

# Thèse de Doctorat de l'Université Paris Descartes

**Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité**

Spécialité

**Biologie Cellulaire**

Présentée par :

**Florence Marie-Anaïs**

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris Descartes

# **Mécanismes de formation et de fermeture des phagosomes dans les macrophages**

Thèse dirigée par le **Dr. Florence Niedergang**

*Présentée et soutenue publiquement le 27 septembre 2016*

Devant un jury composé de :

Dr Florence Niedergang

Directeur de thèse

Dr Christophe Le Clainche

Rapporteur

Dr Christophe Lamaze

Rapporteur

Dr Nathalie Sauvonnet

Examineur

Pr Thierry Soldati

Examineur

Dr Emma Colucci-Guyon

Examineur

**Résumé :**

La phagocytose est un mécanisme cellulaire essentiel de l'organisme. Elle joue un rôle à la fois dans le maintien de l'homéostasie tissulaire mais également dans le système immunitaire. Ce processus, réalisé par des cellules phagocytaires, telles que les cellules dendritiques, les polymorphonucléaires neutrophiles ou les macrophages, permet l'ingestion et l'élimination quotidienne de particules de grandes tailles ( $>0,5 \mu\text{m}$ ): bactéries, champignons ou débris cellulaires. Il est induit par de nombreux récepteurs phagocytaires tels que les récepteurs aux fragments cristallisables des immunoglobulines (FcR) et les récepteurs au complément (CR3). Ceux-ci induisent des cascades de signalisation différentes mais aboutissant, toutes deux, à un remodelage du cytosquelette d'actine et de la membrane plasmique. Il y a alors formation d'une coupe phagocytaire entourant et enfermant la particule à internaliser dans un compartiment clos appelé phagosome. Alors que de nombreuses études ont permis de disséquer l'organisation des coupes phagocytaires induites par les FcR, le mécanisme de fermeture des phagosomes n'était pas élucidé. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des phagosomes suite à l'engagement des CR3 sont moins bien décrits.

Au cours de ce travail, nous avons analysé le rôle de la dynamine 2, une GTPase impliquée dans les mécanismes de fission des vésicules d'endocytose, au cours de la formation et de la fermeture des phagosomes. Nous avons utilisé un système expérimental original utilisant la microscopie à ondes évanescentes pour montrer, que la dynamine 2 est recrutée avec l'actine dans les coupes phagocytaires en formation et qu'elle s'accumule au site de fermeture des phagosomes dans des macrophages vivants. L'inhibition de son activité GTPase induit une inhibition de l'efficacité de phagocytose et un défaut de la dynamique de l'actine lors de l'extension des coupes phagocytaires. De façon surprenante, la dépolymérisation de l'actine conduit à un défaut de recrutement de la dynamine 2 au site de la phagocytose mettant en évidence une régulation croisée entre la dynamine 2 et l'actine. Enfin cette étude a montré que la dynamine 2 joue un rôle critique dans la scission du phagosome.

Dans un second temps, nous avons initié l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité du récepteur au complément CR3. L'activation de ce récepteur phagocytaire, qui fait partie de la famille des intégrines, requiert un ancrage à l'actine nécessaire à la signalisation vers la polymérisation d'actine et à la formation des coupes phagocytaires.

L'ensemble de ces résultats contribue à une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires fins impliqués dans la phagocytose.

**Mots clés :** actine, dynamine, phagocytose, pseudopodes, fermeture des phagosomes, macrophages

**Title : Mechanisms of formation and closure of phagosomes in macrophages**

**Abstract :**

Phagocytosis is an important cellular mechanism. It plays a role in both the maintenance of tissue homeostasis and in the immune system. This process, performed by phagocytic cells, including dendritic cells, polymorphonuclear neutrophils or macrophages, enables daily ingestion and elimination of large particles (> 0.5 microns) e.g. bacteria, fungi or cellular debris. It is induced by many phagocytic receptors such as the receptors for crystallizable fragments of immunoglobulins (FcR) and complement receptor (CR3). These receptors induce different signaling cascades but ultimately lead to a remodelling of the actin cytoskeleton and the plasma membrane. Next there is the formation of a phagocytic cup which surrounds and encloses the ingested particle in a closed compartment called the phagosome. While many studies have dissected the phagocytic cup organization induced by the FcR, the mechanism of phagosome closure was not understood. Furthermore, the molecular mechanisms involved in phagosome formation following CR3 engagement are less well described.

In this work, we analyzed the role of dynamin 2, a GTPase involved in fission mechanisms of endocytosis vesicles, and in the formation and closure of phagosomes. We used an original experimental system using the total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) to show that dynamin 2 is recruited with actin during phagocytic cup formation and accumulates at the site of phagosome closure in living macrophages. The inhibition of its GTPase activity induced an inhibition of phagocytosis and a defect in actin dynamics during pseudopod extension. Surprisingly, the depolymerization of actin lead to a defective recruitment of dynamin 2 at the phagocytic site showing there is a cross-regulation between dynamin 2 and actin. Finally, this study showed that dynamin 2 plays a critical role in the scission of the phagosome.

Secondly, we initiated the study of the mechanisms involved in regulating the activity of the complement receptor CR3. Enabling this phagocytic receptor, part of the integrin family, requires anchoring actin which is necessary for signaling to the actin polymerization and the formation of phagocytic cups.

All these results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms involved in phagocytosis purposes

**Keywords :** actin, dynamin, phagocytosis, pseudopods, phagosomes closure, macrophage

## Sommaire

<b>Table des illustrations.....</b>	<b>3</b>
<b>Préambule .....</b>	<b>9</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>11</b>
<b>Chapitre 1 : la phagocytose .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Adhésion : les récepteurs phagocytaires, structure, fonction et expression .....</b>	<b>13</b>
a. Récepteurs aux corps apoptotiques .....	13
b. Les récepteurs aux opsonines.....	15
i. Les récepteurs Fc (FcR) .....	15
ii. Les récepteurs aux compléments.....	17
c. Les récepteurs des motifs moléculaires associés aux pathogènes : « Pattern Recognition Receptors » (PRR) .....	18
i. Les récepteurs de lectines de type C : exemple dectine-1 .....	18
ii. Les récepteurs « Scavengers » : exemple des SR-A .....	19
<b>2. Signalisation en aval des récepteurs aux opsonines : FcRs et CR3 .....</b>	<b>20</b>
a. Récepteurs Fc $\gamma$ et signalisation .....	20
i. Phosphorylation des récepteurs .....	20
ii. Les phosphoinositides .....	23
iii. Les Rho GTPases .....	26
b. Récepteurs au complément et signalisation.....	29
i. Pré-activation des intégrines CR3 : signal « inside out ».....	29
ii. Activation des récepteurs au CR3 : le signal « outside-in » .....	36
<b>3. Remodelage du cytosquelette d'actine au cours de la formation des phagosomes.....</b>	<b>38</b>
a. Facteurs contrôlant la dynamique de l'actine suite à l'activation des récepteurs Fc $\gamma$ Rs.....	41
i. Polymérisation d'actine dans les pseudopodes.....	41
ii. Désassemblage de l'actine-F à la base de la coupe phagocytaire.....	44
b. Facteurs contrôlant la polymérisation de l'actine suite à l'activation des récepteurs CR3.....	47
<b>4. Remodelage membranaire au cours de la formation des phagosomes.....</b>	<b>49</b>
a. Origine des membranes exocytées .....	50
b. Régulateurs du trafic vésiculaire au cours de l'exocytose focalisée. ....	53
<b>5. Contractilité et fermeture des phagosomes.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Maturation des phagosomes .....</b>	<b>58</b>
a. Le phagosome précoce .....	59
b. Le phagosome tardif .....	60
c. Le phagolysosome .....	61
d. Activation des macrophages et présentation antigénique.....	62
<b>7. Phagocytose Fc<math>\gamma</math>R et CR3: deux types de phagocytose différentes mais interdépendantes.....</b>	<b>63</b>
a. Différences de morphologies des coupes phagocytaires .....	63
b. Coopération entre les récepteurs Fc $\gamma$ R et les intégrines.....	65
<b>Chapitre 2 : La dynamine .....</b>	<b>68</b>
<b>1. Vue d'ensemble des protéines de la superfamille des dynamines .....</b>	<b>68</b>
<b>2. Découverte de la dynamine .....</b>	<b>70</b>
<b>3. Organisation structurale de la dynamine.....</b>	<b>72</b>
a. Le domaine tige (« stalk/middle »).....	72

b. Les domaines GTPase et GED .....	73
c. Le domaine « pleckstrin homology ».....	74
d. Le domaine riche en proline (PRD) .....	74
4. La dynamine et ses fonctions cellulaires .....	75
a. Rôle de la dynamine dans l'endocytose .....	75
i. Initiation de l'endocytose dépendante de la clathrine .....	75
ii. Le recrutement de la dynamine au site de l'endocytose clathrine dépendante .....	77
iii. Recrutement de la dynamine dans l'endocytose indépendante de la clathrine.....	81
iv. La dynamine et le mécanisme de fission.....	83
b. Rôle de la dynamine dans la régulation du cytosquelette.....	85
i. Dynamine et Actine.....	86
ii. Dynamine et Microtubules.....	89
c. Dynamine et phagocytose.....	90
5. <b>Quelques inhibiteurs de la dynamine.</b> .....	93
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>96</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>98</b>
<b>1ère partie : Rôle de la dynamine-2 au cours de la formation et fermeture des phagosomes dans les macrophages.</b> .....	<b>98</b>
1. <b>Hypothèses de travail.</b> .....	98
2. <b>Systèmes expérimentaux.</b> .....	99
a. Phagocytose frustrée .....	100
b. Phagocytose 3D.....	101
3. <b>Matériels et Méthodes</b> .....	105
4. <b>Résumé des principaux résultats</b> .....	108
a. La dynamine-2 est recrutée à la coupe phagocytaire durant l'extension et la fermeture des pseudopodes.....	108
b. La dynamine-2 ne colocalise pas avec la clathrine durant la formation et fermeture des phagosomes.....	109
c. L'inhibition de l'activité GTPase de la dynamine-2 induit un défaut de phagocytose et de polymérisation d'actine.....	109
d. L'inhibition en temps réel de l'activité GTPase de la dynamine-2 bloque l'extension et la fermeture des coupes phagocytaires.....	110
e. La dynamine-2 et l'actine-F interagissent durant la formation des phagosomes.....	111
f. L'inhibition en temps réel de la polymérisation d'actine empêche le recrutement et l'activité de la dynamine-2.....	111
g. Conclusion .....	112
5. <b>Article publié</b> .....	113
<b>2ème partie : Mécanismes moléculaires en aval du CR3.</b> .....	<b>128</b>
1. <b>Introduction</b> .....	128
2. <b>Matériels et méthodes</b> .....	129
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>133</b>
1. <b>La régulation croisée entre la dynamine-2 et l'actine-F au cours de la formation et de la fermeture des phagosomes</b> .....	133
2. <b>Les mécanismes moléculaires en aval du CR3.</b> .....	139
3. <b>Conclusion générale</b> .....	145
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>147</b>
<b>ANNEXE 1 .....</b>	<b>170</b>
<b>ANNEXE 2 .....</b>	<b>184</b>

## Table des illustrations

Figure 1 : Elie Metchnikoff et ses observations.....	10
Figure 2 : La phagocytose.....	12
Tableau 1 : Récepteurs phagocytaires humains et leurs ligands.....	14
Figure 3 : Représentation des récepteurs Fcγ chez l’homme et la souris.....	16
Figure 4 : Activation des tyrosines kinase en aval des FcγRs.....	23
Figure 5 : Changements de la composition en phosphoinositides de la membrane au site de formation du phagosome.....	25
Figure 6 : Le cycle des Rho GTPases.....	27
Figure 7 : Schéma simplifié d’activation des RhoGTPases et kinases des phosphoinositides en aval des FcγRs.....	28
Figure 8 : Structure de la taline.....	31
Figure 9: Structure de la filamine A.....	33
Figure 10 : Modèle du signal « inside-out ».....	35
Figure 11: Activation des Rho-GTPases en aval du CR3.....	38
Figure 12 : Vue d’ensemble des protéines de liaison à l’actine.....	40
Figure 13 : Voie de signalisation aboutissant au remodelage du cytosquelette d’actine en aval du FcγR.....	42
Figure 14: La disparition de PI(4,5)P2 de la base des coupes phagocytaires conduit à la dépolymérisation de l’actine-F.....	46
Figure 15 : Voie de signalisation aboutissant au remodelage du cytosquelette d’actine en aval du CR3.....	47
Figure 16 : Modèle d’action de CLIP170 et mDia1 à l’extrémité barbée des filaments d’actine en polymérisation.....	49
Figure 17 : Mécanisme de fusion des SNAREs et leur localisation subcellulaire.....	51
Figure 18 : Représentation des domaines des myosines impliquées au cours de la phagocytose.....	56
Figure 19 : Myosines et Actine-F au cours de la formation et fermeture des coupes phagocytaires.....	58
Figure 20 : La maturation des phagosomes.....	59
Figure 21 : Différences morphologiques des coupes phagocytaires induites par les FcγR et CR3.....	64
Figure 22 : Signalisation conduisant à la polymérisation d’actine en aval des récepteurs Fc et CR3 au cours de la phagocytose.....	65

Figure 23 : Coopération des voies de signalisation FcR et CR3.....	67
Tableau 2 : Liste des fonctions et localisations principales des dynamines classiques et apparentées.....	70
Figure 24 : Photos de microscopie électronique de vésicules d'endocytose en formation décorées de dynamine. ....	71
Figure 25 : Structure de la dynamine et fonction des différents domaines. ....	73
Figure 26 : Photos de microscopie électronique de la clathrine. ....	76
Figure 27 : Deux modèles d'initiation de l'endocytose. ....	77
Figure 28 : Les protéines à domaines SH3, partenaires de la dynamine au cours de l'endocytose. ....	78
Figure 29 : Les étapes du recrutement de la dynamine au cours de l'endocytose clathrine dépendante. ....	80
Figure 30 : Modèle d'endocytose du récepteur de l'IL-2.....	83
Figure 31 : Modèle du mécanisme de fission des membranes par la dynamine.....	85
Figure 32 : Influences de la dynamine sur le cytosquelette d'actine. ....	86
Figure 33 : Le mutant dominant négatif DynK44A inhibe l'extension des pseudopodes.....	91
Tableau 3 : Quelques inhibiteurs et mutants de la dynamine et leurs caractéristiques .....	94
Figure 34 : Schéma représentatif des activités potentielles de la dynamine 2 au cours de la formation et fermeture des phagosomes. ....	99
Figure 35: Organisation spatio-temporelle de l'actine-F et de VAMP3 au cours de la phagocytose frustrée.....	101
Figure 36: Représentation schématique de la phagocytose 3D analysé par TIRFM.....	102
Figure 37: L'actine-F s'accumule en un point sur le site de fermeture du phagosome.....	103
Figure 38: Détermination de l'angle TIRF sur Image J. ....	104
Figure 39 : Modèle d'organisation de la dynamine-2 et de l'actine durant la formation du phagosome.....	113

## Abréviations

### A

<b>ABD</b>	Actin binding domain
<b>Abp1</b>	Actin binding protein 1
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>Actine-F</b>	Actine Filamenteuse
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AP-1</b>	Adaptor-related protein complex 1
<b>Arf6</b>	ADP ribosylation factor 6
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>Arp</b>	Actin related protein
<b>ARPC</b>	Actin related complex
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate

### B

<b>BAI1</b>	Brain-specific angiogenesis inhibitor I
<b>BAR</b>	Bin/Amphiphysin/Rvs
<b>Bcl10</b>	B-cell lymphoma/leukemia 10
<b>BSE</b>	Bundle signalling element

### C

<b>C-ter</b>	Carboxy-terminale
<b>C3bi</b>	C3b inactivé
<b>CARD</b>	Caspase recruitment domain
<b>CCP</b>	Clathrin coated pit
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>Cdc42</b>	Cell division control protein 42 homolog
<b>CH</b>	Calponine homology
<b>CHO</b>	Chinese hamster ovary cell
<b>CLIP-170</b>	Cytoplasmic linker 170
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CR</b>	Récepteur au complément
<b>CTLD</b>	C-type lectin like domain

### D

<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DOCK180</b>	Dedicator of cytokinesis 180
<b>DPL</b>	Dynamamin like protein
<b>Dyn</b>	Dynamine

### E

<b>EB</b>	End binding
<b>EEA1</b>	Early endosome antigen 1
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EHD</b>	C-terminal Eps15 homology domain
<b>Epac</b>	Exchange protein directly activated by cAMP
<b>EPI</b>	Epifluorescence

<b>F</b>	
<b>Fc</b>	Fragment cristallisable
<b>FcR</b>	Récepteur au fragment Fc
<b>FERM</b>	4.1 protein, ezrin, moesin
<b>FH</b>	Formin homology
<b>FLN</b>	Filamine
<b>FRET</b>	Fluorescence resonance energy transfer
<b>G</b>	
<b>GAP</b>	GTPase activating protein
<b>GBP</b>	Guanylate-binding protein
<b>GDI</b>	Guanosine nucleotide dissociation inhibitor
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GED</b>	GTPase-enhancing domain
<b>GEF</b>	Guanine nucleotide exchange factor
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GMP</b>	Guanosine monophosphate
<b>GPCR</b>	G protein-coupled receptor
<b>GPI</b>	glycosylphosphatidylinositol
<b>GST</b>	Glutathione Sulfotransferase
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>H</b>	
<b>Hck</b>	Hematopoietic cell kinase
<b>HS-1</b>	Hematopoietic lineage cell-specific protein 1
<b>I</b>	
<b>IBS</b>	Integrin binding site
<b>IgG</b>	Immunoglobuline
<b>iNOS</b>	Inductible nitric oxide synthase
<b>INPP5B</b>	Inositol polyphosphate-5-phosphatase B
<b>IP3</b>	Inositol (1,4,5) triphosphate
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>ITIM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
<b>L</b>	
<b>LAMP</b>	Lysosomal- associated membrane protein
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>M</b>	
<b>M-CSF</b>	Macrophage colony-stimulating factor
<b>Mac-1</b>	Macrophage-1 antigen
<b>MARCO</b>	Macrophage receptor with collagenous structure
<b>mDia1</b>	mouse Diaphanous-related formin-1
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MGF-E8</b>	Milk fat globule-EGF factor 8 protein
<b>Mig</b>	Migifiline
<b>MLC</b>	Myosin Light Chain
<b>Mon1</b>	Monensin sensitivity 1
<b>N</b>	

