des champs choisis de façon aléatoire, le nombre moyen de billes internalisées par cellule a été déterminé dans les cellules transfectées et les cellules non transfectées en superposant les images de fluorescence et les images en contraste de phase. Un minimum de 150 cellules par condition ont été comptées, les cellules contrôles ont internalisé en moyenne 2,2 billes par cellule à 5min et 5,5 billes par cellules à 30min. Ces expériences ont été répétées au moins 3 fois. Après calcul du nombre moyen de billes par cellule, l'indice de phagocytose pour les cellules transfectées a été divisé par l'indice des cellules non transfectées issues des mêmes champs et présenté en pourcentage de phagocytose. Le test de Student a été utilisé pour évaluer la significativité des différences entre les indices calculés pour les différentes conditions.

12. Extraction de protéines

Pour préparer des extraits protéiques totaux, les cellules sont solubilisées (sauf indication contraire) dans un tampon de lyse (Tris (pH 7,5) 50mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, 0.5% Triton-X-100, 0.5% deoxycholate et 0,2% de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich)) et les extraits centrifugés à 10 000 g pendant 20 minutes à 4°C.

La quantité de protéines dans les extraits est analysée par la méthode du micro-bradford (Biorad) selon le protocole suivant. La gamme étalon est réalisée à partir de sérum albumine bovine de 0 à 8µg avec addition d'1µL de tampon de lyse. La densité optique des échantillons (1µL) est analysées à la longueur d'onde de 595nm sur plaque ELISA avec un lecteur Mithras LB 940 (logiciel Mikrowin 2000, Berthold Technology). Les résultats sont analysés avec le logiciel Excel et comparés avec la gamme étalon.

13. Activation des GTPases Ral endogènes

Afin de déterminer la quantité de Ral activée au cours de la phagocytose, RalA et RalB activées sont précipitées avec le domaine de liaison de la RalBP1 suivant le protocole fourni dans le kit d'activation de Ral (Upstate Biotechnology). Les cellules sont cultivées en plaques de 6 puits à la densité de 2×10^6 cellules/puits et incubées le lendemain avec du milieu RPMI sans sérum pendant 60 minutes avant stimulation. Les billes couplées aux IgG humaines (environ 25 billes par cellule), resuspendues dans 2 mL de milieu à 20°C, sont ajoutées à chaque puits et la phagocytose est synchronisée en centrifugeant les billes. La phagocytose est déclenchée en plaçant les cellules à 37°C et stoppée par des rinçages au PBS froid, puis les cellules lysées immédiatement dans le tampon de lyse (Tris-HCl (pH7,5) 50mM ; NaCl 0,2M ; NP-40 1% ; MgCl₂ 5mM ; DTT 0,5mM ; glycérol 10%). Pour chaque condition, les Ral-GTP sont précipitées à partir du lysat (1,5 à 2 mg de protéines totales) issus de 3 puits. Les contrôles positifs sont incubés avec 0,1mM de GTP γ S. Les précipités de Ral-GTP sont ensuite analysés par immunoréplique avec un anticorps monoclonal de souris anti-RalA et un anticorps polyclonal de chèvre anti-RalB. Les quantités totales de RalA et RalB sont déterminées par immunoréplique de 1% ou 2% du lysat cellulaire total avant précipitation (correspondant à 10 μ g de protéines pour RalA et 20 μ g de protéines pour RalB).

14. Immunoprécipitation de Sec8

Pour mettre en évidence la formation du complexe de l'exocyste, une immunoprécipitation (IP) de la protéine Sec8 est réalisée. Les cellules sont cultivées sur des plaques de 6 puits (densité 2×10^6 cellules par puits) et stimulées ou non par incubation pendant 30 minutes avec des billes couplées à des IgG, sans centrifugation préalable, à raison de 25 billes par cellule. La phagocytose est stoppée avec deux lavages au PBS froid puis les cellules sont incubées dans 500 μ L (pour 3 puits) de tampon de lyse (Tris-HCl (pH 7,4) 20mM ; NaCl 100mM ; MgCl₂ 1mM ; DTT 0,1mM ; Triton X100 0,5% ; déoxycholate 0,5% ; Glycérol 10% ; 0,2% de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich) ; sodium orthovanadate 0,1mM et NaF 4mM) et lysées à 4°C. Les extraits correspondant à 3 puits pour chaque condition sont placés dans des tubes à vis sur glace à 4°C et centrifugés à 4°C à 10000 rpm pendant 10 minutes pour éliminer débris et noyaux cellulaires. 50 μ L sont ensuite prélevés pour les extraits totaux et le reste incubé avec agitation sur la nuit à 4°C avec des anticorps primaires de souris anti-Sec8 dilués 1:150. Les billes couplées aux protéines A/G

(Santa Cruz Biotechnology) sont préparées à raison de 30 μL par tube d'extraits après 3 lavages au tampon de lavage (correspondant au tampon de lyse sans détergeant) et 3 centrifugations (3000rpm, 30 sec à 4°C). Les billes A/G sont ensuite incubées avec les extraits pendant 2h à 4°C avec agitation et centrifugées à 3000rpm, 30 sec à 4°C pour précipiter les billes A/G couplées aux anticorps primaires. Les précipités contenant les billes sont ensuite lavés 4 fois avec 400 μL de tampon de lavage avant d'être resuspendus dans 20 μL de tampon de charge. Les échantillons sont analysés par immunoréplique avec des anticorps dirigés contre Sec8, Sec5, Exo84, RalA et RalB.

15.Immunoprécipitation de la PLD1-HA et de la PLD2-HA

Pour déterminer une éventuelle interaction entre les GTPases Ral et la PLD, nous avons cherché à immunoprécipiter la PLD1-HA et la PLD2-HA dans des cellules transfectées avec ces constructions. Les cellules sont cultivées sur plaques de 6 puits (densité 2×10^6 cellules par puits) et incubées ou non pendant 30 minutes avec des billes-IgG à raison de 25 billes par cellule. La phagocytose est stoppée avec deux lavages au PBS froid puis les cellules sont incubées dans 500 μL (pour 3 puits) de tampon de lyse (Tris (pH 7,4) 50mM ; NaCl 150mM ; MgCl_2 1mM ; DTT 0,1mM ; Triton X100 0,5% ; déoxycholate 0,5% ; 0,2% de cocktail d'inhibiteurs de protéases) et lysées à 4°C. Les extraits correspondant à 3 puits pour chaque condition sont placés dans des tubes à vis sur glace à 4°C et centrifugés à 4°C à 10000 rpm pendant 10 minutes pour éliminer débris et noyaux cellulaires. 50 μL sont ensuite prélevés pour analyser les extraits totaux et le reste incubé la nuit à 4°C avec 30 μL d'anticorps de rat anti-HA couplés à l'agarose (HA Affinity Matrix, Roche) pour précipiter la PLD1-HA ou la PLD2-HA. Les billes d'agarose ensuite lavées 4 fois avec du tampon de lavage (correspondant au tampon de lyse sans détergeant) et 4 centrifugations (3000rpm, 30 sec à 4°C) avant d'être resuspendus dans 20 μL de tampon de charge. Les échantillons sont ensuite analysés par immunoréplique avec des anticorps dirigés contre le tag HA, RalA et RalB.

16. Immunorépliques

Les protéines extraites sont resuspendues dans du tampon de charge (Tris HCl 10mM ; pH8 ; EDTA 1mM ; DTT 20mM; SDS 3% ; glycérol 10% ; bleu de bromophénol 0,001%) et chauffées à 95°C pendant 5min. Les protéines sont ensuite séparées sur des gels gradients d'acrylamide 4-12% Nupage dans du tampon MES (Invitrogen) à 200V pendant 40min et transférés sur nitrocellulose à 30V pendant 70min dans du tampon de transfert (Invitrogen) avec 20% d'éthanol. Dans le cas des extraits issus des immunoprécipitations de Sec8, la séparation se fait sur des gels (Tris-glycine) 4-20% avec un tampon de migration différent (Tris HCl 25mM, pH 8,3 ; glycine 192mM ; SDS 0,1%) mais dans les mêmes conditions.

Les immunorépliques sont découpées selon les protéines recherchées puis lavées au TBS (Tris Buffer Saline, Euromedex) avec 0,1% de Tween 20. Les bandes de nitrocellulose sont ensuite saturées avec du TBS-Tween complété avec 5% de lait (Régilait) pendant 30min à 1h à température ambiante avec agitation puis incubés pendant 2h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C avec les solutions de Régilait contenant les anticorps primaires. Les immunorépliques sont lavées avec du TBS-Tween 4 fois 5min et ensuite incubés avec les anticorps secondaires de chèvre anti-souris ou anti-lapin couplés à la HRP (Pierce Biotechnology, dilutions 1:3000) ou d'âne anti-chèvre couplés à la HRP dilués 1:50000 (Santa Cruz). Après lavage les immunorépliques sont révélées à l'aide du kit de révélation de chimioluminescence Supersignal (Pierce Biotechnology). Lors des expériences sur des cellules transfectées avec les ARNi ou pour les expériences de détection de Ral-GTP, l'actine a été révélée pour contrôler la quantité de protéines chargée pour chaque condition. Les images numériques des immunorépliques sont prises et analysées avec le système d'acquisition Cemi-Smart 5000 et le programme Chemi-capt (Vilber Lourmat) et examinées avec Photoshop.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P** (2003) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12889-12894.
- Agarwal A, Salem P, Robbins KC** (1993) Involvement of p72syk, a protein-tyrosine kinase, in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem* 268:15900-15905.
- Al-Daccak R, Mooney N, Charron D** (2004) MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 16:108-113.
- Albright CF, Giddings BW, Liu J, Vito M, Weinberg RA** (1993) Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. *Embo J* 12:339-347.
- Allen LA, Aderem A** (1996) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 184:627-637.
- Allen LA, Yang C, Pessin JE** (2002) Rate and extent of phagocytosis in macrophages lacking vamp3. *J Leukoc Biol* 72:217-221.
- Araki N** (2006) Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Front Biosci* 11:1479-1490.
- Araki N, Johnson MT, Swanson JA** (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135:1249-1260.
- Axelrod D, Thompson NL, Burghardt TP** (1983) Total internal reflection fluorescent microscopy. *J Microsc* 129:19-28.

B

- Bader MF, Doussau F, Chasserot-Golaz S, Vitale N, Gasman S** (2004) Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1742:37-49.
- Bae CD, Min DS, Fleming IN, Exton JH** (1998) Determination of interaction sites on the small G protein RhoA for phospholipase D. *J Biol Chem* 273:11596-11604.
- Bajno L, Peng XR, Schreiber AD, Moore HP, Trimble WS, Grinstein S** (2000) Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* 149:697-706.
- Balana ME, Niedergang F, Subtil A, Alcover A, Chavrier P, Dautry-Varsat A** (2005) ARF6 GTPase controls bacterial invasion by actin remodelling. *J Cell Sci* 118:2201-2210.
- Bangs P, Franc N, White K** (2000) Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 7:1027-1034.
- Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG** (2000) Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* 1:235-247.
- Becker T, Volchuk A, Rothman JE** (2005) Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4022-4026.
- Benhamou M, Ryba NJ, Kihara H, Nishikata H, Siraganian RP** (1993) Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* 268:23318-23324.