<b>N-ter</b>	Amino-terminale
<b>N-WASP</b>	Neuronal-Wiskott-Aldrich syndrome protein
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>Nef</b>	Negative factor
<b>NF-kB</b>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NO</b>	Oxide nitrique
<b>NOX2</b>	NADPH oxydase 2
<b>NPF</b>	Nucleation promoting factor
<b>O</b>	
<b>OCRL</b>	Oculocerebrorenal syndrome of Lowe
<b>OPA1</b>	Optic atrophy 1
<b>P</b>	
<b>PAF</b>	Platelet Activating Factor
<b>PAMP</b>	Pathogen Associated Molecular Patterns
<b>PH</b>	Pleckstrin Homology
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl 3-kinase
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
<b>PRD</b>	Prolin rich domain
<b>PRR</b>	Pattern-recognition receptors
<b>PS</b>	Phosphatidylsérine
<b>Q</b>	
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
<b>R</b>	
<b>Rac</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
<b>RE</b>	Reticulum endoplasmique
<b>RGS14</b>	Regulator of G-protein signalling-14
<b>Rho</b>	Ras homolog gene family member
<b>RIAM</b>	Rap1-GTP-interacting adaptor molecule
<b>ROCK</b>	Rho-kinase
<b>ROS</b>	Reactive oxygene species
<b>S</b>	
<b>SCAR</b>	Suppressor of cAMP activator
<b>SH</b>	Src homology
<b>SI</b>	Système Immunitaire
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>SNAP</b>	Synaptosomal associated protein
<b>SNARE</b>	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein receptor
<b>SR</b>	Scavenger receptor
<b>Src</b>	Sarcoma
<b>STX</b>	Syntaxine
<b>Syk</b>	Spleen tyrosine kinase
<b>T</b>	
<b>t-SNARE</b>	Target SNARE

<b>TCR</b>	T-cell antigen receptor
<b>TGN</b>	Trans-Golgi
<b>TIM</b>	T cell immunoglobulin mucin
<b>TLRs</b>	Toll-like receptors
<b>TMD</b>	Transmembrane domain
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor-alpha
<b>V</b>	
<b>v-ATPase</b>	Vacuolar-type H <sup>+</sup> ATPase
<b>v-SNARE</b>	Vesicle-SNARE
<b>VAMP</b>	Vesicle associated membrane proteins
<b>VASP</b>	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
<b>VIH-1</b>	Virus de l'immunodéficience acquise de type I
<b>Vpr</b>	Viral protein R
<b>W</b>	
<b>WASP</b>	Wiskott-Aldrich syndrome protein
<b>WAVE</b>	WASP-family verprolin-homologous protein

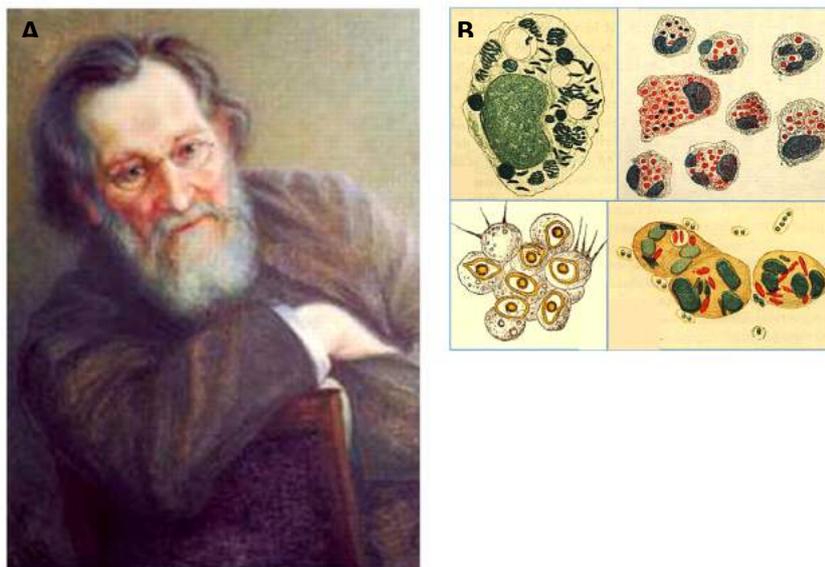
## Préambule

---

Le corps humain est un ensemble complexe composé de milliards de cellules et de bactéries qui assurent, ensemble, des fonctions essentielles à son activité. Quotidiennement il est exposé à des dangers incluant des virus, des bactéries, des champignons, des parasites ou encore des molécules étrangères, qui menacent son équilibre. Il possède un moyen de défense appelé : système immunitaire (SI). Le système immunitaire inné chargé de répondre immédiatement face à un agent infectieux repose en partie sur des leucocytes notamment les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les cellules dendritiques et les monocytes. Ces derniers circulant dans le sang peuvent migrer dans les tissus et se différencier en macrophages.

La découverte de ces acteurs cellulaires, entre la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle et le XX<sup>ème</sup> siècle, coïncide avec la naissance du concept de l'immunité. Une controverse animait alors la communauté scientifique. D'un côté les « cellularistes » supportant le rôle des cellules dans le système de défense de l'organisme, et de l'autre les « humoralistes » supportant davantage le rôle de molécules sécrétées dans ce processus. Un célèbre zoologiste et bactériologiste russe Elie Metchnikoff, a démontré le rôle important des leucocytes face à des corps étrangers via un mécanisme d'internalisation et de dégradation de particules appelé phagocytose. Il ne fut pas le premier à observer la présence de particules étrangères au sein des leucocytes. En effet cette première observation fut en 1847 par von Koelliker dans des cellules spléniques. Par la suite de nombreux scientifiques ont pu observer la présence de bactéries ou d'érythrocytes dans les leucocytes mais n'associaient pas ce phénomène à un mécanisme de défense (Chernyak and Tauber 1988, Turk 1991). Elie Metchnikoff fut donc le premier à détailler, par une approche scientifique rigoureuse, l'importance de la phagocytose dans l'élimination des infections fongiques (démontré en 1883 dans un crustacé « *Daphnia magna* » infecté par « *Monospora bicuspidata* ») et bactérienne (démontré la même année avec un lapin vacciné contre l'anthrax présentant des cellules phagocytant activement). Il décrira deux types cellulaires capables de phagocyter : les microphages, actuellement appelés neutrophiles polymorphonucléaires, et

les macrophages mononucléaires. Il proposera qu'au delà d'être des cellules participant au développement et à l'homéostasie tissulaire (élimination de débris cellulaires), les macrophages sont des effecteurs de l'immunité innée et de l'inflammation. Il fut récompensé en 1908 par un prix Nobel commun avec Paul Ehrlich qui a développé une théorie de la réponse immunitaire basée sur l'interaction entre les antigènes et les anticorps. Paul Ehrlich était un fervent défenseur des « humoralistes ». Elie Metchnikoff et Paul Ehrlich ont donc démontré que l'organisme possède deux systèmes pour combattre les agents infectieux. L'année 2016, marque le centenaire de la mort de ce grand penseur et expérimentateur qu'était Elie Metchnikoff. Les décennies suivantes, d'importantes avancées ont été faites dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la phagocytose. Des mécanismes qui seront au cœur de mon manuscrit.



**Figure 1 : Elie Metchnikoff et ses observations.** (A) Portrait d'Elie Metchnikoff réalisé par son épouse Olga. (B) Schémas réalisés par E.Metchnikoff de ses observations de phagocytose dans les leucocytes de divers organismes (cobaye, vers blancs) (Metchnikoff 1901, Cavaillon 2011)

## Introduction

---

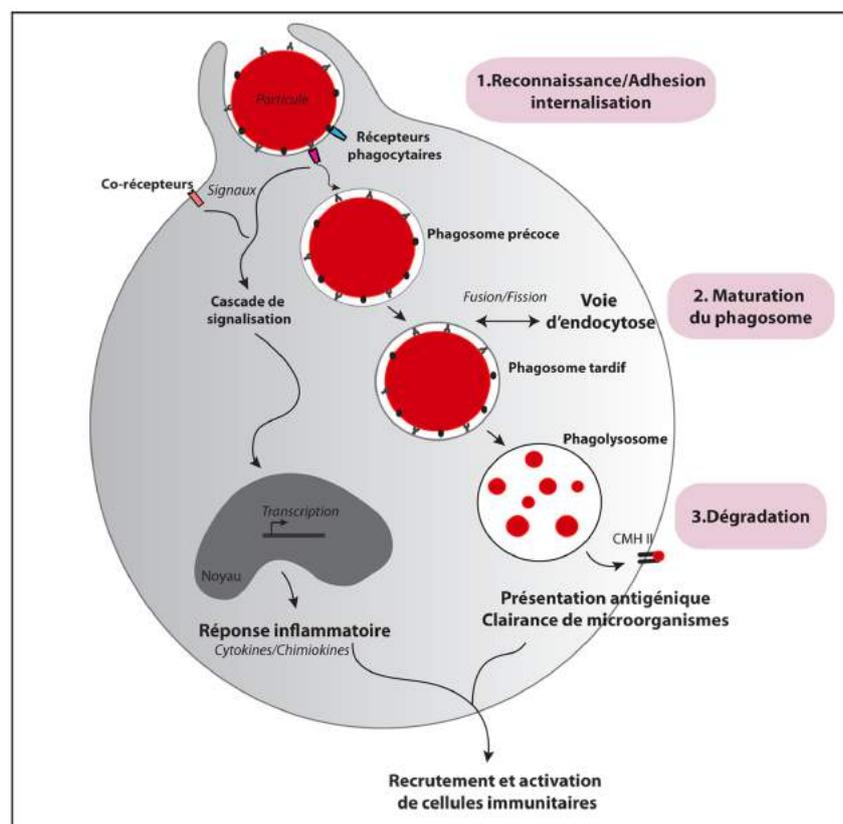
### Chapitre 1 : la phagocytose

La phagocytose est un mécanisme cellulaire d'internalisation et de dégradation de larges particules ( $>0.5 \mu\text{m}$ ) au sein d'une vacuole appelée phagosome. Ce processus, apparu très tôt au cours de l'évolution, joue un rôle essentiel au sein des organismes unicellulaires et pluricellulaires eucaryotes. En effet chez les amibes tels que *Dyctiostelium discoideum* la phagocytose sert à la nutrition (Ryter and Hellio 1980). En revanche chez les eucaryotes métazoaires, la phagocytose est un mécanisme crucial, à la fois dans la réponse immunitaire et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Cette fonction est assurée par des cellules appelées phagocytes professionnels notamment les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles. Ces cellules sont spécialisées dans l'élimination de microbes tels que bactéries, champignons et parasites. Les phagocytes professionnels et les phagocytes dits non professionnels tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales ont aussi pour cible les corps apoptotiques.

La présence d'un microorganisme pathogène dans les tissus va induire la libération de signaux chimio-attractants qui vont attirer les phagocytes sur le site de l'infection. Le pathogène est alors reconnu (via ses molécules de surfaces) par de nombreux récepteurs spécifiques présents à la membrane plasmique des cellules phagocytaires. Cette reconnaissance est transduite en cascades de signalisation et d'activation qui aboutissent à un remodelage du cytosquelette, du trafic intracellulaire et de la membrane plasmique. Il y a alors formation d'extensions membranaires appelées pseudopodes qui entourent et enferment la particule à internaliser dans un compartiment nommé phagosome. Ce compartiment mature grâce à des événements de fusion et fission avec la voie d'endocytose qui lui permettent d'acquérir les éléments nécessaires à la dégradation de la particule (acidification, hydrolases, protéases, espèces réactives oxygénées (ROS)). Les peptides issus de la dégradation peuvent être préservés et chargés sur le complexe majeur

d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) afin d'activer les lymphocytes T, acteurs de l'immunité adaptative permettant une réponse spécifique (Savina and Amigorena 2007, Mantegazza, Magalhaes et al. 2013). Parallèlement à la présentation antigénique, l'activation des macrophages s'accompagne de la production de cytokines, de chimiokines, et de défensines qui participent à la réponse immunitaire inflammatoire (Figure 2).

Ce premier chapitre se focalise sur le processus de phagocytose dans les phagocytes professionnels. Il décrira les mécanismes et acteurs moléculaires mis en place de l'adhésion à la dégradation des particules internalisées, sans toutefois détailler la maturation des phagosomes et l'activation des cellules.



**Figure 2 : La phagocytose.** Ce processus se définit par trois grandes étapes : 1-La reconnaissance par des récepteurs phagocytaires et l'internalisation de la particule dans un phagosome; 2- La maturation du phagosome le long de la voie d'endocytose ; 3-La dégradation de la particule et la présentation antigénique via le CMH II. L'activation des récepteurs phagocytaires et des co-récepteurs conduit, en parallèle, à l'activation des cellules phagocytaires qui produisent des cytokines et chimiokines à l'origine de la réponse inflammatoire.

## **1. Adhésion : les récepteurs phagocytaires, structure, fonction et expression**

Du fait de la grande variété et nature des particules prises en charge lors de la phagocytose, les cellules phagocytaires présentent à leur surface une batterie de récepteurs membranaires, ayant des sélectivités distinctes et qui collaborent ensemble à la détection et l'ingestion de particules. Il est important de noter que tous les récepteurs engagés durant la phagocytose ne sont pas des récepteurs phagocytaires. En effet un récepteur phagocytaire est défini par sa capacité à déclencher l'ingestion d'une particule lors de son expression ectopique dans des cellules non-phagocytaires (Underhill and Ozinsky 2002, Flannagan, Jaumouillé et al. 2012, Freeman and Grinstein 2014). Ils induisent donc directement la phagocytose. En revanche, des récepteurs annexes, tels que la famille des récepteurs « Toll-like » (TLRs), qui sont de véritables senseurs de l'infection microbienne, modulent l'efficacité de phagocytose, le devenir des particules internalisées et la réponse inflammatoire (Beutler 2004, Blander 2007). Les particules reconnues par l'ensemble de ces récepteurs présentent un large éventail de motifs moléculaires à leur surface et peuvent être recouvertes par des molécules du sérum appelées opsonines.

Parmi les récepteurs phagocytaires répertoriés se distinguent diverses catégories (Tableau 1). D'une part, les récepteurs aux corps étrangers tels que les récepteurs aux opsonines et les récepteurs aux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRRs) ; d'autre part, les récepteurs aux corps apoptotiques.

### **a. Récepteurs aux corps apoptotiques**

Quotidiennement, l'organisme élimine près de 10 milliards de cellules qui sont détruites par apoptose. Le marqueur le plus caractéristique de ces cellules est la phosphatidylsérine (PS). Dans des cellules saines ce lipide est restreint au feuillet interne de la membrane plasmique. Cependant lors de l'apoptose, il se voit exposé sur le feuillet externe. Ainsi il peut être reconnu par de nombreux récepteurs phagocytaires de différentes familles notamment les récepteurs TIM (« T cell immunoglobulin mucin »), les récepteurs BAI-1 (« Brain-specific angiogenesis inhibitor I ») et le récepteur stabiline 2 (Kobayashi,

Karisola et al. 2007, Park, Tosello-Tramont et al. 2007, Park, Jung et al. 2008). En plus de la reconnaissance directe de la PS, des récepteurs phagocytaires ou co-récepteurs reconnaissent de nombreuses molécules ayant une affinité pour la PS. Parmi elles, la lactadherine (MGF-E8), produite par les macrophages, est reconnue par l'intégrine  $\alpha_5\beta_3$ . De même, les dérivés de la PS peuvent être également reconnus par les récepteurs CD36 et CD68 capables de lier les lipides oxydés.

Récepteurs	Ligands	Références
<b>Récepteurs Fc</b>		
FcγRI (CD64)	IgG	(Anderson, Shen et al. 1990, Bruhns, Iannascoli et al. 2009)
FcγRIIa (CD32a)		
FcγRIIc (CD32c)		
FcγRIIa1 (CD16a)		
FcαRI (CD89)	IgA	(van Spriël, van den Herik-Oudijk et al. 1999)
FcεRI	IgE	(Daeron, Malbec et al. 1994)
<b>Récepteurs au complément</b>		
CR1 (CD35)	C1q, C4b, C3b, mannan-binding lectin	(Ghiran, Barbashov et al. 2000)
CR3 ( $\alpha M\beta 2$ , CD11b/CD18, Mac1)	C3bi, fibronectine, collagènes	(Yakubenko, Lishko et al. 2002)
CR4 ( $\alpha X\beta 2$ )	C3bi, fibronectine	
<b>PRRs</b>		
Dectine-1 (CLEC7A)	$\beta 1,3$ glucane	(Herre, Marshall et al. 2004)
SR-A (CD204)	Lipopolysaccharide, acide lipoteichoïque	(Peiser, Gough et al. 2000)
<b>Récepteurs des corps apoptotiques</b>		
TIM-1	Phosphatidylserine	(Kobayashi, Karisola et al. 2007)
TIM-4		
BAI1		(Park, Tosello-Tramont et al. 2007)
Stabiline-2		
CD36		Lipides oxydés

**Tableau 1 : Récepteurs phagocytaires humains et leurs ligands.** Adapté de (Freeman and Grinstein 2014)

## b. Les récepteurs aux opsonines

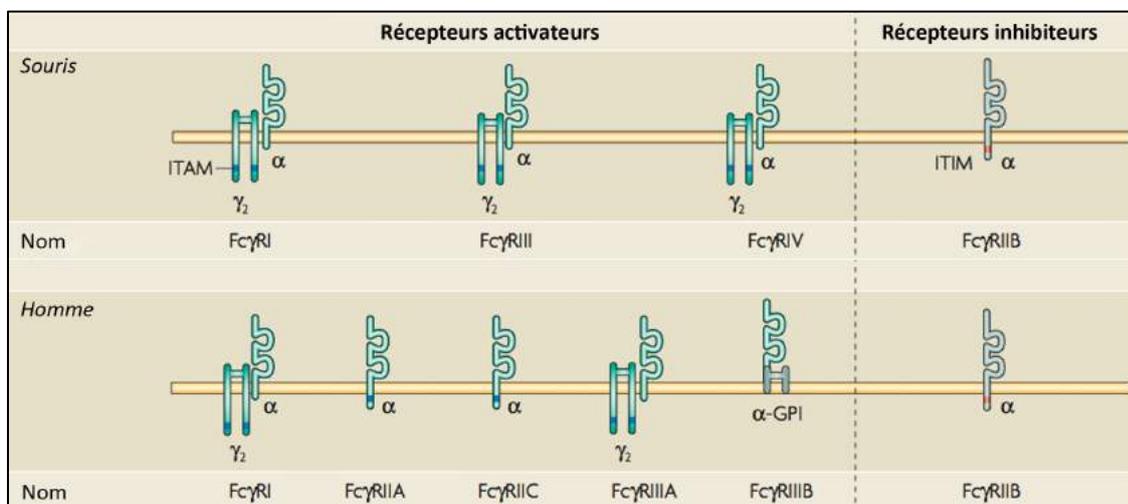
Une fois dans l'organisme, les corps étrangers sont reconnus et couverts par diverses molécules solubles nommées opsonines qui circulent dans le sang et les fluides interstitiels. Parmi elles se distinguent les immunoglobulines qui sont aptes à fixer spécifiquement des antigènes étrangers et les composés de la cascade du complément qui se déposent à la surface des particules étrangères. Ce phénomène de recouvrement appelé opsonisation va favoriser la reconnaissance, simultanée, de la particule par des récepteurs phagocytaires différents et générer une réponse probablement synergique. Cependant les propriétés et les voies de signalisations associées à ces récepteurs ont pu être étudiées séparément grâce à des modèles expérimentaux empêchant ou limitant l'implication d'autres récepteurs.