- Bhattacharya M, Babwah AV, Godin C, Anborgh PH, Dale LB, Poulter MO, Ferguson SSG** (2004) Ral and Phospholipase D2-Dependent Pathway for Constitutive Metabotropic Glutamate Receptor Endocytosis. *J Neurosci* 24:8752-8761.
- Bhattacharya M, Anborgh PH, Babwah AV, Dale LB, Dobransky T, Benovic JL, Feldman RD, Verdi JM, Rylett RJ, Ferguson SS** (2002) Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat Cell Biol* 4:547-555.
- Bielinski DF, Pyun HY, Linko-Stentz K, Macara IG, Fine RE** (1993) Ral and Rab3a are major GTP-binding proteins of axonal rapid transport and synaptic vesicles and do not redistribute following depolarization stimulated synaptosomal exocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1151:246-256.
- Bishop NE** (2003) Dynamics of endosomal sorting. *Int Rev Cytol* 232:1-57.
- Blander JM** (2007) Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cell Microbiol* 9:290-299.
- Blander JM, Medzhitov R** (2006) On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat Immunol* 7:1029-1035.
- Blocker A, Griffiths G, Olivo JC, Hyman AA, Severin FF** (1998) A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *J Cell Sci* 111 (Pt 3):303-312.
- Bodman-Smith KB, Melendez AJ, Campbell I, Harrison PT, Allen JM, Raynes JG** (2002) C-reactive protein-mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (Fc γ RI). *Immunology* 107:252-260.
- Bosque F, Belkaid Y, Briend E, Hevin B, Lebastard M, Soussi N, Milon G** (1997) The biology of macrophages. *Pathol Biol (Paris)* 45:103-109.
- Botelho RJ, Teruel M, Dierckman R, Anderson R, Wells A, York JD, Meyer T, Grinstein S** (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 151:1353-1368.
- Brandt DT, Marion S, Griffiths G, Watanabe T, Kaibuchi K, Grosse R** (2007) Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J Cell Biol* 178:193-200.
- Braun V, Fraissier V, Raposo G, Hurbain I, Sibarita JB, Chavrier P, Galli T, Niedergang F** (2004) TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J* 23:4166-4176.
- Brown FD, Thompson N, Saqib KM, Clark JM, Powner D, Thompson NT, Solari R, Wakelam MJ** (1998) Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr Biol* 8:835-838.
- Brown HA, Gutowski S, Kahn RA, Sternweis PC** (1995) Partial purification and characterization of Arf-sensitive phospholipase D from porcine brain. *J Biol Chem* 270:14935-14943.
- Brown HA, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, Sternweis PC** (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75:1137-1144.
- Brown MD, Sacks DB** (2006) IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol* 16:242-249.
- Brymora A, Valova VA, Larsen MR, Roufogalis BD, Robinson PJ** (2001) The brain exocyst complex interacts with RalA in a GTP-dependent manner: identification of a novel mammalian Sec3 gene and a second Sec15 gene. *J Biol Chem* 276:29792-29797.

C

- Camonis JH, White MA** (2005) Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol* 15:327-332.
- Cantor SB, Urano T, Feig LA** (1995) Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Mol Cell Biol* 15:4578-4584.
- Cantrell DA** (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114:1439-1445.
- Caron E, Hall A** (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282:1717-1721.
- Caron E, Self AJ, Hall A** (2000) The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol* 10:974-978.
- Castellano F, Chavrier P, Caron E** (2001) Actin dynamics during phagocytosis. *Seminars in Immunology* 13:347-355.
- Caumont AS, Galas MC, Vitale N, Aunis D, Bader MF** (1998) Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J Biol Chem* 273:1373-1379.
- Chavrier P** (2002) May the force be with you: Myosin-X in phagocytosis. *Nat Cell Biol* 4:E169-171.
- Cheeseman KL, Ueyama T, Michaud TM, Kashiwagi K, Wang D, Flax LA, Shirai Y, Loegering DJ, Saito N, Lennartz MR** (2006) Targeting of protein kinase C-epsilon during Fcgamma receptor-dependent phagocytosis requires the epsilonC1B domain and phospholipase C-gamma1. *Mol Biol Cell* 17:799-813.
- Chen XW, Inoue M, Hsu SC, Saltiel AR** (2006) RalA-exocyst dependent recycling endosome trafficking is required for the completion of cytokinesis. *J Biol Chem*.
- Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, Frohman MA, Morris AJ, Shields D** (1997) Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 138:495-504.
- Chien Y, White MA** (2003) RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep* 4:800-806.
- Choi WS, Kim YM, Combs C, Frohman MA, Beaven MA** (2002) Phospholipases D1 and D2 Regulate Different Phases of Exocytosis in Mast Cells. *J Immunol* 168:5682-5689.
- Ciesielski-Treska J, Grant NJ, Ulrich G, Corrotte M, Bailly Y, Haeberle AM, Chasserot-Golaz S, Bader MF** (2004) Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia. *Glia* 46:101-115.
- Clough RR, Sidhu RS, Bhullar RP** (2002) Calmodulin binds RalA and RalB and is required for the thrombin-induced activation of Ral in human platelets. *J Biol Chem* 277:28972-28980.
- Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuller Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA** (1997a) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7:191-201.
- Colley WC, Altshuller Y, Sue-Ling CK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Branch KD, Tsirka SE, Bollag RJ, Bollag WB, Frohman MA** (1997b) Cloning and expression analysis of murine phospholipase D1. *Biochem J* 326 (Pt 3):745-753.
- Colucci-Guyon E, Niedergang F, Wallar BJ, Peng J, Alberts AS, Chavrier P** (2005) A role for mammalian diaphanous-related formins in complement receptor (CR3)-mediated phagocytosis in macrophages. *Curr Biol* 15:2007-2012.

- Coluccio A, Malzone M, Neiman AM** (2004) Genetic evidence of a role for membrane lipid composition in the regulation of soluble NEM-sensitive factor receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 166:89-97.
- Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J, Schreiber AD, Trimble WS, Anderson R, Grinstein S** (2002) Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Ialpha impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J Biol Chem* 277:43849-43857.
- Corrotte M, Chasserot-Golaz S, Huang P, Du G, Ktistakis NT, Frohman MA, Vitale N, Bader MF, Grant NJ** (2006) Dynamics and function of phospholipase d and phosphatidic Acid during phagocytosis. *Traffic* 7:365-377.
- Cougoule C, Hoshino S, Dart A, Lim J, Caron E** (2006) Dissociation of recruitment and activation of the small G-protein Rac during Fcgamma receptor-mediated phagocytosis. *J Biol Chem* 281:8756-8764.
- Cox D, Greenberg S** (2001) Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol* 13:339-345.
- Cox D, Tseng CC, Bjekic G, Greenberg S** (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem* 274:1240-1247.
- Cox D, Lee DJ, Dale BM, Calafat J, Greenberg S** (2000) A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:680-685.
- Cox D, Berg JS, Cammer M, Chingwundoh JO, Dale BM, Cheney RE, Greenberg S** (2002) Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol* 4:469-477.
- Czibener C, Sherer NM, Becker SM, Pypaert M, Hui E, Chapman ER, Mothes W, Andrews NW** (2006) Ca²⁺ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *J Cell Biol* 174:997-1007.