### i. Les récepteurs Fc (FcR)

La famille des récepteurs au fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines (Ig) appartient à la superfamille des immunoglobulines. Elle se subdivise en plusieurs classes selon le type d'Ig avec lesquelles les récepteurs interagissent. Les récepteurs Fc $\gamma$ R lient les immunoglobulines de types G (IgG) tandis que les récepteurs Fc $\alpha$  et Fc $\epsilon$  lient les IgA et IgE respectivement. Il existe 6 récepteurs Fc $\gamma$  chez l'homme (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIIA, et Fc $\gamma$ RIIIB) qui présentent des affinités différentes pour les IgG. Les classes de récepteurs phagocytaires sont présentées dans le tableau 1. Les récepteurs Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32), Fc $\gamma$ RIIC (CD32c), et Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a) sont dits activateurs. Ils possèdent un domaine intracellulaire « Immunoreceptor tyrosine-based activation motif » (ITAM) sur la sous-unité  $\gamma$  homodimérique commune aux Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIIA ou sur l'unique chaîne  $\alpha$ , liant le ligand, commune à tous les récepteurs activateurs. Fc $\gamma$ RIIB est l'unique récepteur inhibiteur qui possède un domaine intracellulaire « Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif » (ITIM). Enfin le récepteur Fc $\gamma$ RIIIB ancré dans le feuillet externe de la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) ne contient pas de motifs de signalisation (Nimmerjahn and Ravetch 2008).

Les monocytes, macrophages et neutrophiles humains expriment les récepteurs phagocytaires Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA et Fc $\gamma$ RIIIA. En revanche dans les cellules phagocytaires murines,

le récepteur Fc $\gamma$ RIIA n'est pas exprimé. L'utilisation de modèles murins dépourvus des gènes codants pour les Fc $\gamma$ Rs a pu mettre en évidence leur rôle crucial dans la réponse inflammatoire et la clairance microbienne. Notamment une étude indique que la délétion du gène codant pour Fc $\gamma$ RI chez la souris induit une inhibition de la phagocytose des complexes immuns formés par les IgG2A. Elle entraîne également un défaut de la présentation de l'antigène par le CMH-I conduisant à une diminution de la réponse inflammatoire (Ioan-Facsinay, de Kimpe et al. 2002, Bruhns and Jonsson 2015).



**Figure 3 : Représentation des récepteurs Fc $\gamma$  chez l'homme et la souris.** Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, à l'exception du récepteur FcRIIIB de l'homme qui possède une ancre GPI. On distingue les récepteurs activateurs (Homme : Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIA ; souris : Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIV) qui possèdent un domaine d'activation intracellulaire constitué d'un motif ITAM et les récepteurs inhibiteurs (Fc $\gamma$ RIIB) qui eux comportent un motif ITIM. La phosphorylation des tyrosines de ces motifs régule la signalisation en aval de ces récepteurs. Il n'existe pas de récepteurs Fc $\gamma$ RII chez la souris. Adapté de (Nimmerjahn and Ravetch 2008)

Les Fc $\gamma$ Rs activateurs sont constitutivement actifs à la surface des macrophages. La reconnaissance et liaison de complexes immuns induisent le regroupement des Fc $\gamma$ Rs en une plateforme de signalisation au site de contact avec la particule. Le processus de phagocytose est alors initié. Il existe une balance très importante entre les signaux activateurs et inhibiteurs induit par le Fc $\gamma$ RIIB. En effet la délétion de ce dernier dans des macrophages murins immortalisés entraîne une augmentation de l'internalisation des cibles opsonisées

avec des IgG (*Streptococcus pneumoniae*), une augmentation de la clairance bactérienne dans les souris délétées pour le gène codant pour le FcγRIIB mais une réponse inflammatoire excessive conduisant au choc septique (Clatworthy and Smith 2004). Les mécanismes de régulation de cette balance entre signaux activateurs et inhibiteurs ne sont pas totalement élucidés mais dépendent de la régulation du niveau d'expression des récepteurs.

## ii. Les récepteurs aux compléments

Le complément est un système composé d'une trentaine de protéines solubles du sérum qui circulent dans l'organisme sous forme inactive. La présence d'un agent infectieux déclenchera une cascade de clivages enzymatiques qui conduiront à leur activation. Il existe trois voies d'activation du complément qui convergent toutes vers une protéine zymogène centrale : la C3. Le clivage de cette dernière permet la production de molécules anaphylactiques, de complexes d'attaque membranaire et d'opsonines.

Actuellement, on distingue cinq récepteurs au complément. Ceux de type 1, 3, 4 et Ig qui sont dits phagocytaires tandis que le CR2 ne l'est pas. Le CR1 (CD35), composé d'une chaîne transmembranaire, lie les molécules du complément C1q, C4b et C3b qui opsonisent les particules étrangères. Il n'est pas exprimé à la surface des macrophages mais est retrouvé sur les érythrocytes et les neutrophiles. Les récepteurs CR3 ( $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18, Mac1) et CR4 ( $\alpha_X\beta_2$ , CD11c/CD18 ou gp150/95) sont des intégrines hétérodimériques composées d'une chaîne commune  $\beta_2$  et d'une chaîne distincte  $\alpha_M$  et  $\alpha_X$  respectivement. Ils reconnaissent uniquement le fragment C3bi du complément, issu du clivage de la protéine C3, qui opsonise les agents infectieux. Ces récepteurs sont exprimés à la surface des monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules NK, neutrophiles et granulocytes. Les récepteurs CR1g reconnaissent eux aussi les fragments C3bi et font partie de la superfamille des immunoglobulines. Ils sont exprimés à la surface des macrophages résidents des tissus comme les cellules de Kupffer et les macrophages interstitiels du cœur (van Lookeren Campagne, Wiesmann et al. 2007).

Le récepteur CR3 est le mieux caractérisé de la famille. Comme toutes les intégrines, il existe sous une forme inactive, qui s'active par changement de conformation suite à un signal « inside-out ». Il pourra alors lier le fragment C3bi du complément qui induira un

second signal dit « outside-in » permettant la transduction du signal. La pré-activation du CR3 par le signal « inside-out » est une étape nécessaire afin d'augmenter son niveau d'expression en surface, son affinité pour le ligand et d'induire la phagocytose. Ce signal est déclenché par des cytokines inflammatoires comme le « Tumor Necrosis Factor-alpha » (TNF- $\alpha$ ), les lipopolysaccharides (LPS), des chimiokines ou la fibronectine (Wang and Luo 2010, Ginsberg 2014). *In vitro* des esters de phorbol, tels que le Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) connu pour activer la protéine kinase C (PKC), sont utilisés afin de mimer ces signaux.

c. Les récepteurs des motifs moléculaires associés aux pathogènes :  
« Pattern Recognition Receptors » (PRR)

Bactéries, champignons et parasites exposent à leur surface de nombreuses molécules hautement conservées, qui n'ont jamais été retrouvées chez les organismes supérieurs. Ces motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) peuvent être détectés par des récepteurs « Toll like » (TLRs) qui modulent la réponse inflammatoire ou des récepteurs phagocytaires. Parmi ces récepteurs phagocytaires on distingue :

- la famille des récepteurs aux lectines de type C qui reconnaissent spécifiquement les glycolipides, carbohydrates et glycoprotéines
- la famille des récepteurs « Scavengers » qui reconnaissent des motifs moléculaires bactériens.

i. Les récepteurs de lectines de type C : exemple dectine-1

Dectine-1 est un récepteur transmembranaire de type II qui est indépendant du calcium et lie spécifiquement les  $\beta$ -glucanes. Il est exprimé à la surface des cellules dendritiques myéloïdes, des monocytes, des macrophages et des neutrophiles. Il permet l'internalisation d'agents pathogènes fongiques tels que *S. cerevisiae* ou *C. albicans* sphérique. Sa structure contient un seul domaine extracellulaire de reconnaissance des carbohydrates CTLD (« C-type lectin like domain ») et un domaine cytoplasmique « ITAM-like » nécessaire à la transduction du signal (Hoving, Wilson et al. 2014). La cascade de

signalisation en aval de dectine-1 présente de nombreuses similitudes avec la voie de signalisation en aval des récepteurs Fcγ (Nimmerjahn and Ravetch 2008) . La liaison récepteur-ligand induit la phosphorylation des tyrosines du domaine « ITAM-Like » par des kinases de la famille Src. Dans les cellules dendritiques la protéine kinase Syk (« Spleen tyrosine kinase ») est recrutée au niveau des tyrosines phosphorylées du domaine « ITAM-like ». De façon surprenante, dans les macrophages, elle n'est pas impliquée comme le démontrent des expériences d'inhibition spécifique de la kinase par le piceatannol dans les macrophages murins RAW264.7 mis au contact de zymosan (Herre, Marshall et al. 2004). Cette même étude a pu mettre en évidence l'implication des enzymes phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protéine kinase C (PKC) et des GTPases Rac et Cdc42 conduisant au remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à la formation des pseudopodes autour de la particule à internaliser.

## ii. Les récepteurs « Scavengers » : exemple des SR-A

Les récepteurs scavenger (SRs) forment une super famille qui lie une variété de ligands allant des lipoprotéines modifiées aux pathogènes. Ils se classent en 10 familles définies de A à J, selon leur degré de similitudes en séquence primaire (Prabhudas, Bowdish et al. 2014, Zani, Stephen et al. 2015).

La classe A regroupe des récepteurs membranaires de type II composés d'un court domaine cytoplasmique suivi d'un domaine transmembranaire et d'un large domaine extracellulaire reconnaissant divers ligands. Les membres de cette classe (SR-A1, SR-A3, SR-A4, SR-A5, SR-A6) possèdent tous un domaine « collagen-like ». Dans les macrophages sont exprimés uniquement le SR-A1 et le SR-A6 (MARCO). Ceux-ci lient le lipopolysaccharide et l'acide lipoteichoïque à la surface de bactéries. Une étude a démontré le rôle phagocytaire de SR-A1 lors de l'internalisation de bactéries telles que *E.coli*. De plus la déplétion du gène codant pour l'expression de ce récepteur chez des souris induit une susceptibilité accrue au choc endotoxinique et à l'infection à *Listeria monocytogenes*. Ceci est probablement significatif du défaut de clairance bactérienne résultant de la perturbation de la phagocytose (Peiser, Gough et al. 2000, Canton, Neculai et al. 2013).

## 2. Signalisation en aval des récepteurs aux opsonines : FcRs et CR3

Lors de la reconnaissance d'une particule opsonisée par un récepteur phagocytaire, les cascades de signalisation qui diffèrent selon le type de récepteur engagé, sont déclenchées. Dans cette partie nous nous focaliserons sur la signalisation en aval des récepteurs Fc $\gamma$  et des récepteurs au complément CR3 qui sont les mieux caractérisés de la littérature. L'internalisation est une étape précoce de la phagocytose qui se définit par la formation d'une coupe phagocytaire c'est à dire la formation d'extensions membranaires appelées pseudopodes autour de la particule à internaliser. La génération de ces protrusions dépend principalement de deux mécanismes : la polymérisation locale d'actine et l'exocytose focalisée de vésicules issues des compartiments intracellulaires. La régulation fine de ces deux mécanismes dans l'espace et le temps est due à la coordination de multiples protéines et phosphoinositides (Braun and Niedergang 2006, Deschamps, Echard et al. 2013, Niedergang 2016)

### a. Récepteurs Fc $\gamma$ et signalisation

#### i. Phosphorylation des récepteurs

Les récepteurs Fc $\gamma$  lient la portion Fc des immunoglobulines avec une stoechiométrie 1 : 1. La reconnaissance de complexes immuns par ces récepteurs induit leur regroupement et la phosphorylation des tyrosines présentes sur les motifs ITAMs de leur domaine intracellulaire (Lin, Kurilova et al. 2016). Cette étape requiert l'activité des kinases de la famille Src car les récepteurs Fc $\gamma$  ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque (Figure 4).

- *Les kinases Src dans les macrophages*

Cette famille est composée de 9 membres dont trois sont majoritairement exprimés dans les macrophages : Lyn, Hck, Fgr. Ces kinases ont une structure similaire comprenant : (i) une région N-terminale myristylée et palmitylée qui détermine leur localisation cellulaire, (ii) un domaine SH3 (« Src homology 3 ») qui lie les régions riches en proline, (iii) un domaine SH2 qui reconnaît les phospho-tyrosines (iv) un domaine kinase C-terminal (SH1) (Byeon, Yi et al. 2012). Leur rôle dans la transduction du signal en aval des Fc $\gamma$ Rs dans les macrophages

a été révélé par une étude menée sur des souris dépourvues des gènes codant pour Hck, Lyn et Fgr. Leurs macrophages mis au contact d'érythrocytes opsonisés avec des IgG présentent une réduction d'internalisation de 60%, un défaut de phosphorylation de la chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc et une diminution significative de la phosphorylation et de l'activité de la kinase Syk connue pour être en aval de la cascade de signalisation. De plus dans les macrophages lyn<sup>-/-</sup>, fgr<sup>-/-</sup>, hck<sup>-/-</sup> la polymérisation d'actine au site de phagocytose est clairement retardée (Fitzer-Attas, Lowry et al. 2000) (Figure 4). Une autre analyse complète la précédente en soulignant que le défaut de phagocytose observé dans les macrophages lyn<sup>-/-</sup>, fgr<sup>-/-</sup>, hck<sup>-/-</sup> est un retard et non une complète inhibition due à l'activité compensatoire d'autres membres de la famille Src à savoir Fyn, Src et Yes. De plus ils ont démontré que ces kinases sont recrutées avec Syk au site de phagocytose à proximité de l'actine, mais aussi sur les phagosomes fermés ce qui suggère un rôle au cours de l'étape de maturation (Majeed, Cavegion et al. 2001).

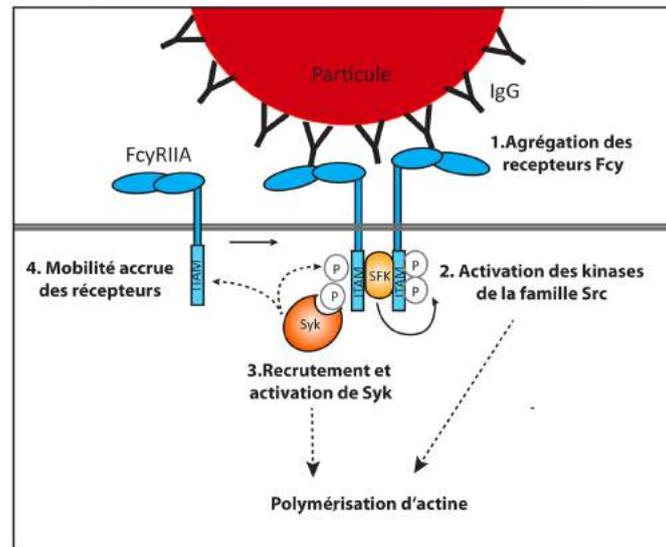
Il existe dans les macrophages deux isoformes de la protéine Hck exprimées en quantités égales : p59Hck et p61Hck. Elles diffèrent par la présence d'un groupement palmitate réversible et d'un groupement myristate permanent sur p59Hck, contrairement à p61Hck qui ne comporte qu'un groupement myristate dans sa région N-terminale (N-ter). Ces domaines acylés gouvernent leur localisation subcellulaire. Ainsi p59Hck palmitoylée sera retrouvée ancrée à la membrane plasmique tandis que p61Hck et la forme non-palmitoylée de p59Hck seront associées à la membrane lysosomale. En raison de leur localisation différente il a été démontré que p59Hck régule la plasticité du cytosquelette d'actine en aval des récepteurs Fc $\gamma$ Rs dans les macrophages murins (Carreno, Gouze et al. 2000, Carreno, Caron et al. 2002).

Les kinases de la famille Src sont donc des facteurs clés dans la transduction du signal en aval des Fc $\gamma$ Rs. Elles permettent la mise en place des tyrosines phosphorylées qui forment de véritables plateformes de recrutement d'autres kinases telles que Syk et de protéines adaptatrices nécessaires à la transduction du signal.

- *La protéine kinase Syk*

Initialement, la protéine kinase Syk a été identifiée comme interagissant via son domaine SH2 avec des tyrosines phosphorylées présentes sur les motifs ITAMs des récepteurs des lymphocytes B (BCR) activés (Johnson, Pleiman et al. 1995). Peu de temps après, une étude dans les lymphocytes T, basée sur l'expression de protéines de fusion a permis de démontrer que la protéine kinase Syk est requise pour l'assemblage de l'actine et la phagocytose en aval des récepteurs Fc $\gamma$  (Cox, Chang et al. 1996). Les auteurs ont utilisé une lignée de lymphocytes T qui expriment le domaine extracellulaire de Fc $\gamma$ RIIIA (CD16) fusionné à la chaîne  $\gamma$  mutée incapable de lier Syk. Suite à la mise au contact de ces cellules avec des érythrocytes opsonisés avec des IgG, aucune accumulation d'actine dans la région de contact avec la particule n'est observable, contrairement à l'accumulation visible dans les cellules témoins. Par la suite, ces observations ont été confirmées dans les macrophages humains. Effectivement, une fois les domaines ITAMs phosphorylés, Syk est recrutée et activée au site de la phagocytose à proximité de l'actine polymérisée. Dans des macrophages dérivés de moelle osseuses de souris invalidées pour le gène codant pour la protéine Syk, l'internalisation d'érythrocytes opsonisés par des IgG est inhibée (Crowley, Costello et al. 1997, Kiefer, Brumell et al. 1998). Enfin, récemment, Valentin Jaumouillé *et al* ont pu montrer l'implication de Syk dans la mobilité des récepteurs Fc $\gamma$  et l'assemblage de l'actine. En effet, dans des cellules quiescentes, les Fc $\gamma$ Rs possèdent deux modes de diffusion à la membrane : rapide et lente. L'inhibition de l'activité de Syk augmente le confinement des récepteurs. Au cours de la phagocytose, les récepteurs deviennent très mobiles ce qui favorise leur regroupement et activation à l'extrémité de la zone d'adhésion dans un modèle de phagocytose frustée. Parallèlement, ils sont exclus de la région de polymérisation d'actine. L'inhibition de l'activité kinase de Syk empêche la polymérisation d'actine au site de contact entre la particule et le macrophage et induit un défaut d'extension des pseudopodes. De plus, l'inhibition de Syk sur des macrophages primaires humains au repos induit une redistribution de l'actine corticale avec une diminution de l'actine-F et des podosomes sur la face ventrale des macrophages et une agmentation de l'actine-F sur leur face dorsale (Jaumouille, Farkash et al. 2014). L'ensemble de ces résultats montre

l'implication de Syk dans le remodelage du cytosquelette d'actine qui module la mobilité des récepteurs.



**Figure 4 : Activation des tyrosines kinase en aval des FcγRs.** La liaison IgG- FcγR induit l'agrégation des récepteurs Fcγ et la phosphorylation des domaines ITAMs, par les kinases de la famille Src (SFK). Les tyrosines phosphorylées permettent le recrutement de la kinase Syk qui, à son tour est activée par phosphorylation. Une fois activée, Syk phosphoryle les motifs ITAMs des récepteurs voisins qui se regroupent sous la particule. Adapté de (Flannagan, Jaumouillé et al. 2012)

En résumé, suite à la phosphorylation des domaines ITAMs des FcγRs, Syk est recrutée au site de la phagocytose par le biais de son domaine SH2. Elle est alors phosphorylée à son tour et participe à la phosphorylation des motifs ITAMs. Ceci favorise la mobilité des récepteurs voisins conduisant à une amplification du signal. De nombreuses protéines adaptatrices sont ensuite recrutées et ancrées pour amener au site de l'internalisation des enzymes modifiant les phosphoinositides de la membrane plasmique.

## ii. Les phosphoinositides

Les phosphoinositides ne sont pas de simples éléments structuraux de la membrane plasmique. Ils permettent la régulation fine des voies de signalisation, aident à la définition des compartiments cellulaires et dirigent le trafic membranaire. Au cours de la phagocytose induite par les FcγRs, les phosphoinositides jouent donc un rôle crucial lors de la formation et la maturation des phagosomes.

- *Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>)*

Dans les cellules phagocytaires quiescentes, le PI(4,5)P<sub>2</sub> est localisé majoritairement dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Une petite fraction est également retrouvée au niveau de l'appareil de Golgi. Au cours de la phagocytose déclenchée par les récepteurs FcγRs, le PI(4,5)P<sub>2</sub> et ses métabolites contrôlent un nombre remarquable d'évènements notamment le remodelage du cytosquelette d'actine, la mobilité des récepteurs, et le trafic membranaire.

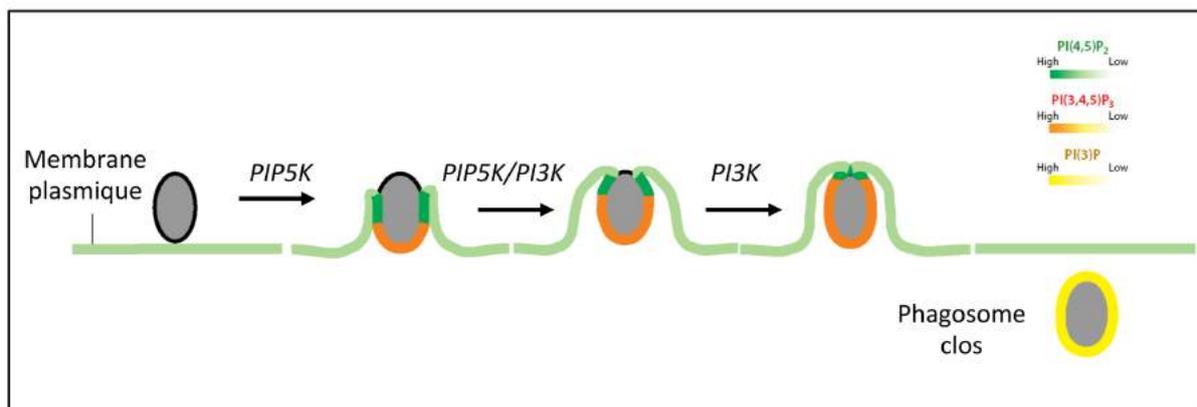
Suite à l'activation des FcγRs, le niveau de PI(4,5)P<sub>2</sub> change au site de contact entre la particule et la cellule phagocytaire. L'utilisation de sondes fluorescentes reconnaissant spécifiquement le PI(4,5)P<sub>2</sub> ( le domaine « pleckstrin homology » de la phospholipase Cδ) a révélé l'accumulation précoce de PI(4,5)P<sub>2</sub> dans les pseudopodes en extension, suivie de sa diminution rapide à la base de la coupe phagocytaire. Au moment de la fermeture et de l'internalisation complète du phagosome, le PI(4,5)P<sub>2</sub> n'est plus détectable (Botelho, Teruel et al. 2000). Cette accumulation transitoire de PI(4,5)P<sub>2</sub> est, en partie, due à l'activité de la phosphatidylinositol 5-phosphate kinase de type 1 (PIP5K) qui phosphoryle le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) présent à la membrane plasmique. Il existe trois isoformes de la PI5K (α, β, et γ) qui sont recrutées au cours de l'extension des pseudopodes grâce à des interactions électrostatiques (Fairn, Ogata et al. 2009). Leur activité est positivement régulée par les GTPases Rho et ARF6 (« ADP ribosylation factor 6 ») (Levin, Grinstein et al. 2015). Ces dernières sont impliquées dans le déclenchement de la polymérisation d'actine que je détaillerai par la suite.

La diminution rapide de PI(4,5)P<sub>2</sub> à la base de la coupe phagocytaire est induite par la combinaison de l'activité de plusieurs kinases, phosphatases et lipases. Tout d'abord, il y a la conversion du PI(4,5)P<sub>2</sub> en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) par la phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K). Ceci induit le recrutement de la phospholipase Cγ (PLC γ) qui sera responsable de la conversion du PI(4,5)P<sub>2</sub> en diacylglycérol (DAG) et inositol(1,4,5) triphosphate (IP3). Enfin les phosphatases « Oculocerebrorenal syndrome of lowe » (OCRL) et « inositol polyphosphate-5-phosphatase B » (INPP5B) déphosphorylent le PI(4,5)P<sub>2</sub>.

Ce changement biphasique de la concentration en  $PI(4,5)P_2$  à la membrane plasmique au cours de la formation du phagosome est absolument nécessaire à une internalisation complète. En effet une étude chez *Dictyostelium* a rapporté que l'inactivation de la protéine homologue d'OCRL, Dd5P4, conduisait à une inhibition de la phagocytose (Loovers, Kortholt et al. 2007). De plus, une étude a mis en évidence l'existence d'un trafic vésiculaire d'OCRL dépendant de Bcl10 et AP-1. La déplétion de Bcl10 dans des macrophages mis au contact d'érythrocytes opsonisés par des IgG conduit à la formation de coupe phagocytaire abortive riche en  $PI(4,5)P_2$  et F-actin (Marion, Mazzolini et al. 2012).

- *Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ( $PI(3,4,5)P_3$ )*

Dans les cellules quiescentes, le  $PI(3,4,5)P_3$  est rare. Cependant, suite à l'engagement des  $Fc\gamma R$ s, il est rapidement généré via la phosphorylation du  $PI(4,5)P_2$  par la kinase PI3K de classe I. Cette dernière est recrutée et activée au site de phagocytose (Marshall, Booth et al. 2001).



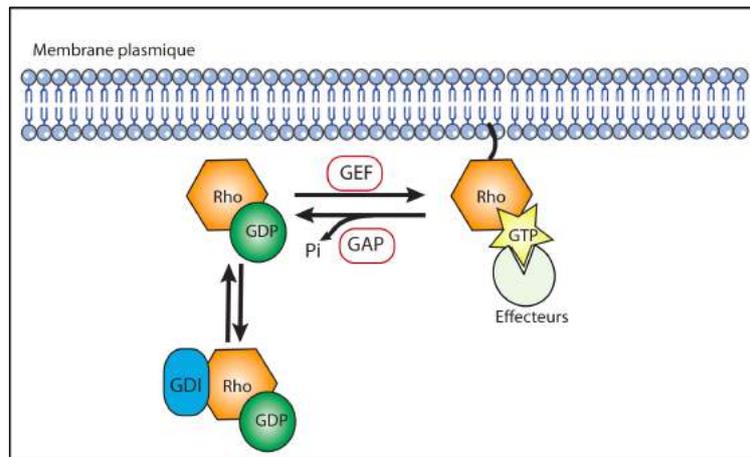
**Figure 5 : Changements de la composition en phosphoinositides de la membrane au site de formation du phagosome.** Suite au contact entre une particule opsonisée et son récepteur, le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ( $PI(4,5)P_2$ ), générée par la PIP5K, s'accumule transitoirement, puis disparaît à la base de la coupe phagocytaire. Sous l'action de la PI3K, le  $PI(4,5)P_2$  est transformé en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ( $PI(3,4,5)P_3$ ). Ce dernier s'accumule et persiste jusqu'à la fermeture du phagosome. Une fois internalisée, la membrane du phagosome s'enrichit en phosphatidylinositol-3-phosphate. D'après (Flannagan, Jaumouillé et al. 2012)

Son recrutement transitoire coïncide avec la disparition du  $PI(4,5)P_2$  à la base de la coupe phagocytaire. L'inhibition de son activité par des drogues telles que LY294002 ou

wortmannine empêche uniquement l'internalisation de larges particules cependant la polymérisation d'actine persiste à la base de la coupe phagocytaire (Cox, Tseng et al. 1999). Par conséquent la PI3K de classe I n'est pas nécessaire aux étapes initiales conduisant à la polymérisation d'actine, mais est requise pour la progression de l'extension des pseudopodes. Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> recrute de nombreux effecteurs qui possèdent un domaine PH (« pleckstrin homology »). Parmi eux, une myosine non conventionnelle : la myosine X (Cox, Berg et al. 2002) que je vous présenterai dans la section 5 de ce chapitre .

### iii. Les Rho GTPases

Les petites protéines G de la famille Rho sont des facteurs clés dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Elles font partie de la superfamille des petites protéines G Ras et possèdent un domaine GTPase très conservé. Elles divergent au niveau de leurs extrémités C- et N- terminales qui contiennent une région « CAAX » qui peut subir des modifications post-traductionnelles et ainsi les adresser à différents compartiments intracellulaires. Les GTPases existent sous une forme inactive cytosolique liée au GDP (Guanosine diphosphate) et une forme active membranaire liée au GTP (Guanosine triphosphate). L'activation des GTPases est soumise au contrôle de trois catégories de protéines : (i) Les facteurs d'échange du GTP appelés GEFs (« guanine nucleotide exchange factors ») qui favorisent le chargement du GTP, (ii) les facteurs d'inhibition de la dissociation du GDP nommés RhoGDI qui séquestrent et stabilisent la forme inactive Rho-GDP, (iii) les protéines d'activation de l'activité GTPase ou GAP qui accélèrent l'hydrolyse du GTP. Les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 impliquées dans le remodelage de l'actine filamenteuse (actine-F) sont les mieux caractérisées. Leur expression est ubiquitaire (Mao and Finnemann 2015).

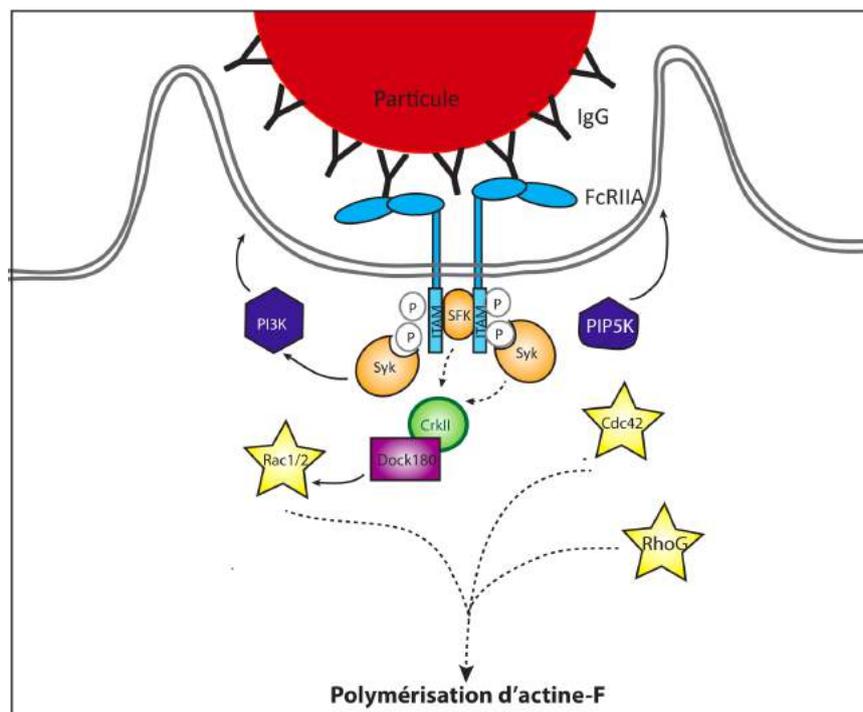


**Figure 6 : Le cycle des Rho GTPases.** Les GTPases Rho alternent entre une forme soluble inactive liée au GDP et une forme active membranaire liée au GTP. Les GAPs et les GEFs contrôlent le passage d'une forme à l'autre. Les GEFs favorisent l'échange du GDP en GTP tandis que les GAPs catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP + Pi. Sous sa forme inactive Rho-GDP est retenu dans le cytosol associé au facteur GDI. Une fois activée, Rho-GTP interagit avec ses effecteurs et permet la propagation du signal.

Au cours de la phagocytose en aval des récepteurs FcγRs, Rac1, Rac2 et Cdc42 sont activées et recrutées au site de la phagocytose. Des études séminales menées par Emmanuelle Caron avec Allan Hall, basées sur l'utilisation de fibroblastes exprimant le FcγRIIA ou des macrophages murins transfectés ont révélé que l'expression de mutants dominants négatifs de Rac1 (Rac1<sub>N17</sub>) et Cdc42 (Cdc42<sub>N17</sub>) induisent une inhibition de l'internalisation des globules rouges opsonisés avec des IgGs. Un défaut d'extensions des pseudopodes dû à une diminution de la polymérisation d'actine au site de la phagocytose est également observé (Cox, Chang et al. 1997, Caron and Hall 1998). La cinétique d'activation et de recrutement de ces GTPases au site de la phagocytose a pu être mise en évidence par des expériences de précipitation par « GST » ou de vidéomicroscopie. Rac1 est activée précocement (1min) après le déclenchement de la phagocytose induite par le FcγR tandis que l'activation de Cdc42 débute à 1min et atteint son maximum à 10min (Niedergang, Colucci-Guyon et al. 2003). Hoppe et Swanson ont suivi, en temps réel, la localisation et l'activation de Rac1, Rac2 et Cdc42 en utilisant la technique d'imagerie basée sur le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) au cours de la phagocytose dépendante du FcγRs des macrophages murins. Leurs résultats confirment la relocalisation

précoce de Rac1, Rac2 et Cdc42. Rac1 actif s'accumule dans les pseudopodes en extension alors que Rac2 est concentrée à la base de la coupe phagocytaire. Cdc42 co-localise complètement avec l'actine-F à l'extrémité des pseudopodes (Swanson and Hoppe 2004).

Une étude a identifié le recrutement de la GEF activatrice DOCK180 (« dedicator of cytokinesis 180 ») de Rac suite à l'activation des récepteurs FcRs. Cette GEF s'associe à la protéine adaptatrice CrkII qui contrôle son recrutement au site de phosphorylation des motifs ITAMs. L'inhibition de l'expression de ces deux protéines dans des macrophages murins par ARN interférence bloque la phagocytose. L'expression de mutants dominants négatifs de CrkII empêche le recrutement de DOCK180 et Rac aux pseudopodes (Lee, Cosio et al. 2007). En conclusion, Rac semble donc être une GTPase clé nécessaire à l'étape d'internalisation de la phagocytose.



**Figure 7 : Schéma simplifié d'activation des RhoGTPases et kinases des phosphoinositides en aval des Fc $\gamma$ Rs.** Le regroupement des récepteurs induit l'activation des kinases Src (SFK) et Syk qui assurent à leur tour le recrutement de protéines adaptatrices (CrkII) et des kinases des phosphoinositides (PIP5K, PI3K). La plateforme de signalisation va permettre l'activation de GEFs (DOCK180) des Rho-GTPases (Rac, Cdc42, RhoG). Les Rho-GTPases activées induisent la polymérisation d'actine. Inspiré de (Flannagan, Jaumouillé et al. 2012).

De façon surprenante, une étude menée par le groupe d'Emmanuelle Caron basée sur le criblage par ARN interférence de 20 protéines Rho GTPase a remis en question le rôle dit essentiel de Rac1 au cours de la phagocytose dépendante du Fc $\gamma$ R. En effet la déplétion de Rac1 n'affecte pas l'internalisation des particules tandis que Rac2 l'inhibe significativement. De plus ils ont mis en évidence l'activation et le recrutement spécifique d'une autre GTPase, RhoG, au site de la phagocytose. Le signal d'actine-F au site de la phagocytose dans des macrophages dépourvus de RhoG est équivalent au signal quantifié autour des globules rouges dans des macrophages traités avec la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation d'actine. Par conséquent RhoG régule la polymérisation d'actine au cours de la phagocytose Fc $\gamma$ R (Tzircotis, Braga et al. 2011). Cependant, des études complémentaires restent à réaliser afin de mieux disséquer son mécanisme d'action.

## b. Récepteurs au complément et signalisation

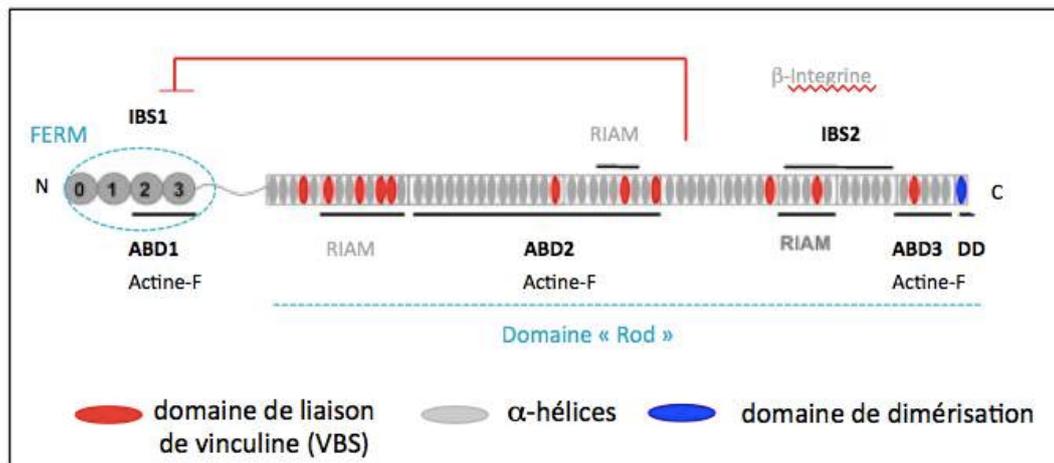
### i. Pré-activation des intégrines CR3 : signal « inside out »

Le CR3 est un récepteur phagocytaire qui fait partie de la famille des intégrines. Il partage donc, de nombreux caractères communs avec celles-ci qui sont impliquées dans l'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC). Ces récepteurs sont un lien physique entre la MEC et le cytosquelette d'actine. Comme décrit précédemment, le CR3 est constitué d'une chaîne  $\alpha_M$  et d'une chaîne  $\beta_2$ . Chaque sous-unité est composée d'un large domaine extracellulaire liant le ligand, d'un unique domaine transmembranaire (TMD) et d'une courte queue cytoplasmique permettant la transmission du signal. Au repos, les intégrines présentent une faible affinité pour leur ligand. Ceci est dû à une conformation coudée dite « fermée » du domaine extracellulaire. Des études de cristallographie et de cryo-microscopie électronique, en particulier sur les intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_3$ , ont révélé que cette conformation est stabilisée par des interactions spécifiques entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , au niveau de leur domaine transmembranaire. De plus de nombreuses études de mutagenèse au niveau de ces domaines ont confirmé qu'une interruption de cette interaction aboutissait à l'activation des intégrines (Hughes, Diaz-Gonzalez et al. 1996, Vinogradova, Velyvis et al. 2002, Zhu, Luo et al. 2008, Wang and Luo 2010, Ginsberg 2014).

L'interaction de protéines cytoplasmiques avec la queue intracellulaire de la chaîne  $\beta$  régule l'activité des intégrines et fait le lien avec le cytosquelette d'actine.