D

- D'Souza-Schorey C, van Donselaar E, Hsu VW, Yang C, Stahl PD, Peters PJ** (1998) ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J Cell Biol* 140:603-616.
- Daeron M** (1997) Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 15:203-234.
- Damiani MT, Pavarotti M, Leiva N, Lindsay AJ, McCaffrey MW, Colombo MI** (2004) Rab coupling protein associates with phagosomes and regulates recycling from the phagosomal compartment. *Traffic* 5:785-797.
- de Leeuw HP, Fernandez-Borja M, Reits EA, Romani de Wit T, Wijers-Koster PM, Hordijk PL, Neefjes J, van Mourik JA, Voorberg J** (2001) Small GTP-binding protein Ral modulates regulated exocytosis of von Willebrand factor by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:899-904.
- de Ruiter ND, Wolthuis RM, van Dam H, Burgering BM, Bos JL** (2000) Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway. *Mol Cell Biol* 20:8480-8488.
- Dermine JF, Duclos S, Garin J, St-Louis F, Rea S, Parton RG, Desjardins M** (2001) Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* 276:18507-18512.
- Desjardins M** (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* 5:183-186.
- Desjardins M** (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3:280-291.

- Desjardins M, Houde M, Gagnon E** (2005) Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev* 207:158-165.
- Di A, Nelson DJ, Bindokas V, Brown ME, Libunao F, Palfrey HC** (2003) Dynamin Regulates Focal Exocytosis in Phagocytosing Macrophages. *Mol Biol Cell* 14:2016-2028.
- Dormann D, Weijer G, Dowler S, Weijer CJ** (2004) In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during Dictyostelium phagocytosis and chemotaxis. *J Cell Sci* 117:6497-6509.
- dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ** (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83:433-473.
- Du G, Altshuller YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, Morris AJ, Bader MF, Frohman MA** (2003) Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* 162:305-315.

E

- Eng EW, Bettio A, Ibrahim J, Harrison RE** (2007) MTOC reorientation occurs during FcγR-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol Biol Cell* 18:2389-2399.
- Etienne-Manneville S, Hall A** (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.

F

- Fallman M, Gullberg M, Hellberg C, Andersson T** (1992) Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *J Biol Chem* 267:2656-2663.
- Feig LA** (2003) Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* 13:419-425.
- Feig LA, Urano T, Cantor S** (1996) Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci* 21:438-441.
- Flutter B, Gao B** (2004) MHC class I antigen presentation--recently trimmed and well presented. *Cell Mol Immunol* 1:22-30.
- Franc NC, White K** (2000) Innate recognition systems in insect immunity and development: new approaches in Drosophila. *Microbes Infect* 2:243-250.
- Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA** (1996) Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4:431-443.
- Frankel P, Ramos M, Flom J, Bychenok S, Joseph T, Kerkhoff E, Rapp UR, Feig LA, Foster DA** (1999) Ral and Rho-dependent activation of phospholipase D in v-Raf-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255:502-507.
- Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V** (2001) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 154:631-644.
- Freyberg Z, Bourgoin S, Shields D** (2002) Phospholipase D2 is localized to the rims of the Golgi apparatus in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 13:3930-3942.
- Freyberg Z, Siddhanta A, Shields D** (2003) "Slip, sliding away": phospholipase D and the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* 13:540-546.

Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoïn S, Frohman M, Shields D (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12:943-955.

G

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

Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine J-F, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M (2001) The Phagosome Proteome: Insight into Phagosome Functions. *J Cell Biol* 152:165-180.

Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20:269-287.

Gildea JJ, Harding MA, Seraj MJ, Gulding KM, Theodorescu D (2002) The role of Ral A in epidermal growth factor receptor-regulated cell motility. *Cancer Res* 62:982-985.

Goley ED, Welch MD (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:713-726.

Goode BL, Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* 76:593-627.

Govind S, Nehm RH (2004) Innate immunity in fruit flies: a textbook example of genomic recycling. *PLoS Biol* 2:E276.

Greco E, De Spirito M, Papi M, Fossati M, Auricchio G, Fraziano M (2006) CpG oligodeoxynucleotides induce Ca²⁺-dependent phospholipase D activity leading to phagolysosome maturation and intracellular mycobacterial growth inhibition in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 347:963-969.

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

Gumienny TL, Lambie E, Hartwig E, Horvitz HR, Hengartner MO (1999) Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126:1011-1022.

Guo W, Tamanoi F, Novick P (2001) Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol* 3:353-360.

H

Hackam DJ, Rotstein OD, Sjolín C, Schreiber AD, Trimble WS, Grinstein S (1998) v-Snare-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11691-11696.

Hall AB, Gakidis MA, Glogauer M, Wilsbacher JL, Gao S, Swat W, Brugge JS (2006) Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcγR- and complement-mediated phagocytosis. *Immunity* 24:305-316.

Hammond SM, Jenco JM, Nakashima S, Cadwallader K, Gu Q, Cook S, Nozawa Y, Prestwich GD, Frohman MA, Morris AJ (1997) Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-α. *J Biol Chem* 272:3860-3868.

- Hatsuzawa K, Tamura T, Hashimoto H, Hashimoto H, Yokoya S, Miura M, Nagaya H, Wada I** (2006) Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* 17:3964-3977.
- Hodgkin MN, Clark JM, Rose S, Saqib K, Wakelam MJ** (1999) Characterization of the regulation of phospholipase D activity in the detergent-insoluble fraction of HL60 cells by protein kinase C and small G-proteins. *Biochem J* 339 (Pt 1):87-93.
- Hodgkin MN, Masson MR, Powner D, Saqib KM, Ponting CP, Wakelam MJ** (2000) Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-biphosphate-specific PH domain. *Curr Biol* 10:43-46.
- Holevinsky KO, Nelson DJ** (1998) Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophys J* 75:2577-2586.
- Honda A, Nogami M, Yokozeiki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA, Kanaho Y** (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99:521-532.
- Hoppe AD, Swanson JA** (2004) Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Mol Biol Cell* 15:3509-3519.
- Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M** (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.
- Hughes WE, Elgundi Z, Huang P, Frohman MA, Biden TJ** (2004) Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 279:27534-27541.
- Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, Poulain B** (2001) A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15300-15305.
- Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S** (2007) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *Embo J* 26:313-324.