- *Taline*

La taline est une protéine de 270 kDa qui existe sous deux isoformes chez les mammifères. Ces isoformes diffèrent par leur distribution dans l'organisme. La taline 1 est ubiquitaire tandis que la taline 2 est exprimée dans le cœur et le cerveau. La taline 1 est composée de deux domaines principaux. Le domaine « head » comprend un domaine FERM (« 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin ») qui inclut un site de liaison de haute affinité pour la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  et un domaine tige (« rod ») qui possède de multiples sites de liaison à l'actine (Critchley 2009) (Figure 8). Elle se lie à proximité du premier motif conservé NPXY sur la chaîne  $\beta$  intégrine. Le rôle essentiel de la taline dans l'activation des intégrines a d'abord été observé dans  $\alpha_{IIb}\beta_3$  puis démontré comme étant une propriété associée aux intégrines  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ . Cette propriété a été bien documentée dans des systèmes in vitro ou des modèles cellulaires. Notamment, une étude dans les plaquettes a permis d'identifier le « head domain » comme site de liaison de la taline sur la chaîne  $\beta$ . De plus, la surexpression de ce domaine sauvage dans des cellules CHO (« chinese hamster ovary cell ») induit une augmentation de la liaison d'un anticorps mPAC capable de reconnaître la forme activée des intégrines (Calderwood, Zent et al. 1999). Lors de sa liaison à la chaîne  $\beta$ , la taline induit un réarrangement allostérique des intégrines correspondant à une dissociation des domaines transmembranaires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Par conséquent, la conformation coudée dite « fermée » passe à une conformation « ouverte » capable de lier son ligand (Ginsberg 2014).



**Figure 8 : Structure de la taline.** La région N-terminale contient un domaine FERM qui comprend les sous domaines F0, F1, F2, F3. Le domaine « Rod » est constitué de 62 hélices- $\alpha$  amphipatiques. Les domaines de liaison à l'actine, vinculine et intégrine sont indiqués. ABD, « actin binding domain » ; IBS, « Integrin binding site ». La position de l'interaction inhibitrice entre le domaine F3 et le domaine « rod » est indiquée en rouge. Adapté de (Ciobanasu, Faivre et al. 2013)

- *Kindline*

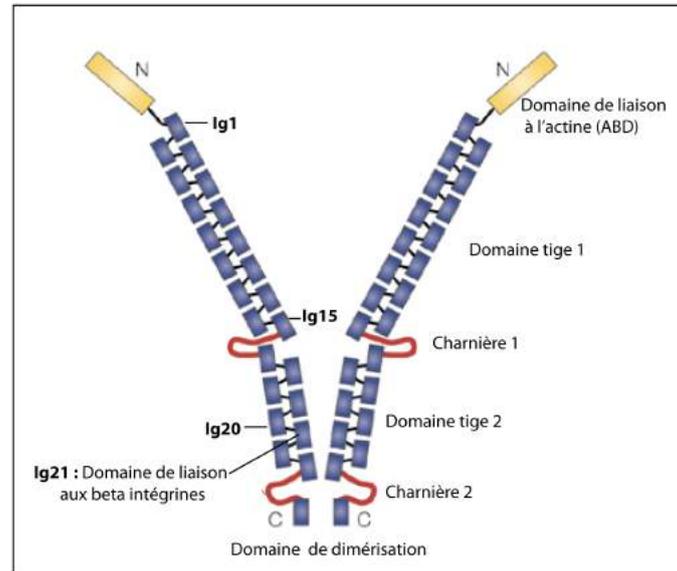
Chez les mammifères, il y existe trois kindlines. La kindline-1 est principalement exprimée dans les cellules épithéliales. La kindline-2, quant à elle, possède un large spectre d'expression mais est absente des cellules sanguines. Enfin la kindline-3 est exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques (Rognoni, Ruppert et al. 2016). Cette dernière se compose d'un domaine FERM, caractéristique des membres de cette famille, en position N-terminale. Il se compose de quatre sous-domaines dont le sous-domaine 2 (F2) qui présente un domaine PH responsable de sa liaison à la membrane et le sous-domaine 3 (F3) qui permet sa liaison à la queue cytoplasmique des chaînes  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ . Une comparaison entre les protéines contenant un domaine FERM a mis en évidence que le sous-domaine F3 de la kindline-3 partage la plus grande homologie de séquence avec le sous domaine F3 de la taline (Moser, Nieswandt et al. 2008). En effet, tout comme la taline, le site de liaison de kindline-3 à la chaîne  $\beta$  est localisé au niveau du motif NPXY à la membrane distale. Une étude chez des sujets atteints de déficience d'adhésion des leucocytes de type III (LAD-III), a révélé que des mutations de la kindline-3 étaient responsables des troubles. De plus, ces mutations entraînent un défaut d'activation des intégrines (Svensson, Howarth et al. 2009).

Les kindlines seules ne sont pas suffisantes pour induire l'activation des intégrines mais favorisent la liaison de la taline à la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$ . En effet, leur surexpression n'active pas les intégrines mais leur co-expression avec la taline potentialise l'activation des intégrines (Harburger, Bouaouina et al. 2009, Calderwood, Campbell et al. 2013). In vitro ces deux protéines forment un complexe nécessaire à l'activation des intégrines. Cependant le mécanisme et la cinétique de leur coopération restent méconnus.

- *Filamine* et Migifiline

La filamine est une protéine de 280 kDa qui existe sous 3 isoformes A, B et C. La forme la plus abondante et largement exprimée est la filamine A (FLNa). Les isoformes A et B sont ubiquitaires tandis que l'expression de la filamine C est restreinte aux muscles squelettiques et cardiaques (van der Flier and Sonnenberg 2001). La filamine régule la structure cellulaire, l'adhésion et la motilité grâce à sa capacité à lier des filaments d'actine permettant la formation d'un réseau branché orthogonal. Il s'agit d'un homodimère parallèle flexible dont chaque sous-unité est composée d'un domaine de liaison à l'actine en position N-terminale (ABD) incluant deux domaines CH (« calponin homology »), suivi de 24 domaines « immunoglobulin-like » (IgFLN) en tandem et de domaines charnières flexibles entre les domaines IgFLN15-16 et IgFLN23-24. Le domaine IgFLNa21 correspond au site d'interaction majeur avec la région cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  (Figure 9). La structure de la filamine lui permet d'agir comme un noeud d'interaction avec grande variété de protéines. Une étude réalisée dans des cellules CHO basée sur des expériences de gains et pertes de fonction (par surexpression du domaine Ig21 sauvage ou muté responsable de la liaison de la filamine A à la chaîne  $\beta$ ) a démontré qu'une inhibition de l'interaction entre la filamine et la chaîne  $\beta$  conduisait à une inhibition de la migration cellulaire due à une incapacité de former des protrusions membranaires. Par conséquent, le recrutement de la filamine au niveau des intégrines impliquées dans l'attachement cellulaire pourrait conduire à une augmentation de la stabilité du cytosquelette d'actine et une restriction de la formation de protrusions. Ces observations ont plus tard été confirmées dans des cellules fibroblastiques totalement dépourvues de filamine (Calderwood, Huttenlocher et al. 2001, Baldassarre, Razinia et al. 2009). De plus une étude récente de la structure du complexe formé entre la filamine A et l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  révèle qu'en plus de lier la région C-terminale de

l'Intégrine via son domaine Ig21, la filamine A lie la région C-terminale de  $\alpha_{IIb}$ . Ceci conduit au maintien de l'intégrine sous sa forme inactive (Liu, Das et al. 2015).



**Figure 9: Structure de la filamine A.** Inspiré de (Stossel, Condeelis et al. 2001)

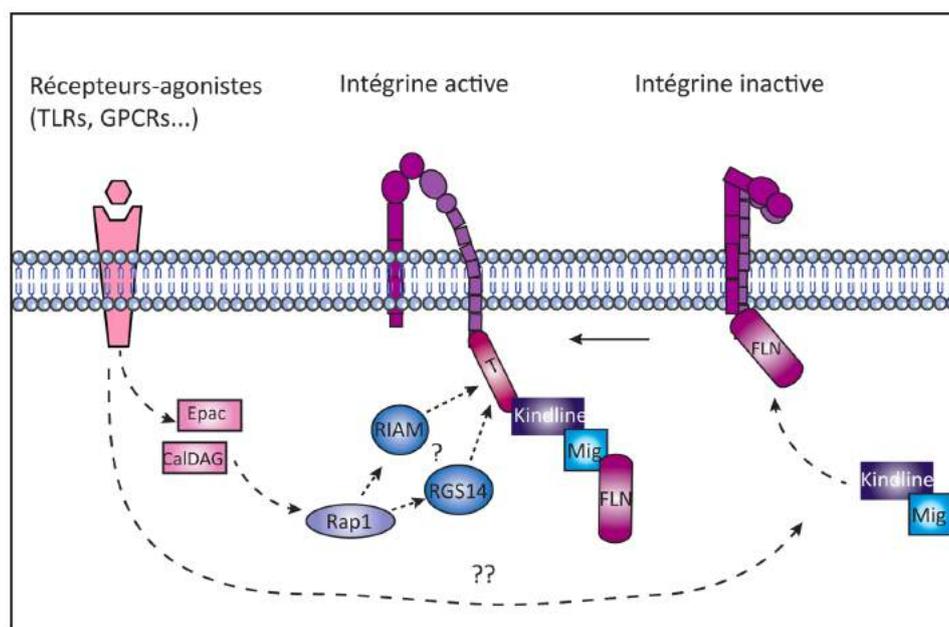
De façon surprenante la filamine et la taline possèdent le même site d'interaction sur les intégrines (Kiema, Lad et al. 2006). Une étude récente a exploré la compétition de liaison entre la filamine et la taline dans des essais *in vitro*. Les deux protéines ont été positionnées à équidistance de la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  et à des moments différents afin d'observer les interactions. Les auteurs montrent que lorsque la taline est associée avec l'intégrine avant la filamine, cela entraîne son activation. En revanche lorsque la filamine est engagée avec l'intégrine avant la taline, la conformation « fermée » de l'intégrine persiste (Truong, Shams et al. 2015). Ainsi, la filamine pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'activation des intégrines et dans l'inhibition de la signalisation « outside-in » induite par la taline. Cependant, il n'existe que très peu d'évidences directes de l'influence de la filamine sur le signal inside-out. Une étude de Das M. et ses collègues montre que l'effet inhibiteur de la filamine peut être levé grâce à son interaction avec la migifiline (Mig). Il s'agit d'une protéine capable de lier directement les filamines A et C (Tu, Wu et al. 2003). Elle se compose de trois domaines : un domaine N-terminal d'interaction avec la FLN notamment, un domaine PRD (« prolin rich domain ») et un domaine C-terminal LIM qui

interagit avec la kindlin-2. Des expériences de résonance magnétique nucléaire (NMR) et de cristallographie indiquent que le site de liaison de la migifiline sur la FLN chevauche le site d'interaction de la FLN aux  $\beta$  intégrines. De plus la migifiline lie la FLN avec une plus grande affinité que les intégrines. La surexpression de la migifiline ou l'inhibition de son expression entraîne respectivement une augmentation ou une diminution de l'adhésion cellulaire. La co-expression de la FLN et de la migifiline supprime l'inhibition induite par la FLN seule sur l'activation des intégrines (Das, Ithychanda et al. 2011).

- *Le signal « inside-out » dans les macrophages*

Dans les macrophages au repos, la taline est distribuée de façon aléatoire et diffuse. Des interactions intramoléculaires (Ig20-Ig21) inhibent sa liaison aux intégrines et à la membrane plasmique. Suite à un ensemble de médiateurs inflammatoires extracellulaires tels que le LPS, le TNF- $\alpha$ , le « platelet activating factor » (PAF) ou le PMA, l'autoinhibition de la taline est levée (Wright and Griffin 1985, Newman, Mikus et al. 1991, Caron, Self et al. 2000). Elle est alors recrutée au site de formation des phagosomes en aval des récepteurs CR3. L'extinction de son expression par ARN interférence (ARNi) abolit la capture et l'internalisation de globules rouges opsonisés par du complément. Lim *et al* ont démontré l'interaction directe entre le domaine « head » de la taline et la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  du CR3 par des expériences de co-immunoprécipitation et de précipitation par GST (Lim, Wiedemann et al. 2007). Le recrutement de la taline au niveau des intégrines requiert l'activation d'une GTPase de la famille Ras : Rap1. Cette GTPase est activée sous l'action de différents stimuli comme entre autres le TNF- $\alpha$ , le LPS et le PDGF (« platelet-derived growth factor »). Les acteurs moléculaires faisant le lien entre ces récepteurs et l'activation de Rap1 ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, ils semblent impliquer les facteurs d'échange GEF (Guanine nucleotide exchange factor) : Epac et CalDAG (Moon and Pyo 2007, Gloerich and Bos 2011). L'expression d'un mutant constitutivement actif de Rap1 (Rap1V12) est suffisante à la pré-activation du CR3 et le déclenchement de l'internalisation de particules opsonisées par le fragment C3bi du complément (Caron, Self et al. 2000, Lim, Dupuy et al. 2010). Rap1 activée interagit avec la protéine RIAM (« Rap1-GTP-interacting adaptor molecule »). Il s'agit d'une protéine adaptatrice de la famille MRL (Mig-10/RIAM/Lamellipodin) qui se compose d'un domaine d'association Ras (RA), un domaine PH et d'un domaine riche en proline (PRD).

La déplétion de RIAM dans des macrophages primaires humains inhibe la phagocytose induite par le CR3 et dépendante de l'activation de Rap1. De plus, elle induit une réduction du recrutement de la taline au niveau de la chaîne  $\beta$  du CR3, démontrée par des expériences de co-immunoprécipitations et d'immunofluorescence (Medrano-Fernandez, Reyes et al. 2013). Un autre effecteur de Rap 1, RGS14 (« Regulator of G-protein signalling-14 »), joue également un rôle dans le signal « inside-out » en amont de la taline. En effet, dans des cellules COS-7 exprimant les chaînes  $\alpha_M\beta_2$ , mises au contact de globules rouges opsonisés avec du complément, une surexpression du facteur RGS14 induit une augmentation des particules associées aux cellules par rapport à la condition témoin. De plus la surexpression du facteur RGS14 et d'une forme mutée du CR3 dépourvue du domaine de liaison de la taline conduit à un défaut d'association des particules opsonisées avec du complément (Lim, Thompson et al. 2013).



**Figure 10 : Modèle du signal « inside-out ».** Sous forme inactive, la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  lie la filamine (FLN). Le déplacement de la filamine suite à un signal se fait par le biais de son interaction avec la migifiline (Mig) qui est recrutée aux environs de la chaîne  $\beta$  par la kindline. Parallèlement des signaux intracellulaires induisent l'activation des GEFs Epac et CalDAG, Rap1, RIAM, RGS14 qui, ensemble contribuent à la levée de l'autoinhibition de la taline (T). La taline et la kindline forment alors un complexe capable de se lier au motif NPXY de la chaîne  $\beta$ . Ceci induit la séparation des domaines transmembranaires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  conduisant à l'activation de l'intégrine. Les signaux régulant la cinétique de ces événements ne sont pas clairs. Inspiré de (Das, Subbaya Ithychanda et al. 2014, Freeman and Grinstein 2014).

En résumé, la taline est un régulateur majeur de l'activation des intégrines. Elle est à l'interface entre les immunorecepteurs, les TLRs et les récepteurs phagocytaires CR3 pour amorcer la phagocytose. Cependant, l'activation du récepteur CR3 est un mécanisme complexe dans lequel subsiste des zones d'ombre comme le lien entre RIAM et RGS14 dans la signalisation en amont de la taline ou encore la cinétique d'association de la migifiline et la kindline avec la taline ou la filamine.

## ii. Activation des récepteurs au CR3 : le signal « outside-in »

Contrairement à la phagocytose dépendante des FcγRs, celle induite par le CR3 est indépendante de l'activation des Rho GTPases : Rac et Cdc42. En revanche la liaison du CR3 au fragment C3bi couvrant une particule déclenche le recrutement de la GTPase RhoA au site de la phagocytose dans des macrophages murins immortalisés. Le traitement des cellules par la toxines C3 (Caron and Hall 1998) ou la surexpression d'un mutant dominant négatif de RhoA est suffisante pour inhiber l'internalisation (Wiedemann, Patel et al. 2006). L'utilisation de drogues inhibitrices de RhoA (Y-27632) ou l'expression d'un mutant dominant négatif de la Rho-kinase, ROCK, effectrice de RhoA, induit une diminution de l'internalisation des particules et du recrutement de l'actine-F au site de la phagocytose (Olazabal, Caron et al. 2002, Colucci-Guyon, Niedergang et al. 2005). Les mécanismes conduisant à l'activation de RhoA ne sont pas totalement compris. Une étude a rapporté que le recrutement spécifique de RhoA au site de la phagocytose est indépendant de la chaîne  $\alpha_M$  et de son activation. En effet le recrutement de RhoA nécessite trois résidus thréonine sur la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  du CR3 (Wiedemann, Patel et al. 2006). La mutation de ces motifs empêche le recrutement de RhoA mais pas son activation. Il existe donc probablement un intermédiaire mobile impliqué dans l'activation de la GTPase.

Les GEFs de la GTPase Rac, Vav1 et Vav3, sont requises dans la phagocytose dépendante du CR3. Dans des macrophages primaires murins dépourvus du gène codant pour leur expression, la phagocytose est inhibée en aval des récepteurs CR3 (et non des récepteurs FcγRs) et se caractérise par un défaut de polymérisation d'actine-F au site de la phagocytose. L'introduction de protéines Rac constitutivement actives dans des macrophages primaires murins déplétés de Vav1/Vav3 restaure la phagocytose dépendante

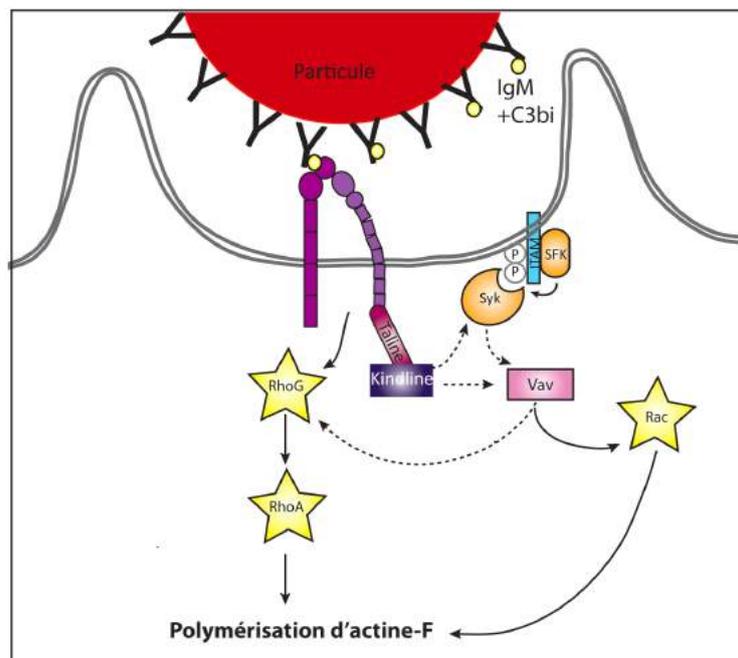
au CR3 (Hall, Gakidis et al. 2006). Des expériences complémentaires analysant l'interdépendance de Vav et RhoA dans le cadre de la phagocytose pourraient être réalisées. Des résultats inverses sont observés selon le modèle cellulaire utilisé. Dans une lignée cellulaire de macrophages murins, la phagocytose induite par le CR3 est indépendante de l'activation de Rac tandis que dans les macrophages primaires murins Rac est nécessaire. Ce point reste à éclaircir.

La kindline-3 connue pour son rôle dans le signal « inside-out » joue également un rôle dans le signal « outside-in » comme le démontre une étude récente de Zhi-Hong Xue *et al.* En utilisant des cellules exprimant la kindline-3 endogène et transfectées avec le CR3 constitutivement actif, ces auteurs, montrent que des cellules traitées avec des siRNAs ciblant la kindline-3, adhèrent mais s'étalent très peu sur une surface couverte de C3bi comparées aux cellules co-exprimant la kindline-3 et le CR3 activé. Suite à l'activation du CR3 par un anticorps spécifiques (KIM185), la déplétion de la kindline-3 induit une diminution de l'activation de Syk, un niveau basal de phosphorylation de la GEF Vav, et une diminution de l'activation de Rac et Cdc42 comparé à la condition témoin. Tous ces résultats suggèrent que la kindline-3 joue un rôle important dans la signalisation « outside-in » qui régule le remodelage du cytosquelette d'actine. Cependant, au cours de cette étude, les auteurs n'ont pas réussi à montrer l'activation de la protéine RhoA dans leurs conditions expérimentales (Xue, Feng et al. 2013). Il serait donc très intéressant de réaliser des expériences similaires en utilisant des particules opsonisées avec du C3bi pour observer l'activation des GTPases.

De plus, une autre étude a révélé le rôle de la GTPase RhoG en amont de Rac. Tout comme dans la phagocytose dépendante du Fc $\gamma$ R, RhoG est recrutée au site de liaison de la particule à internaliser et semble former un complexe avec Dock180/ELMO pour stimuler l'activité de Rac en aval du CR3. L'inhibition de son expression conduit à un défaut de phagocytose (Tzircotis, Braga et al. 2011). Ceci renforce l'idée que la protéine Rac est également requise en aval du CR3.

Récemment, une étude a mis en lumière le rôle de la GTPase Rap1 dans la signalisation « outside-in » en parallèle de RhoA (Kim, Moon et al. 2012). L'analyse de la phagocytose des particules de zymosan opsonisées avec du sérum non inactivé a révélé que

suite à l'inactivation de RhoA et à l'induction de l'activation de Rap1 (par l'intermédiaire de l'activation de sa GEF Epac) dans des macrophages murins, l'internalisation des particules est restaurée. Cette restauration ne se fait pas par le biais de RhoA-GTP qui est considérablement réduite suite à l'activation de sa GAP. Les auteurs suggèrent que l'activation endogène de Rap1 par du zymosan opsonisé avec du sérum non inactivé, n'inhibe pas RhoA. En revanche, l'activation endogène de RhoA et Rap1 se fait séparément durant la phagocytose. Les deux protéines régulent ensemble le processus. De plus, Rap1-GTP permet le recrutement d'une protéine de liaison à l'actine, la profiline, qui est essentielle à la polymérisation d'actine dépendante des formines (Romero, Le Clainche et al. 2004, Kim, Moon et al. 2012).



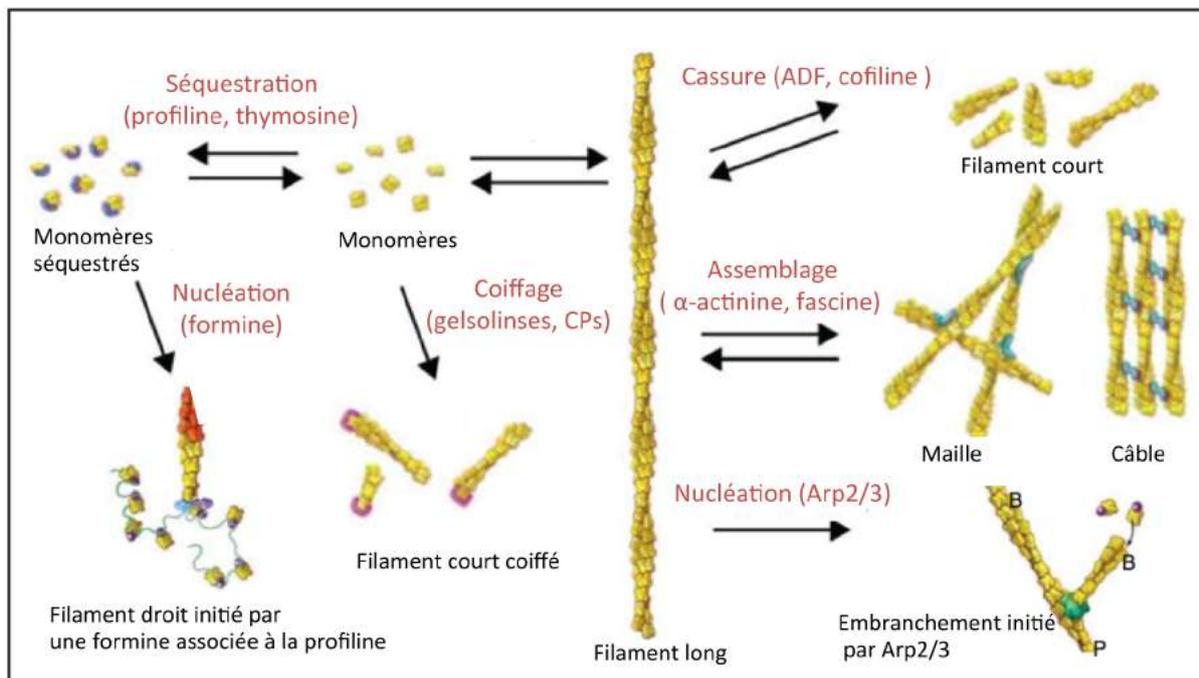
**Figure 11: Activation des Rho-GTPases en aval du CR3.** La liaison d'une particule opsonisée avec du complément au CR3 induit un signal « outside-in » qui se caractérise par l'activation des Rho GTPases : RhoG, RhoA, Rac qui stimulent par le biais d'effecteurs la polymérisation d'actine. Inspiré de (Flanagan, Jaumouillé et al. 2012)

### 3. Remodelage du cytosquelette d'actine au cours de la formation des phagosomes.

L'actine, avec les microtubules et les filaments intermédiaires, fait partie des éléments qui constitue le cytosquelette et est responsable des propriétés architecturales et

mécaniques de la cellule. Il s'agit d'une protéine globulaire polarisée de 42 kDa capable de lier et d'hydrolyser l'adénosine triphosphate (ATP) conduisant à la génération d'adénosine diphosphate (ADP). Cette aptitude lui permet de réguler son passage spontané d'une forme monomérique globulaire (actine-G) à une forme polymérique filamenteuse (actine-F). Le filament d'actine est polarisé. Il présente une extrémité positive (+) dite en brosse/barbée où l'assemblage des monomères actine G-ATP est rapide et une extrémité négative (-) dite pointue où la dissociation des monomères actine G-ADP se produit (Pollard 2016). La polymérisation d'actine se décompose en trois étapes : (i) la nucléation qui correspond à la formation d'un noyau constitué d'un trimère d'actine globulaire lié à l'ATP. Cette étape est catalysée par des nucléateurs de l'actine parmi lesquels on distingue le complexe Arp2/3, les formines, et les nucléateurs atypiques comme Spire (Baum and Kunda 2005) ; (ii) l'assemblage des monomères d'actine-ATP au noyau formé constitue l'étape d'élongation ; (iii) progressivement, les molécules d'ATP seront hydrolysées favorisant alors le désassemblage des monomères à l'extrémité négative. Il existe un état d'équilibre entre la dissociation et l'association des monomères aux extrémités.

Dans la cellule, la dynamique de l'actine est contrôlée par un vaste nombre de protéines régulatrices, à savoir des protéines de nucléation, des protéines de séquestration des monomères d'actine-G, des protéines de coiffe et des protéines de fragmentation des filaments. Ces protéines collaborent lors des processus de polarisation cellulaire, d'endocytose, de migration cellulaire et de phagocytose. (Figure 12)



**Figure 12 : Vue d'ensemble des protéines de liaison à l'actine.** CPs ; « capping proteins ». Adapté de (Pollard 2016).

Comme mentionné précédemment, la phagocytose est un processus qui nécessite un remodelage du cytosquelette d'actine. La polymérisation d'actine constitue la force motrice qui guide la déformation et l'extension de la membrane plasmique autour de la particule à ingérer. Une inhibition de sa polymérisation par des drogues inhibitrices telles que les cytochalasines, abroge complètement le processus (Zigmond and Hirsch 1972). Cette polymérisation conduit à la formation de structures membranaires appelées pseudopodes qui s'organisent sous la forme d'une coupe phagocytaire. Bien que le processus d'assemblage de l'actine au cours de la phagocytose soit un mécanisme complexe, il peut être décomposé en plusieurs étapes théoriques : (i) le désassemblage de l'actine corticale qui favorise la libération de monomères d'actine-G, ainsi que la mobilité des récepteurs et des enzymes nécessaires au processus ; (ii) la nucléation d'actine pour initier la polymérisation d'actine-F et l'extension des pseudopodes ; (iii) la dépolymérisation de l'actine-F à la base de la coupe phagocytaire.

Dans cette partie, je présenterai les acteurs moléculaires impliqués dans la dynamique de l'actine en aval des récepteurs FcγRs et CR3.

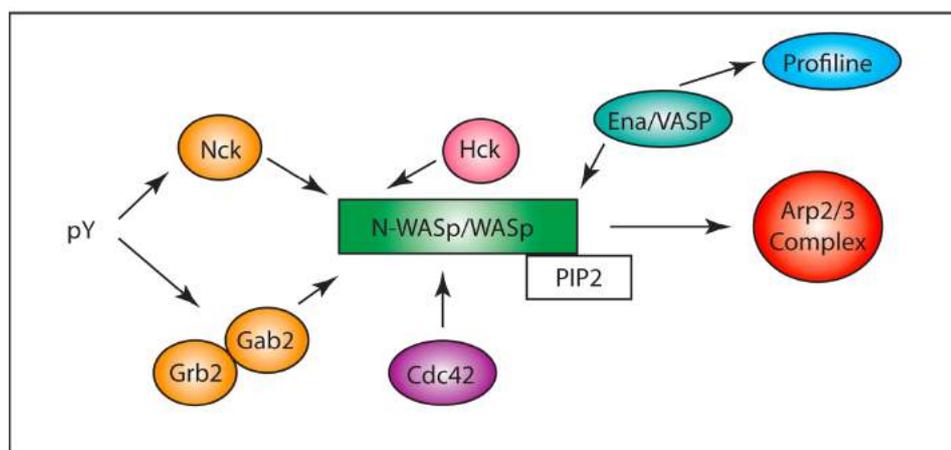
a. Facteurs contrôlant la dynamique de l'actine suite à l'activation des récepteurs FcγRs.

i. Polymérisation d'actine dans les pseudopodes

Suite à l'engagement des récepteurs FcγRs, l'extension de la membrane plasmique est poussée par un réseau d'actine branché généré par le complexe Arp2/3 (May, Caron et al. 2000). Ce complexe est composé de sept sous-unités incluant : ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, Arp2 et Arp3. Sous sa forme inactive, les sous-unités Arp2 et Arp3 du complexe sont maintenues séparées par les autres sous-unités du complexe (Robinson, Turbedsky et al. 2001). Les sous-unités Arp2 et Arp3 sont apparentées à l'actine et leur liaison promeut l'activité de nucléation de l'actine à partir d'un filament préexistant. Ils constituent les premiers éléments du nouveau filament. Cependant, de façon isolée, le complexe Arp2/3 présente une faible activité nucléatrice qui peut être stimulée par des facteurs promoteurs nucléateurs de l'actine (NPFs). Ils rapprochent les sous-unités Arp2 et Arp3 afin de favoriser la formation du noyau de monomères d'actine qui sera à la base d'un filament branché. Il existe une variété de NPFs parmi lesquels on distingue les membres de la famille « Wiskott-Aldrich syndrome » tels que WASP/ N-WASP, WAVE/Scar (« suppressor of cAMP activator ») ; et la cortactine. Toutes ces protéines sont intrinsèquement inactives car leur motif d'interaction avec le complexe Arp2/3 est séquestré par des liaisons intramoléculaires.

L'engagement des récepteurs FcγRs avec la phosphorylation des motifs ITAMs permet le recrutement et l'activation des GTPases Cdc42 et Rac, mais aussi de protéines adaptatrices, comme Nck et Gab2/Grb2 (Gu, Botelho et al. 2003, Dart, Donnelly et al. 2012) (Figure 13). Nck possède un domaine SH2 responsable de sa liaison aux tyrosines phosphorylées, et des domaines SH3 capables de reconnaître les régions riches en proline des protéines WASP/N-WASP. L'inhibition de son expression par ARN interférence dans des macrophages murins immortalisés induit un défaut de la phagocytose et de recrutement de Cdc42 et WASP à la coupe phagocytaire. L'activation de Cdc42, l'accumulation transitoire de PI(4,5)P<sub>2</sub> au site de la phagocytose ainsi que le recrutement des protéines adaptatrices Nck

et Gab2, permettent le recrutement des protéines WASP/N-WASP. L'interaction de WASP/N-WASP avec chacune de ses protéines entraîne un changement de sa conformation conduisant à l'exposition du domaine « verprolin homology, cofilin homology and acidic » (VCA) qui lie et active les sous unités Arp2/3 (Rohatgi, Ho et al. 2000). La phosphorylation de WASP par les protéines de la famille Src notamment Hck contribuent aussi à son activation (Tsuboi and Meerloo 2007). Il a été montré chez des patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich caractérisé par l'absence de la protéine WASP, que la polymérisation d'actine et l'internalisation des particules opsonisées avec des IgG sont altérées (Lorenzi, Brickell et al. 2000).



**Figure 13 : Voie de signalisation aboutissant au remodelage du cytosquelette d'actine en aval du FcγR.** Suite à l'engagement des récepteurs Fcγ, les protéines adaptatrices Nck, Gab2 et Grb2 lient les motifs ITAMs phosphorylés ou Syk pour recruter N-WASp/WASp. WASp est activé par Cdc42, PI(4,5)P2 et par phosphorylation par Hck. Les membres de la famille Ena/VASP interagissent avec WASP et lient la profiline qui participe à la croissance des filaments d'actine. Adapté de (Freeman and Grinstein 2014)

Parallèlement à l'activation de Cdc42, Rac est activée. Cependant, dans les macrophages, le complexe WAVE2, connu pour être un effecteur de Rac, ne semble pas être un régulateur du complexe Arp2/3 au cours de la phagocytose via les FcγR. En effet, dans les macrophages murins RAW264.7, l'expression d'un mutant dominant négatif de WAVE dépourvu de son domaine VCA n'affecte pas l'internalisation de particules (Kheir, Gevrey et al. 2005).

Le rôle de la protéine HS-1 au cours de la phagocytose dépendante du FcγR n'a pas encore été démontré dans les macrophages. Cette protéine homologue de la cortactine exprimée uniquement dans les cellules hématopoiétiques est impliquée dans le contrôle de la présentation des antigènes par les cellules dendritiques (DC) ou encore dans l'activation du complexe Arp2/3 et Rac dans les neutrophiles en réponse à un signal chimio-attractant (Huang, Biswas et al. 2011, Cavnar, Mogen et al. 2012). Elle possède un domaine d'interaction avec le complexe Arp2/3 et une région acide qui lie l'actine-F. HS-1 serait donc un bon candidat impliqué dans la régulation de la polymérisation d'actine dépendante de l'activation de Rac et du complexe Arp2/3 au cours de la phagocytose FcγR. Il a été montré que dans les lymphocytes T issus de cellules déplétées pour HS-1, suite à l'engagement du TCR, un défaut d'accumulation d'actine-F à la synapse immune entraîne sa déstabilisation (Gomez, McCarney et al. 2006). De nombreuses similitudes existent entre la synapse immune et la coupe phagocytaire (Niedergang, Di Bartolo et al. 2016). De plus, HS-1 est un substrat des kinases de la famille Src et Syk, et sous sa forme phosphorylée, elle génère des sites de liaison de haute affinité pour les protéines contenant des domaines SH2. Elle possède aussi un domaine SH3 important pour la liaison de Vav1, la GEF de Rac. Une étude a démontré qu'elle n'est pas impliquée dans la phagocytose du zymosan car dans les cellules dendritiques différenciées issues de souris dépourvues de protéine HS-1, l'efficacité de phagocytose n'est pas modifiée comparée aux cellules témoins (Huang, Biswas et al. 2011). Il serait tout de même très intéressant d'investiguer le rôle de cette protéine dans les macrophages au cours de la phagocytose induite par le FcγR.

D'autres protéines régulent la dynamique de l'actine. En effet, le maintien d'un pool d'actine G-ATP disponible dans la cellule ainsi que le maintien des extrémités positives libres des filaments d'actine permettant l'incorporation de nouveaux monomères, sont contrôlés par des protéines de liaison des monomères d'actine-G, notamment la profiline (Figure 12). Elle est capable de lier l'actine G-ATP à l'extrémité positive des filaments. Elle favorise ainsi leur croissance dans des conditions où la concentration en actine-G-ATP est faible dans la cellule. Le recrutement de la profiline à l'extrémité positive des filaments est dû à son interaction avec les protéines de la famille Ena/VASP (Mena, VASP, Evl). Ces dernières s'associent à l'extrémité barbée et empêchent le positionnement des protéines de coiffe qui

inhibent la polymérisation d'actine. Il a été montré que suite à l'activation des récepteurs FcγRs, les protéines Ena/Vasp interagissent avec WASP et sont recrutées au site de la phagocytose (Figure 13). Son inhibition par l'expression de la protéine ActA de *Listeria monocytogenes*, connue pour déplacer ces protéines de leurs ligands endogènes, entraîne une diminution de l'efficacité d'internalisation des particules opsonisées avec IgG, dans des macrophages murins immortalisés (Coppolino, Krause et al. 2001).

Ensemble, tous ces acteurs moléculaires jouent un rôle important dans la polymérisation de l'actine permettant l'extension des pseudopodes.

## ii. Désassemblage de l'actine-F à la base de la coupe phagocytaire.

Un autre mécanisme est essentiel à l'internalisation efficace d'une particule : le désassemblage de l'actine corticale à la base de la coupe phagocytaire. Cette dépolymérisation peut être due à deux mécanismes : (i) le débranchement; (ii) la coupure des filaments d'actine par des protéines de liaison à l'actine.

- *Rôle des protéines de liaison à l'actine*

La principale protéine de débranchement de l'actine-F identifiée au cours de la phagocytose est la coronine. Cette protéine interagit avec le complexe Arp2/3 et le déstabilise à la jonction entre les filaments d'actine. La famille des coronines est composée de 7 membres, parmi lesquels la coronine 1, qui est recrutée au site de la phagocytose de façon précoce et temporaire dans les macrophages. Son recrutement coïncide avec l'accumulation d'actine dans les pseudopodes. L'expression d'un mutant dominant négatif de la coronine 1 affecte l'adhésion des particules aux macrophages et par conséquent inhibe leur internalisation (Yan, Collins et al. 2005). Cependant des expériences de déplétion de la coronine 1 par ARN interférence contredisent son rôle supposé. En effet aucun impact n'est observé sur l'efficacité de phagocytose dans des macrophages murins immortalisés (Jayachandran, Gatfield et al. 2008). Ce résultat est probablement dû à une activité redondante exercée par d'autres protéines de débranchement.