I

- Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Wada T, Yazaki Y, Asano T, Oka Y** (1998) Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 273:8741-8748.
- Iyer SS, Barton JA, Bourgoignie S, Kusner DJ** (2004) Phospholipases D1 and D2 Coordinately Regulate Macrophage Phagocytosis. *J Immunol* 173:2615-2623.

J

- Jahraus A, Tjelle TE, Berg T, Habermann A, Storrie B, Ullrich O, Griffiths G** (1998) In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. *J Biol Chem* 273:30379-30390.
- Janssen KP, Schleicher M** (2001) Dictyostelium discoideum: a genetic model system for the study of professional phagocytes. Profilin, phosphoinositides and the Imp gene family in Dictyostelium. *Biochim Biophys Acta* 1525:228-233.
- Jenkins G, Fisette P, Anderson R** (1994) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 269:11547-11554.

- Jenkins GM, Frohman MA** (2005) Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62:2305-2316.
- Jiang H, Luo JQ, Urano T, Frankel P, Lu Z, Foster DA, Feig LA** (1995) Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 378:409-412.
- Jin R, Junutula JR, Matern HT, Ervin KE, Scheller RH, Brunger AT** (2005) Exo84 and Sec5 are competitive regulatory Sec6/8 effectors to the RalA GTPase. *Embo J* 24:2064-2074.
- Jose Lopez-Andreo M, Gomez-Fernandez JC, Corbalan-Garcia S** (2003) The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase Cepsilon to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol Biol Cell* 14:4885-4895.
- Jullien-Flores V, Mahe Y, Mirey G, Leprince C, Meunier-Bisceuil B, Sorkin A, Camonis JH** (2000) RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. *J Cell Sci* 113 (Pt 16):2837-2844.
- Jullien-Flores V, Dorseuil O, Romero F, Letourneur F, Saragosti S, Berger R, Tavitian A, Gacon G, Camonis JH** (1995) Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase-activating protein activity. *J Biol Chem* 270:22473-22477.
- Jutras I, Desjardins M** (2005) Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:511-527.

K

- Kam Y, Exton JH** (2002) Dimerization of phospholipase D isozymes. *Biochem Biophys Res Commun* 290:375-380.
- Kaplan G** (1977) Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol* 6:797-807.
- Kee Y, Yoo JS, Hazuka CD, Peterson KE, Hsu SC, Scheller RH** (1997) Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14438-14443.
- Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pawson T** (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 18:4209-4220.
- Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL, Gilliland LK, Rowley RB, Bolen JB, Ledbetter JA** (1993) Cross-linking of Fc gamma receptor I (Fc gamma RI) and receptor II (Fc gamma RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem* 268:24442-24448.
- Kim JH, Lee SD, Han JM, Lee TG, Kim Y, Park JB, Lambeth JD, Suh PG, Ryu SH** (1998) Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. *FEBS Lett* 430:231-235.
- Kishida S, Koyama S, Matsubara K, Kishida M, Matsuura Y, Kikuchi A** (1997) Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene* 15:2899-2907.
- Konzok A, Weber I, Simmeth E, Hacker U, Maniak M, Muller-Taubenberger A** (1999) DAip1, a Dictyostelium homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J Cell Biol* 146:453-464.
- Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KNJ** (2003) Modulation of Membrane Curvature by Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid. *Traffic* 4:162-174.

- Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P** (2006) Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 11:1709-1726.
- Ktistakis NT, Brown HA, Sternweis PC, Roth MG** (1995) Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4952-4956.
- Kurata S, Ariki S, Kawabata S** (2006) Recognition of pathogens and activation of immune responses in *Drosophila* and horseshoe crab innate immunity. *Immunobiology* 211:237-249.
- Kusner DJ, Hall CF, Schlesinger LS** (1996) Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages. *J Exp Med* 184:585-595.
- Kusner DJ, Hall CF, Jackson S** (1999) Fcγ receptor-mediated activation of phospholipase D regulates macrophage phagocytosis of IgG-opsonized particles. *J Immunol* 162:2266-2274.

L

- Lalli G, Hall A** (2005) Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex. *J Cell Biol* 171:857-869.
- Larsen EC, DiGennaro JA, Saito N, Mehta S, Loegering DJ, Mazurkiewicz JE, Lennartz MR** (2000) Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol* 165:2809-2817.
- Lebreton S, Boissel L, Iouzalén N, Moreau J** (2004) RLIP mediates downstream signalling from RalB to the actin cytoskeleton during *Xenopus* early development. *Mech Dev* 121:1481-1494.
- Lee E, Pang K, Knecht D** (2001) The regulation of actin polymerization and cross-linking in *Dictyostelium*. *Biochim Biophys Acta* 1525:217-227.
- Lee YH, Kim HS, Pai JK, Ryu SH, Suh PG** (1994) Activation of phospholipase D induced by platelet-derived growth factor is dependent upon the level of phospholipase C-γ1. *J Biol Chem* 269:26842-26847.
- Lemaitre B, Hoffmann J** (2007) The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*.
- Lettre G, Hengartner MO** (2006) Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:97-108.
- Li G, Han L, Chou TC, Fujita Y, Arunachalam L, Xu A, Wong A, Chiew SK, Wan Q, Wang L, Sugita S** (2007) RalA and RalB function as the critical GTP sensors for GTP-dependent exocytosis. *J Neurosci* 27:190-202.
- Liang JO, Sung TC, Morris AJ, Frohman MA, Kornfeld S** (1997) Different domains of mammalian ADP-ribosylation factor 1 mediate interaction with selected target proteins. *J Biol Chem* 272:33001-33008.
- Lim KH, O'Hayer K, Adam SJ, Kendall SD, Campbell PM, Der CJ, Counter CM** (2006) Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Curr Biol* 16:2385-2394.
- Lindsay AJ, McCaffrey MW** (2004) The C2 domains of the class I Rab11 family of interacting proteins target recycling vesicles to the plasma membrane. *J Cell Sci* 117:4365-4375.
- Lindsay AJ, Hendrick AG, Cantalupo G, Senic-Matuglia F, Goud B, Bucci C, McCaffrey MW** (2002) Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. *J Biol Chem* 277:12190-12199.