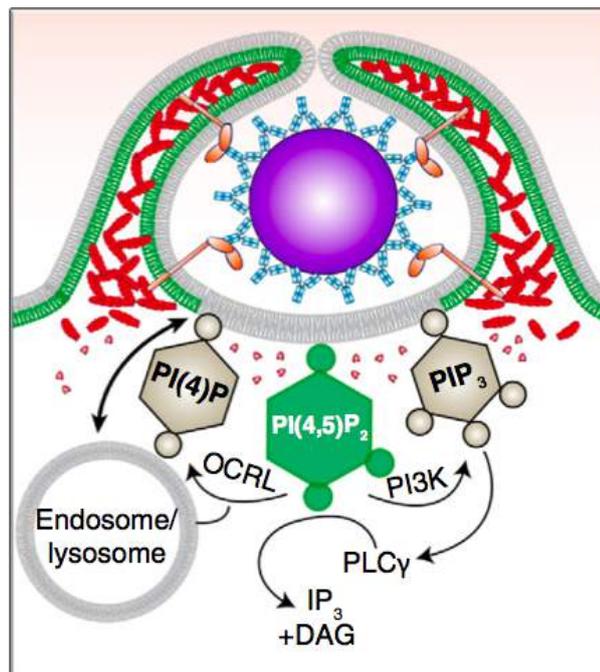
Outre cette protéine de débranchement, des protéines de cassure des filaments d'actine, telles que la gelsoline ou la cofiline, assurent le remodelage du réseau d'actine. Ces protéines génèrent des fragments de filaments, libérant ainsi les extrémités barbées qui sont les sites de nucléation du complexe Arp2/3. L'activité de la cofiline est régulée négativement par sa liaison au PI(4,5)P<sub>2</sub> ou sa phosphorylation par la kinase LIM (Pollard 2016). La gelsoline est à la fois une protéine de coupure et une protéine de coiffe c'est-à-dire capable d'inhiber l'élongation du filament d'actine à l'extrémité barbée. Le rôle de ces protéines au cours du processus de phagocytose n'est pas encore bien compris.

- *Rôle des phosphoinositides et phosphatases*

Le rôle du métabolisme des phosphoinositides dans la régulation de la dépolymérisation de l'actine a été mis en évidence. Une étude de Scott *et al.* rapporte que la dépolymérisation d'actine observée n'est pas due en premier lieu à une inactivation des Rho GTPases Rac et Cdc42, mais plutôt à une hydrolyse du PI(4,5)P<sub>2</sub>. En effet, l'expression de la protéine Rac1 constitutivement active à la membrane plasmique n'empêche pas la dissociation de l'actine des phagosomes. De plus, le suivi de la cinétique de recrutement de l'actine-F et de l'hydrolyse du PI(4,5)P<sub>2</sub>, a montré que l'hydrolyse de PI(4,5)P<sub>2</sub> coïncide avec la disparition de l'actine-F au site de la phagocytose. L'utilisation de drogues inhibitrices de la phospholipase C ou la surexpression des kinases responsables de la synthèse de PI(4,5)P<sub>2</sub> induit une persistance de l'actine-F et une inhibition de l'internalisation (Scott, Dobson et al. 2005). Par conséquent, l'inactivation des Rho GTPases et la disparition de l'actine à la base des coupes phagocytaires peut être directement corrélée avec l'hydrolyse du PI(4,5)P<sub>2</sub>.

Plusieurs voies contribuent à la disparition du PI(4,5)P<sub>2</sub> lors de la formation des phagosomes notamment l'hydrolyse par la phospholipase C<sub>γ</sub> (PLC<sub>γ</sub>), la synthèse de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> par la PI3K, ou encore par l'hydrolyse réalisée par les phosphatases 5-phosphoinositide (OCRL et/ou Inpp5) (Bohdanowicz, Balkin et al. 2012, Levin, Grinstein et al. 2015) (Figure 14). En effet, la production de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> au site de la phagocytose permet le recrutement de Rho GAPs (ARHGAP12, ARHGAP25 et SH3BP1) qui inactivent les GTPases Rac et Cdc42 (Schlam, Bagshaw et al. 2015). Une autre étude originale basée sur l'observation de la formation des phagosomes dans des cellules vivantes par microscopie à

ondes évanescence a révélé que le recrutement d'OCRL au site de la phagocytose en aval des récepteurs FcγRs est étonnamment dépendant du trafic vésiculaire régulé par Bcl10, une protéine appartenant au complexe CBM (CARD9/Bcl10/Malt1) impliqué dans la voie d'activation pro-inflammatoire de NFκB (Marion, Mazzolini et al. 2012). L'inhibition de l'expression de Bcl10 par ARN interférence induit un défaut d'extension des pseudopodes.



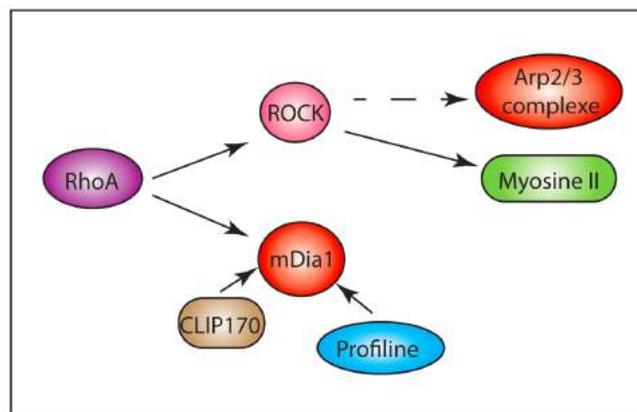
**Figure 14: La disparition de PI(4,5)P<sub>2</sub> de la base des coupes phagocytaires conduit à la dépolymérisation de l'actine-F.** PI(4,5)P<sub>2</sub> est converti par des kinases (PI3K), des phosphatases (OCRL), et des phospholipases (PLCγ). La disparition de la barrière d'actine filamenteuse facilite la livraison de vésicules issues des endosomes et lysosomes au site de la phagocytose. D'après (Levin, Grinstein et al. 2015)

En résumé, la formation des phagosomes en aval des FcγRs nécessite à la fois la polymérisation d'actine-F dans les pseudopodes et sa dépolymérisation à la base de la coupe phagocytaire. Tout ceci s'opère grâce à de nombreux acteurs moléculaires régulés dans l'espace et le temps de façon précise.

b. Facteurs contrôlant la polymérisation de l'actine suite à l'activation des récepteurs CR3.

La polymérisation d'actine en aval des récepteurs au complément CR3 fait intervenir deux types de nucléateurs sous le contrôle de la GTPase RhoA.

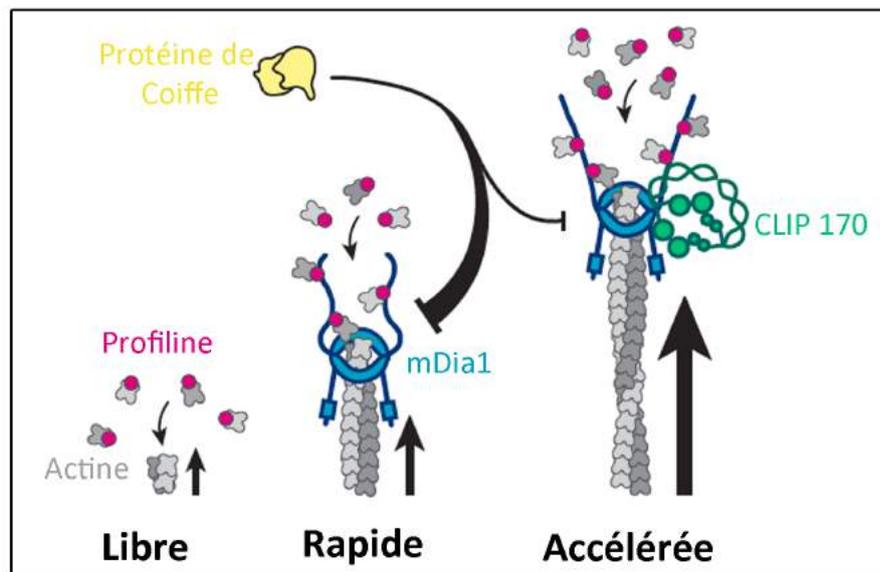
Premièrement, comme dans la phagocytose dépendante des FcγRs, le complexe Arp2/3 est impliqué au cours de la phagocytose initiée par le CR3 (May, Caron et al. 2000). RhoA active son effecteur la Rho-kinase (ROCK) qui a pour cible la chaîne légère de la myosine II. L'utilisation de drogues inhibitrices de ROCK (Y27632) induit une altération l'enrichissement du complexe Arp2/3 et de l'actine-F dans les coupes phagocytaires en formation suite à l'activation du CR3. Le même phénotype est observé avec des inhibiteurs de la myosine II (ML7 et 2, 3-butanedione monoxime) (Olazabal, Caron et al. 2002). Cette dernière, impliquée dans la contractilité cellulaire, se compose de deux chaînes lourdes similaires auxquelles sont associées quatre chaînes légères. Les têtes globulaires motrices présentes sur les chaînes lourdes sont capables d'hydrolyser l'ATP et de se lier à l'actine-F. Les chaînes légères dites régulatrices sont phosphorylées par ROCK, ce qui favorise par la suite la contractilité autour de la particule à internaliser (Figure 15).



**Figure 15 : Voie de signalisation aboutissant au remodelage du cytosquelette d'actine en aval du CR3.** L'engagement du CR3 induit l'activation de la GTPase RhoA qui active la kinase effectrice ROCK et la formine mDia1. Cette dernière interagit avec CLIP170 et la profiline pour stimuler la polymérisation d'actine-F au site de la phagocytose. Les activités du complexe Arp2/3 et de la myosine II sont dépendantes de la kinase ROCK. Inspiré de (Freeman and Grinstein 2014)

Deuxièmement, Rho A active la protéine diaphanous 1 (Dia1 / mDia1 son homologue chez la souris), un nucléateur de l'actine ubiquitaire qui fait partie de la famille des formines (Paul and Pollard 2009). Cette famille se caractérise par la présence de domaines « formin homology » (FH) très conservés capables de lier l'actine. mDia 1 comporte divers domaines dont un domaine de liaison à RhoA (GBD) et deux domaines FH1/FH2. RhoA-GTP active mDia 1 par interruption des interactions intramoléculaires du nucléateur. Alors, mDia1 a la capacité de former de nouveaux filaments fins et droits d'actine-F grâce à son domaine catalytique FH2 de nucléation des monomères d'actine (Watanabe, Kato et al. 1999, Romero, Le Clainche et al. 2004). Les formines sont aussi des protéines de coiffe dites permissives car malgré leur liaison à l'extrémité barbée du filament, elles n'empêchent pas l'addition de monomères. Elles induisent une diminution de la vitesse d'association des monomères mais protègent les extrémités(+) des protéines de coiffe qui inhiberaient la polymérisation d'actine (Zigmond, Evangelista et al. 2003). La formine mDia1 est recrutée au niveau des pseudopodes en formation de façon dépendante de la protéine CLIP-170 (« Cytoplasmic Linker Protein 170 ») associée aux extrémités positives des microtubules. Cette protéine fait partie de la famille des +TIPs (« + Plus-ends Tracking Proteins ») qui interagissent avec l'extrémité positive des microtubules et régulent leur dynamique. En effet des expériences de précipitation à la GST ont montré que CLIP-170 lie directement mDia1 via le domaine FH-2 et contrôle son recrutement à la coupe phagocytaire. Des expériences de siRNA dirigés contre mDia1 montrent un défaut d'accumulation d'actine-F au site de la phagocytose et une diminution de l'efficacité d'internalisation (Colucci-Guyon, Niedergang et al. 2005). Cette étude met en évidence une régulation croisée entre le cytosquelette d'actine-F et le réseau de microtubules au cours de la phagocytose dépendante du CR3. Récemment, une étude *in vitro* révèle un effet de cette coopération entre microtubules et mDia1 sur la fonction des nucléateurs d'actine. En utilisant de la microscopie à ondes évanescentes, les auteurs ont montré qu'une autre protéine de l'extrémité positive des microtubules, EB1, recrute CLIP170 qui à son tour recrute mDia1. La présence de mDia1 et CLIP170 au contact d'actine augmente jusqu'à 18 fois la vitesse de polymérisation d'actine comparée à une situation dans laquelle mDia1 seule est mise au contact de l'actine-F. L'interaction entre CLIP170 et mDia1 dépend des domaines « FEED-like » et FH2 de CLIP170

et mDia1 respectivement. Parallèlement le domaine FH1 de mDia1 lie la profiline associée aux monomères d'actine ce qui accélère davantage le processus de polymérisation (Henty-Ridilla, Rankova et al. 2016, Rottner 2016) (Figure 16).



**Figure 16 : Modèle d'action de CLIP170 et mDia1 à l'extrémité barbée des filaments d'actine en polymérisation**(Henty-Ridilla, Rankova et al. 2016). L'interaction entre CLIP170 et mDia1 augmente le taux d'allongement et la durée de la croissance du filament d'actine en présence de la profiline.

#### 4. Remodelage membranaire au cours de la formation des phagosomes.

Pendant longtemps, il a été supposé que les phagosomes se formaient simplement à partir de la membrane plasmique se fermant autour de la particule à internaliser entraînant alors une diminution de la surface cellulaire. Cependant, des évidences d'un apport membranaire au site de la phagocytose ont été dévoilées par des mesures de capacitance, qui augmente considérablement au cours de l'internalisation de particules opsonisées avec des IgG ou des billes de latex de 3  $\mu\text{m}$ . En effet la capacitance membranaire est proportionnelle à la surface cellulaire. Par conséquent, des changements dans la capacitance membranaire fournissent une information directe et quantitative sur l'insertion ou la perte de membrane. L'augmentation observée au cours de l'internalisation est significative d'une augmentation de la surface membranaire et par extension d'un apport membranaire

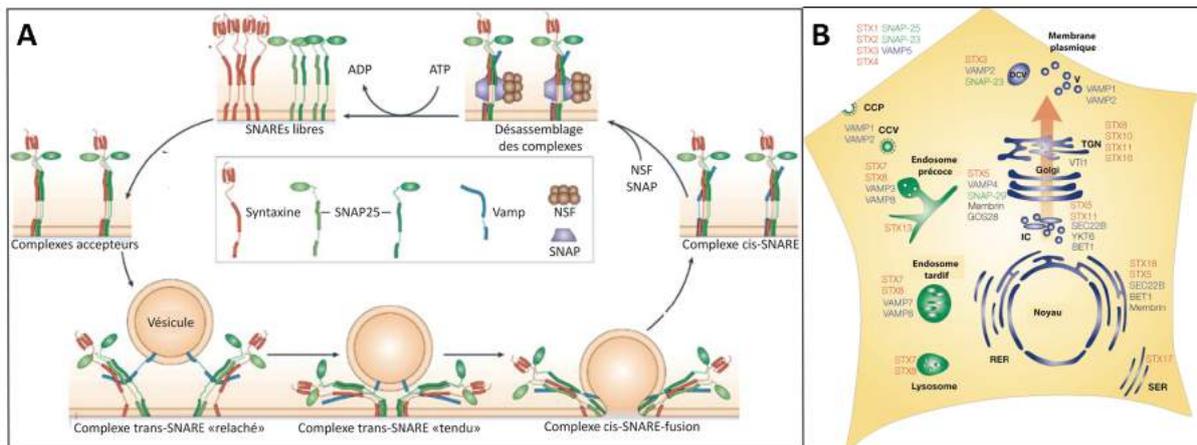
(Holevinsky and Nelson 1998). Bien que la membrane du phagosome provienne majoritairement de la membrane plasmique (Lee, Mason et al. 2007), il a été montré ces dernières années qu'une libération de membranes issues des compartiments intracellulaires participe également à la constitution du phagosome. Ce phénomène est appelé exocytose focalisée par le groupe de Sergio Grinstein (Booth, Trimble et al. 2001). Ces membranes sont de différentes origines et leur recrutement au site de la phagocytose est finement régulé.

#### a. Origine des membranes exocytées

La formation des coupes phagocytaires dépend de l'apport de membranes provenant des compartiments de la voie d'endocytose. Ces compartiments sont souvent définis par les marqueurs moléculaires présents à leur surface notamment les protéines de la superfamille SNARE (« soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor »). Ces protéines sont responsables des événements de fusion entre deux compartiments membranaires. Deux types de SNAREs peuvent être distingués : les v-SNAREs (« vesicle-SNARE ») présentes sur les vésicules de transport et les t-SNAREs (« target -SNAREs ») présentes sur le compartiment cible. On distingue trois familles de SNAREs : Vamp (« vesicle associated membrane protein »), SNAP25 (« 25kDa synaptosomal associated proteins ») et syntaxine. Les v-SNAREs et les t-SNAREs s'associent pour former un complexe SNARE qui favorise l'apposition des membranes des deux compartiments et catalyse leur fusion. Par la suite, ce complexe se dissocie sous l'action d'une protéine ATPase appelé NSF (« N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein ») et son co-facteur SNAP (« soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein ») (Sollner, Whiteheart et al. 1993, Fasshauer, Sutton et al. 1998, Swanton, Bishop et al. 2000). Ainsi les SNAREs sont recyclées et prêtes pour un nouveau cycle (Figure 17).

Plusieurs études ont révélé que les vésicules de recyclages caractérisées par la protéine VAMP3 (« vesicle associated membrane protein 3 ») sont recrutées et exocytées au niveau des coupes phagocytaires (Bajno, Peng et al. 2000). La toxine botulique et la neurotoxine tétanique clivent spécifiquement les protéines SNAREs VAMP2 et VAMP3 et empêchent l'entrée des particules opsonisées avec des IgG ou du complément (Hackam, Rotstein et al. 1998). De façon surprenante, l'internalisation n'est pas affectée dans des

macrophages primaires murins dépourvus de VAMP3 (Allen, Yang et al. 2002). Ceci suggère que d'autres populations vésiculaires ayant des fonctions redondantes participent à la phagocytose dans les macrophages primaires.



**Figure 17 : Mécanisme de fusion des SNAREs et leur localisation subcellulaire.** Les t-SNAREs (SNAP25 et syntaxine) libres vont s'organiser pour former un complexe accepteur qui va interagir avec les v-SNAREs (Vamp). Le complexe trans-SNARE ainsi formé passe d'une forme relâchée à tendue permettant la formation d'un pore de fusion. Ce complexe SNARE de fusion se compose de 4 domaines en hélice (deux hélices SNAP25, une hélice syntaxine, une hélice Vamp). (B) A l'équilibre, les v-SNAREs et t-SNAREs sont spécifiquement localisés à la surface des compartiments intracellulaires. STX : syntaxine, CCV : vésicules couvertes de clathrine, RER : réticulum endoplasmique rugueux, RES : réticulum endoplasmique lisse, DCV : vésicule à corps dense, IC : compartiments intracellulaires, TGN : réseau transgolgien, V : vésicule. Modifié à partir de (Chen and Scheller 2001, Jahn and Scheller 2006)

L'exocytose de vésicules issues des endosomes tardifs caractérisés par la protéine VAMP7/Ti-VAMP est également requise pour une internalisation efficace. Virginie Braun et ses collègues ont démontré que la protéine VAMP7 est recrutée à la coupe phagocytaire suite à la protéine VAMP3. Son inhibition par ARN interférence ou par surexpression de son domaine auto-inhibiteur induit l'arrêt de la phagocytose dépendante des récepteurs FcγRs et CR3. (Braun, Fraisier et al. 2004).