- Liu S, Wilson KA, Rice-Stitt T, Neiman AM, McNew JA** (2007) In Vitro Fusion Catalyzed by the Sporulation-Specific t-SNARE Light-Chain Spo20p is Stimulated by Phosphatidic Acid. *Traffic*.
- Luo JQ, Liu X, Frankel P, Rotunda T, Ramos M, Flom J, Jiang H, Feig LA, Morris AJ, Kahn RA, Foster DA** (1998) Functional association between Arf and RalA in active phospholipase D complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3632-3637.
- Lutz MA, Correll PH** (2003) Activation of CR3-mediated phagocytosis by MSP requires the RON receptor, tyrosine kinase activity, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C zeta. *J Leukoc Biol* 73:802-814.

M

- M'Rabet L, Coffe PJ, Wolthuis RM, Zwartkruis F, Koenderman L, Bos JL** (1999) Differential fMet-Leu-Phe- and platelet-activating factor-induced signaling toward Ral activation in primary human neutrophils. *J Biol Chem* 274:21847-21852.
- Makranz C, Cohen G, Baron A, Levidor L, Kodama T, Reichert F, Rotshenker S** (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase, phosphoinositide-specific phospholipase-Cgamma and protein kinase-C signal myelin phagocytosis mediated by complement receptor-3 alone and combined with scavenger receptor-AI/II in macrophages. *Neurobiol Dis* 15:279-286.
- Malcolm KC, Elliott CM, Exton JH** (1996) Evidence for Rho-mediated agonist stimulation of phospholipase D in rat1 fibroblasts. Effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J Biol Chem* 271:13135-13139.
- Mallat M, Marin-Teva JL, Cheret C** (2005) Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15:101-107.
- Mangahas PM, Zhou Z** (2005) Clearance of apoptotic cells in Caenorhabditis elegans. *Semin Cell Dev Biol* 16:295-306.
- Maniak M, Rauchenberger R, Albrecht R, Murphy J, Gerisch G** (1995) Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 83:915-924.
- Manifava M, Thuring JWJF, Lim Z-Y, Packman L, Holmes AB, Ktistakis NT** (2001) Differential Binding of Traffic-related Proteins to Phosphatidic Acid- or Phosphatidylinositol (4,5)- Bisphosphate-coupled Affinity Reagents. *J Biol Chem* 276:8987-8994.
- Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Carey SS, Shayman JA, Boxer LA** (2002) Regulation of polymorphonuclear leukocyte degranulation and oxidant production by ceramide through inhibition of phospholipase D. *Blood* 99:1434-1441.
- Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Borofsky MS, Shayman JA, Boxer LA** (2005) Phagocytic signaling molecules in lipid rafts of COS-1 cells transfected with FcgammaRIIA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331:132-138.
- Mark BL, Jilkina O, Bhullar RP** (1996) Association of Ral GTP-binding protein with human platelet dense granules. *Biochem Biophys Res Commun* 225:40-46.
- Martin A, Brown FD, Hodgkin MN, Bradwell AJ, Cook SJ, Hart M, Wakelam MJ** (1996) Activation of phospholipase D and phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in HL60 membranes is mediated by endogenous Arf but not Rho. *J Biol Chem* 271:17397-17403.
- Massol P, Montcourrier P, Guillemot JC, Chavrier P** (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *Embo J* 17:6219-6229.

- Matsubara K, Kishida S, Matsuura Y, Kitayama H, Noda M, Kikuchi A** (1999) Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* 18:1303-1312.
- McDermott M, Wakelam MJ, Morris AJ** (2004) Phospholipase D. *Biochem Cell Biol* 82:225-253.
- Min DS, Exton JH** (1998) Phospholipase D is associated in a phorbol ester-dependent manner with protein kinase C-alpha and with a 220-kDa protein which is phosphorylated on serine and threonine. *Biochem Biophys Res Commun* 248:533-537.
- Moller W, Nemoto I, Matsuzaki T, Hofer T, Heyder J** (2000) Magnetic phagosome motion in J774A.1 macrophages: influence of cytoskeletal drugs. *Biophys J* 79:720-730.
- Moskalenko S, Henry DO, Rosse C, Mirey G, Camonis JH, White MA** (2002) The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* 4:66-72.
- Moskalenko S, Tong C, Rosse C, Mirey G, Formstecher E, Daviet L, Camonis J, White MA** (2003) Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit interactions. *J Biol Chem* 278:51743-51748.
- Moss J, Vaughan M** (1998) Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* 273:21431-21434.
- Muller-Taubenberger A, Lupas AN, Li H, Ecke M, Simmeth E, Gerisch G** (2001) Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J* 20:6772-6782.

N

- Nakanishi H, Morishita M, Schwartz CL, Coluccio A, Engebrecht J, Neiman AM** (2006) Phospholipase D and the SNARE Sso1p are necessary for vesicle fusion during sporulation in yeast. *J Cell Sci* 119:1406-1415.
- Nakano K, Takaishi K, Kodama A, Mammoto A, Shiozaki H, Monden M, Takai Y** (1999) Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 10:2481-2491.
- Nakashima S, Morinaka K, Koyama S, Ikeda M, Kishida M, Okawa K, Iwamatsu A, Kishida S, Kikuchi A** (1999) Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *Embo J* 18:3629-3642.
- Neiman AM** (1998) Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *J Cell Biol* 140:29-37.
- Ngsee JK, Elferink LA, Scheller RH** (1991) A family of ras-like GTP-binding proteins expressed in electromotor neurons. *J Biol Chem* 266:2675-2680.
- Niedergang F, Chavrier P** (2004) Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol* 16:422-428.
- Niedergang F, Colucci-Guyon E, Dubois T, Raposo G, Chavrier P** (2003) ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol* 161:1143-1150.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV** (2006) Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24:19-28.

O

- Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH, Stossel TP** (1999) The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2122-2128.

- Oikawa T, Yamaguchi H, Itoh T, Kato M, Ijuin T, Yamazaki D, Suetsugu S, Takenawa T** (2004) PtdIns(3,4,5)P₃ binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol* 6:420-426.
- Olazabal IM, Caron E, May RC, Schilling K, Knecht DA, Machesky LM** (2002) Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis. *Curr Biol* 12:1413-1418.
- Oxford G, Owens CR, Titus BJ, Foreman TL, Herlevsen MC, Smith SC, Theodorescu D** (2005) RalA and RalB: antagonistic relatives in cancer cell migration. *Cancer Res* 65:7111-7120.

P

- Paolini R, Jouvin MH, Kinet JP** (1991) Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature* 353:855-858.
- Park JB** (2001) Regulation of GTP-binding state in RalA through Ca²⁺ and calmodulin. *Exp Mol Med* 33:54-58.
- Park SH, Weinberg RA** (1995) A putative effector of Ral has homology to Rho/Rac GTPase activating proteins. *Oncogene* 11:2349-2355.
- Patel JC, Hall A, Caron E** (2002) Vav Regulates Activation of Rac but Not Cdc42 during FcγR-mediated Phagocytosis. *Mol Biol Cell* 13:1215-1226.
- Pathre P, Shome K, Blumental-Perry A, Bielli A, Haney CJ, Alber S, Watkins SC, Romero G, Aridor M** (2003) Activation of phospholipase D by the small GTPase Sar1p is required to support COPII assembly and ER export. *Embo J* 22:4059-4069.
- Pearson AM, Baksa K, Ramet M, Protas M, McKee M, Brown D, Ezekowitz RA** (2003) Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect* 5:815-824.
- Pellegrin S, Mellor H** (2005) The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol* 15:129-133.
- Penaloza C, Lin L, Lockshin RA, Zakeri Z** (2006) Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol* 126:149-158.
- Pitt A, Mayorga LS, Schwartz AL, Stahl PD** (1992) Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. *J Biol Chem* 267:126-132.
- Polzin A, Shipitsin M, Goi T, Feig LA, Turner TJ** (2002) Ral-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Mol Cell Biol* 22:1714-1722.

R

- Ramachandra L, Song R, Harding CV** (1999) Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide: class II MHC complexes. *J Immunol* 162:3263-3272.
- Rosse C, Hatzoglou A, Parrini MC, White MA, Chavrier P, Camonis J** (2006) RalB Mobilizes the Exocyst To Drive Cell Migration. *Mol Cell Biol* 26:727-734.
- Rudge SA, Morris AJ, Engebrecht J** (1998) Relocalization of phospholipase D activity mediates membrane formation during meiosis. *J Cell Biol* 140:81-90.
- Rudge SA, Zhou C, Engebrecht J** (2002) Differential regulation of *Saccharomyces cerevisiae* phospholipase D in sporulation and Sec14-independent secretion. *Genetics* 160:1353-1361.

- Rudge SA, Pettitt TR, Zhou C, Wakelam MJ, Engebrecht JA** (2001) SPO14 separation-of-function mutations define unique roles for phospholipase D in secretion and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 158:1431-1444.
- Rumenapp U, Geiszt M, Wahn F, Schmidt M, Jakobs KH** (1995) Evidence for ADP-ribosylation-factor-mediated activation of phospholipase D by m3 muscarinic acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 234:240-244.
- Rupper A, Cardelli J** (2001) Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* 1525:205-216.
- Rupper A, Grove B, Cardelli J** (2001) Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 114:2449-2460.

S

- Sawamoto K, Yamada C, Kishida S, Hirota Y, Taguchi A, Kikuchi A, Okano H** (1999) Ectopic expression of constitutively activated Ral GTPase inhibits cell shape changes during *Drosophila* eye development. *Oncogene* 18:1967-1974.
- Schirenbeck A, Bretschneider T, Arasada R, Schleicher M, Faix J** (2005) The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol* 7:619-625.
- Sciorra VA, Morris AJ** (1999) Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 10:3863-3876.
- Sciorra VA, Rudge SA, Prestwich GD, Frohman MA, Engebrecht J, Morris AJ** (1999) Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. *Embo J* 18:5911-5921.
- Sciorra VA, Rudge SA, Wang J, McLaughlin S, Engebrecht J, Morris AJ** (2002) Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes. *J Cell Biol* 159:1039-1049.
- Scott CC, Dobson W, Botelho RJ, Coady-Osberg N, Chavrier P, Knecht DA, Heath C, Stahl P, Grinstein S** (2005) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol* 169:139-149.
- Serrander L, Fallman M, Stendahl O** (1996) Activation of phospholipase D is an early event in integrin-mediated signalling leading to phagocytosis in human neutrophils. *Inflammation* 20:439-450.
- Shipitsin M, Feig LA** (2004) RalA but not RalB enhances polarized delivery of membrane proteins to the basolateral surface of epithelial cells. *Mol Cell Biol* 24:5746-5756.
- Sidhu RS, Clough RR, Bhullar RP** (2005) Regulation of phospholipase C-delta1 through direct interactions with the small GTPase Ral and calmodulin. *J Biol Chem* 280:21933-21941.
- Siegel DP** (1999) The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys J* 76:291-313.
- Sobota A, Strzelecka-Kiliszek A, Gladkowska E, Yoshida K, Mrozinska K, Kwiatkowska K** (2005) Binding of IgG-opsonized particles to Fc gamma R is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation. *J Immunol* 175:4450-4457.
- Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD** (2006) Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol* 4:e4.
- Stuart LM, Ezekowitz RA** (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22:539-550.

- Stuart LM, Boulais J, Charriere GM, Hennessy EJ, Brunet S, Jutras I, Goyette G, Rondeau C, Letarte S, Huang H, Ye P, Morales F, Kocks C, Bader JS, Desjardins M, Ezekowitz RA** (2007) A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature* 445:95-101.
- Stutchfield J, Cockcroft S** (1993) Correlation between secretion and phospholipase D activation in differentiated HL60 cells. *Biochem J* 293 (Pt 3):649-655.
- Suchard SJ, Hinkovska-Galcheva V, Mansfield PJ, Boxer LA, Shayman JA** (1997) Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 89:2139-2147.
- Sugihara K, Asano S, Tanaka K, Iwamatsu A, Okawa K, Ohta Y** (2002) The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat Cell Biol* 4:73-78.
- Sung TC, Zhang Y, Morris AJ, Frohman MA** (1999a) Structural analysis of human phospholipase D1. *J Biol Chem* 274:3659-3666.
- Sung TC, Altshuller YM, Morris AJ, Frohman MA** (1999b) Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *J Biol Chem* 274:494-502.
- Swanson JA, Hoppe AD** (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 76:1093-1103.
- Swanson JA, Johnson MT, Beningo K, Post P, Mooseker M, Araki N** (1999) A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci* 112 (Pt 3):307-316.

T

- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T** (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
- Takaya A, Ohba Y, Kurokawa K, Matsuda M** (2004) RalA activation at nascent lamellipodia of epidermal growth factor-stimulated Cos7 cells and migrating Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 15:2549-2557.
- Tapper H** (1996) The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. *J Leukoc Biol* 59:613-622.
- Tapper H, Furuya W, Grinstein S** (2002) Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *J Immunol* 168:5287-5296.
- Tauber AI** (2003) Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:897-901.
- Tian X, Rusanescu G, Hou W, Schaffhausen B, Feig LA** (2002) PDK1 mediates growth factor-induced Ral-GEF activation by a kinase-independent mechanism. *Embo J* 21:1327-1338.
- Titus MA** (1999) A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr Biol* 9:1297-1303.
- Tjelle TE, Lovdal T, Berg T** (2000) Phagosome dynamics and function. *Bioessays* 22:255-263.
- Toda K, Nogami M, Murakami K, Kanaho Y, Nakayama K** (1999) Colocalization of phospholipase D1 and GTP-binding-defective mutant of ADP-ribosylation factor 6 to endosomes and lysosomes. *FEBS Lett* 442:221-225.
- Touret N, Paroutis P, Terebiznik M, Harrison RE, Trombetta S, Pypaert M, Chow A, Jiang A, Shaw J, Yip C, Moore HP, van der Wel N, Houben D, Peters PJ, de Chastellier C, Mellman I, Grinstein S** (2005) Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123:157-170.

Toyohara A, Inaba K (1989) Transport of phagosomes in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Sci* 94 (Pt 1):143-153.

U

Urano T, Emkey R, Feig LA (1996) Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *Embo J* 15:810-816.

V

van Dam EM, Robinson PJ (2006) Ral: Mediator of membrane trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1841-1847.

van Endert PM, Saveanu L, Hewitt EW, Lehner P (2002) Powering the peptide pump: TAP crosstalk with energetic nucleotides. *Trends Biochem Sci* 27:454-461.

van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ (2007) Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* 9:2095-2102.

Venable ME, Bielawska A, Obeid LM (1996) Ceramide inhibits phospholipase D in a cell-free system. *J Biol Chem* 271:24800-24805.

Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* 366:689-704.

Vieira OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A, Backer JM, Cantley LC, Grinstein S (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol* 155:19-25.

Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bader MF (2002) Regulated secretion in chromaffin cells: an essential role for ARF6-regulated phospholipase D in the late stages of exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 971:193-200.

Vitale N, Mawet J, Camonis J, Regazzi R, Bader MF, Chasserot-Golaz S (2005) The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J Biol Chem* 280:29921-29928.

Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader MF (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* 20:2424-2434.

von Delwig A, Ramachandra L, Harding CV, Robinson JH (2003) Localization of peptide/MHC class II complexes in macrophages following antigen processing of viable *Streptococcus pyogenes*. *Eur J Immunol* 33:2353-2360.

W

Wang KL, Khan MT, Roufogalis BD (1997) Identification and characterization of a calmodulin-binding domain in Ral-A, a Ras-related GTP-binding protein purified from human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 272:16002-16009.

Wang L, Li G, Sugita S (2004) RalA-exocyst interaction mediates GTP-dependent exocytosis. *J Biol Chem* 279:19875-19881.

Wang X, Wu YC, Fadok VA, Lee MC, Gengyo-Ando K, Cheng LC, Ledwich D, Hsu PK, Chen JY, Chou BK, Henson P, Mitani S, Xue D (2003) Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12. *Science* 302:1563-1566.

- Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S** (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* 1:136-143.
- Way G, O'Luanaigh N, Cockcroft S** (2000) Activation of exocytosis by cross-linking of the IgE receptor is dependent on ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D in RBL-2H3 mast cells: evidence that the mechanism of activation is via regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Biochem J* 346 Pt 1:63-70.
- White MA, Vale T, Camonis JH, Schaefer E, Wigler MH** (1996) A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *J Biol Chem* 271:16439-16442.
- Wiedemann A, Patel JC, Lim J, Tsun A, van Kooyk Y, Caron E** (2006) Two distinct cytoplasmic regions of the beta2 integrin chain regulate RhoA function during phagocytosis. *J Cell Biol* 172:1069-1079.
- Wood W, Jacinto A** (2007) *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:542-551.
- Wu S, Mehta SQ, Pichaud F, Bellen HJ, Quijcho FA** (2005) Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 12:879-885.

X

- Xie Z, Ho WT, Exton JH** (1998) Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity. *J Biol Chem* 273:34679-34682.
- Xu L, Frankel P, Jackson D, Rotunda T, Boshans RL, D'Souza-Schorey C, Foster DA** (2003) Elevated phospholipase D activity in H-Ras- but not K-Ras-transformed cells by the synergistic action of RalA and ARF6. *Mol Cell Biol* 23:645-654.

Y

- Yan M, Collins RF, Grinstein S, Trimble WS** (2005) Coronin-1 Function Is Required for Phagosome Formation. *Mol Biol Cell*:E04-11-0989.
- Yang C, Mora S, Ryder JW, Coker KJ, Hansen P, Allen LA, Pessin JE** (2001) VAMP3 null mice display normal constitutive, insulin- and exercise-regulated vesicle trafficking. *Mol Cell Biol* 21:1573-1580.
- Yeung T, Ozdamar B, Paroutis P, Grinstein S** (2006) Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 18:429-437.
- Yoshizaki H, Aoki K, Nakamura T, Matsuda M** (2006) Regulation of RalA GTPase by phosphatidylinositol 3-kinase as visualized by FRET probes. *Biochem Soc Trans* 34:851-854.

Z

- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeberle AM, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader MF, Vitale N** (2007) Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem* 282:21746-21757.
- Zhang F, Southwick FS, Purich DL** (2002) Actin-based phagosome motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 53:81-88.

BIBLIOGRAPHIE

- Zhang X, Bi E, Novick P, Du L, Kozminski KG, Lipschutz JH, Guo W** (2001) Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol Chem* 276:46745-46750.
- Zhang XM, Ellis S, Sriratana A, Mitchell CA, Rowe T** (2004) Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J Biol Chem* 279:43027-43034.
- Zhou Z, Hartwig E, Horvitz HR** (2001) CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104:43-56.