Des vésicules provenant d'endosomes et de granules spécialisés sont elles aussi importantes pour l'extension des pseudopodes. En effet le complexe AP-1 (« adaptor protein-1 ») localisé sur des vésicules de recyclage partiellement colocalisées avec VAMP3 est recruté sous la coupe phagocytaire. AP-1 est initialement connu pour son rôle dans le

contrôle du bourgeonnement des vésicules couvertes de clathrine intracellulaire. La clathrine, quant à elle, n'est pas recrutée au site de la phagocytose, de même que l'adaptateur AP-2 (Tse, Furuya et al. 2003, Braun, Deschamps et al. 2007). L'inhibition de l'expression du complexe AP-1 bloque la phagocytose Fc $\gamma$ R de 50% ce qui en fait un régulateur majeur de la phagocytose induite par les Fc $\gamma$ R.

L'implication du réticulum endoplasmique comme source de membrane exocytée a provoqué des débats houleux. Une étude de Michel Desjardins et ses collègues, dans la lignée de macrophages murins J774.4, montre la fusion directe du réticulum endoplasmique (RE) et des phagosomes en formation avec plusieurs types de particules (billes de latex, bactéries, parasites ou particules opsonisées). Une approche protéomique à partir de phagosomes purifiés à différents temps de phagocytose a mis en évidence la présence de deux protéines du réticulum endoplasmiques, calréticuline et calnexine (Gagnon, Duclos et al. 2002, Desjardins 2003). Cependant, dans une autre lignée cellulaire de macrophages murins RAW264.7, aucun recrutement de marqueurs du réticulum endoplasmique n'est observé au niveau des coupes phagocytaires en formation autour de billes de latex (Henry, Hoppe et al. 2004). Une étude du groupe de James Rothman a montré que l'apport membranaire du réticulum endoplasmique est important pour l'internalisation de larges particules (3  $\mu$ m) et non pour les petites (0,8  $\mu$ m) dans les macrophages J774.4. L'inhibition par un anticorps bloquant d'une SNARE du réticulum endoplasmique ERS24/Sec22 induit une diminution de la phagocytose sans l'abolir totalement. Ceci suggère que les membranes proviennent certainement du réticulum endoplasmique lorsque la demande en membranes excède la capacité des autres sources (Becker, Volchuk et al. 2005). La syntaxine 18 caractéristique du RE est également recrutée au cours de la formation du phagosome. Son inhibition par ARN interférence ou sa surexpression dans les macrophages J774.4 induit respectivement une diminution ou une augmentation de l'efficacité de phagocytose (Hatsuzawa, Tamura et al. 2006).

Des études ont également mis en évidence le recrutement de membranes issues des endosomes tardifs/lysosomes. Ce recrutement est dépendant du calcium, du canal calcique ML-1/TRPML et d'un senseur calcique la synaptotagmine VII. Cette dernière régule l'arrimage des vésicules avec les protéines SNAREs TI-VAMP et favorise la fusion des

membranes. La déplétion de ML-1 ou de la synaptotagmine VII induit une inhibition de l'efficacité de phagocytose (Czibener, Sherer et al. 2006, Samie, Wang et al. 2013). Du fait des éléments délétères contenus dans les lysosomes, il serait intéressant d'étudier le contenu enzymatique des vésicules ML-1 ou synaptotagmine VII positives délivrées au site de la phagocytose.

En résumé, le phagosome en formation est un véritable organite « mosaïque » qui fait appel aux compartiments intracellulaires pour sa composition. Cependant ces vésicules permettent également l'apport de molécules de signalisation régulant le processus ou participant à la réponse inflammatoire (Marion, Mazzolini et al. 2012). Cette exocytose focalisée est visualisée à la base de la coupe phagocytaire où le réseau d'actine est moins dense et se dépolymérise.

#### **b. Régulateurs du trafic vésiculaire au cours de l'exocytose focalisée.**

Le trafic vésiculaire est régulé par des petites protéines G des familles Rab et ARF (« ADP-ribosylation factor ») qui font partie de la superfamille des Ras. Les protéines Rabs permettent l'amarrage spécifique des vésicules sur leur compartiment cible où elles interagissent avec les SNAREs. Les protéines ARF modulent la composition lipidique des membranes, régulent leur trafic et interagissent avec d'autres protéines G (Chavrier and Goud 1999, Donaldson and Jackson 2011).

Dans les macrophages murins, la protéine Rab11 se trouve sur les endosomes de recyclage et colocalise avec le récepteur de la transferrine. Son recrutement au site de la phagocytose a été observé par microscopie électronique. L'expression de sa forme mutée (Rab11<sub>25N</sub>) induit une inhibition de 50% de l'efficacité de phagocytose et du recyclage de la transferrine (Cox, Lee et al. 2000). Rab11 permet donc la mobilisation des vésicules de recyclage au cours de la phagocytose.

La GTPase ARF6 est activée de façon transitoire une fois le processus de phagocytose déclenché. Elle présente un pic d'activation maximal au bout de 10 min de phagocytose, ce qui suggère son implication durant l'étape d'internalisation. L'expression du mutant ARF6<sub>T27N</sub> dominant négatif inhibe la phagocytose de 80%. Cette expression induit également une

inhibition du recrutement de VAMP3 à la coupe phagocytaire mais non de la polymérisation d'actine (Niedergang, Colucci-Guyon et al. 2003). Sa cinétique d'activation est similaire à celle observée pour Cdc42 et apparaît après l'activation de Rac.

Comme décrit précédemment, le complexe AP-1 est recruté au site de la phagocytose. Son association à la membrane est régulée par la protéine ARF1. Cette dernière est aussi activée transitoirement au cours de l'internalisation de particules opsonisés avec des IgG (Braun, Deschamps et al. 2007). Une étude du groupe de J.Swanson a rapporté que l'activation de ARF1 et ARF6 au site de la phagocytose était insensible à la bréfeldine A (BFA), drogue connue pour inhiber ARF-1 à la membrane de l'appareil de Golgi, ce qui indique que ARF1 et AP1 proviennent d'autres compartiments (Beemiller, Hoppe et al. 2006). L'inhibition de ARF1 conduit à un défaut de recrutement du complexe AP-1 au site de la phagocytose FcγRs.

Au delà de réguler le métabolisme des phosphoinositides nécessaire aux cycles de polymérisation-dépolymérisation de l'actine au site de la phagocytose, la PI3K semble réguler également l'apport de membranes. L'inhibition de son activité par la wortmanine entraîne une diminution du recrutement de la protéines VAMP3, un marqueur des endosomes de recyclages (Niedergang, Colucci-Guyon et al. 2003). Cependant une étude menée par Di et al révèle qu'en présence de wortmannine, l'augmentation de la capacitance des cellules habituellement observée lors de la phagocytose, n'est pas inhibée. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que les vésicules de recyclages VAMP3 positives ne sont pas l'unique source de membrane au site de la phagocytose.

## **5. Contractilité et fermeture des phagosomes.**

- *Les myosines : activité contractile à la coupe phagocytaire*

Au cours de la formation des coupes phagocytaires, des forces s'appliquent afin de permettre l'extension membranaire mais aussi la compression d'une particule de grande taille dans un compartiment clos. La superfamille des myosines génère des forces contractiles utiles à la formation des phagosomes. Ces moteurs moléculaires sont au nombre de 40 chez la souris et l'homme. Les myosines se composent de deux chaînes lourdes et d'un

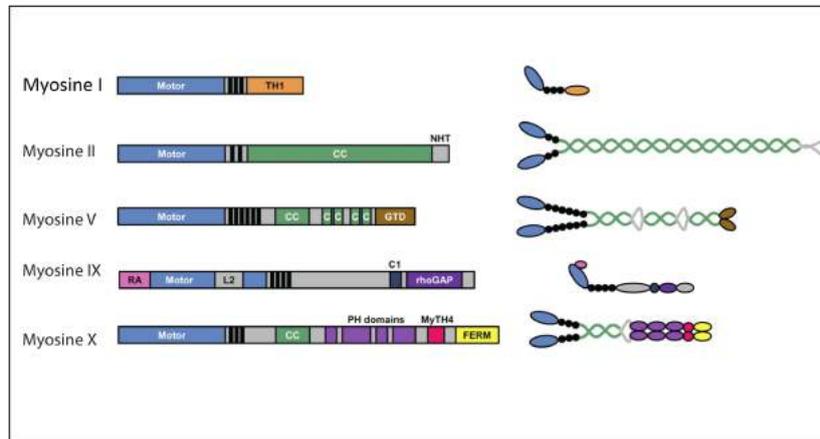
nombre variable de chaînes légères. La myosine II fut la première à être décrite notamment dans la contraction musculaire. Elle est constituée de deux chaînes lourdes qui possèdent une tête globulaire motrice capable d'hydrolyser l'ATP et de lier l'actine, et de quatre chaînes légères. Les hélices  $\alpha$  des deux chaînes lourdes s'enroulent pour former une super hélice capable de se lier aux hélices  $\alpha$  d'autres myosines. Ainsi des filaments épais peuvent être formés. Plusieurs myosines non conventionnelles existent. Parmi elles, la myosine I qui possède une unique chaîne lourde avec un domaine de liaison à l'actine sur sa région en hélice. Elle fonctionne en tant que monomère et ne forme pas de filaments. Elle est connue pour réguler le transport intracellulaire et le cytosquelette. La myosine X, également non conventionnelle, possède trois domaines PH dont le second est capable de lier le  $PI(3,4,5)P_3$ .

De nombreuses myosines sont recrutées au site de la phagocytose dépendante du  $Fc\gamma R$  particulièrement les myosines I, II, IX et X (Figure 18-19).

L'inhibition de la myosine II par une drogue inhibitrice de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) ML-7 perturbe la fermeture des coupes phagocytaires sans altérer la polymérisation d'actine dans les macrophage mis au contact de particules opsonisées avec des IgG. Les coupes observées par microscopie électronique à balayage suite à cette inhibition présentent une conformation très ouverte et large comparé à la condition témoin ou aux coupes phagocytaires en formation inhibée par l'inactivation de la PI3K par la wortmannine. Ces résultats suggèrent donc que la myosine II est requise pour son activité contractile au cours de l'extension des pseudopodes. La myosine II est également importante au cours de la phagocytose induite par le CR3 (Diakonova, Bokoch et al. 2002, Olazabal, Caron et al. 2002, Araki, Hatae et al. 2003). La myosine IX est recrutée en même temps que la myosine II et pourrait aussi être impliquée dans l'activité contractile de la coupe phagocytaire. Cependant son rôle fonctionnel reste à élucider.

Le recrutement de la myosine X au site de la phagocytose est dépendant de la PI3K. Sa surexpression sous forme tronquée conduit à un défaut d'internalisation de billes de latex de 6  $\mu m$ . Dans un modèle de phagocytose frustrée où les cellules sont déposées sur une surface couverte d'IgG, l'inhibition fonctionnelle de la myosine X limite l'extension des pseudopodes mais non l'adhésion des cellules. Par conséquent, la myosine X semble être

impliqué dans l'extension maximale des pseudopodes aboutissant à la fermeture des phagosomes (Cox, Berg et al. 2002).



**Figure 18 : Représentation des domaines des myosines impliquées au cours de la phagocytose.** (A) Structure des domaines constituant les chaînes lourdes. « Motor » : tête globulaire catalyse l'ATP ; « CC » (coiled-coil) : domaine d'interaction des hélices  $\alpha$  ; « GTD » (Globulaire tail domain) : domaine impliqué dans le transport de cargo ; « rhoGAP » : domaine catalytique d'hydrolyse du GTP ; « RA » (Ras associating domain) ; « PH » (Pleckstrin homology) : domaine d'interaction avec les phospholipides ; « FERM » (4.1, ezrine, radixine, moesine) : domaine d'interaction avec les phospholipides ; « MyTH4 » (myosin talin homology) : domaine d'interaction avec des protéines de transport. (B) Représentation schématique de la structure des myosines. Adapté de (Maravillas-Montero and Santos-Argumedo 2012)

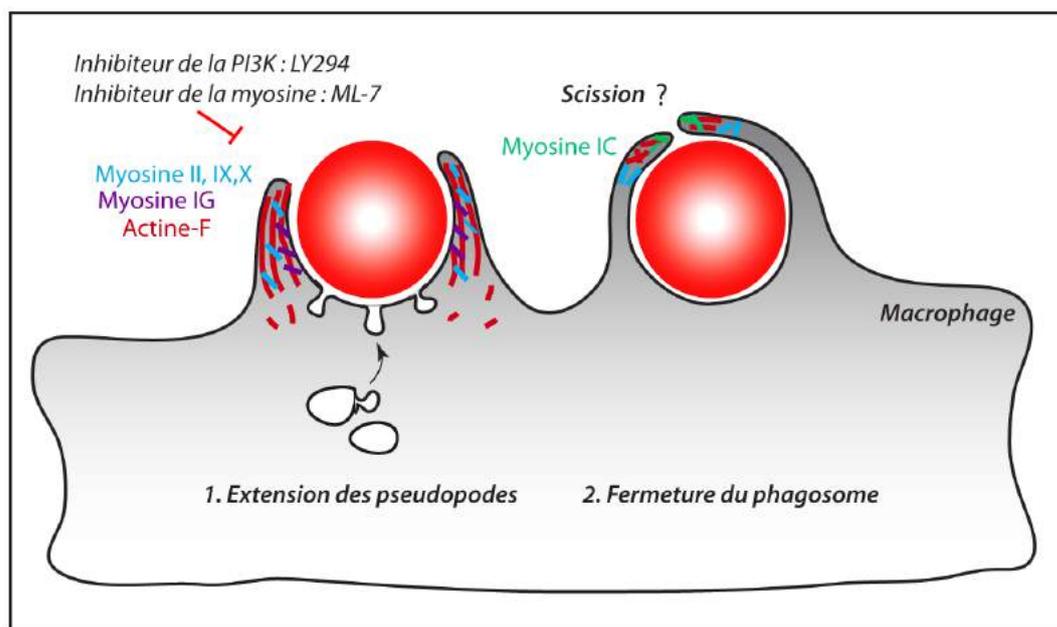
La myosine I, quant à elle, semble plus impliquée durant l'étape de fermeture des phagosomes. La myosine IC se concentre à l'extrémité des pseudopodes au moment de la fermeture des phagosomes dans les macrophages murins internalisant des particules couvertes d'IgG. Elle apparaît peu de temps après la myosine II au site de la phagocytose. Sa fonction est dépendante de l'activité de la PI3K contrairement à la myosine II (Araki, Hatae et al. 2003). La myosine IG est également recrutée au site de la phagocytose induite par le Fc $\gamma$ R en aval de la PI3K. Elle permet le lien entre les phospholipides et le réseau d'actine-F à la coupe phagocytaire (Dart, Tollis et al. 2012).

- *Fermeture des phagosomes*

La fermeture des coupes phagocytaires se caractérise par la fusion des pseudopodes suivie de la scission du phagosome libéré dans le milieu intracellulaire. Au début de mon

projet de thèse, la fermeture des phagosomes était une étape peu renseignée car l'observation d'une coupe phagocytaire bloquée juste au moment de la fermeture était très difficile. Une étude du groupe de Martin Howard sur la mécanistique de croissance des coupes phagocytaires montre qu'il existe un point critique d'extension de la membrane qui va aboutir à la fermeture du phagosome (van Zon, Tzircotis et al. 2009). Ce point critique dépend du rayon de la particule et de la taille de la coupe phagocytaire. Si une cellule dépasse ce point critique d'extension correspondant généralement à la région équatoriale de la particule, elle aboutira à la fermeture totale du phagosome. En revanche en dessous de ce point la coupe phagocytaire est abortive. Cela révèle la difficulté de bloquer la coupe phagocytaire au moment de la fermeture pour observer les protéines impliquées. En effet l'inhibition de l'extension des coupes phagocytaires, par des drogues ciblant les principaux acteurs (PI3K, myosine II, VAMP3/7, AP1) du processus sont souvent visibles sous la forme de pseudopodes ne dépassant pas la région équatoriale de la particule (Swanson, Johnson et al. 1999, Diakonova, Bokoch et al. 2002, Niedergang, Colucci-Guyon et al. 2003, Braun, Deschamps et al. 2007). De plus, la préparation des échantillons pour la visualisation des coupes phagocytaires par microscopie photonique ou électronique nécessite souvent des fixateurs qui pourraient stopper l'activité contractile requise pour la fermeture et entraîner la rétractation des coupes pseudopodes sur le point de fusionner. Swanson *et al* ont étudié la contractilité associée au moment de la fermeture des phagosomes. Ils ont mis au point un système dans lequel ils observent, par vidéomicroscopie, deux macrophages en compétition pour internaliser un globule rouge (GR) déformable opsonisé avec des IgGs. Ils visualisent l'accumulation de l'actine-F à l'extrémité des pseudopodes mais aussi dans la région de constriction du GR. Cette contractilité disparaît lors du traitement des macrophages avec la wortmannine, drogue inhibitrice de la PI3K. La contractilité au site de fermeture semble être due à l'actine et la myosine IC concentrées à cet endroit (Swanson, Johnson et al. 1999). De plus même une étude chez *Dictyostelium* rapporte que les protéines myosine I, actine-F, Arp2/3 et myosine II s'organisent de manière circulaire et concentrique au niveau du cou d'étranglement permettant la fermeture du phagosome et l'internalisation complète de levures (Dieckmann, von Heyden et al. 2010). Toutes ces études révèlent le rôle primordial du réseau d'actine-myosine au moment de la fermeture des phagosomes. Il permet la

proximité des membranes et leur fusion. Cependant la libération du phagosome dans le milieu intracellulaire nécessite la scission du cou du phagosome. Les acteurs moléculaires impliqués au cours de cette étape n'étaient pas bien connus jusqu'au travail que j'ai effectué au cours de mon doctorat. Celui-ci est axé sur la dynamine, une GTPase bien connue pour son activité de scission des vésicules d'endocytose. Ses fonctions et plus particulièrement son rôle au cours de la phagocytose seront détaillés dans le chapitre 2.



**Figure 19 : Myosines et Actine-F au cours de la formation et fermeture des coupes phagocytaires.** La contractilité nécessaire à l'internalisation de larges particules est générée sous l'action de différentes myosines notamment II, IX, X, IG au cours de l'extension des pseudopodes et IC au moment de la fermeture des phagosomes. Ces myosines sont dépendantes de l'activité de la PI3K. Le mécanisme de scission des phagosomes était méconnu. Ce schéma reprend les résultats publiés dans (Swanson, Johnson et al. 1999, Cox, Berg et al. 2002, Diakonova, Bokoch et al. 2002, Olazabal, Caron et al. 2002, Dart, Tollis et al. 2012)

## 6. Maturation des phagosomes

L'internalisation d'une particule de grande taille conduit à la formation d'un compartiment clos appelé phagosome. Ce compartiment mature dans le milieu intracellulaire grâce à sa migration, en mouvement centripète, le long des microtubules.

Parallèlement, des événements de fusion et de fission le long de la voie d'endocytose se produisent. Cette maturation aboutit à la formation d'un compartiment dégradatif appelé phagolysosome, qui se caractérise par un faible pH, la présence d'hydrolases et des ions superoxydes. La particule ingérée est alors dégradée sous l'effet de ces molécules et de son environnement acide. La maturation se définit par plusieurs stade : phagosome précoce, phagosome tardif, phagolysosome (Figure 20) (Niedergang 2016) .

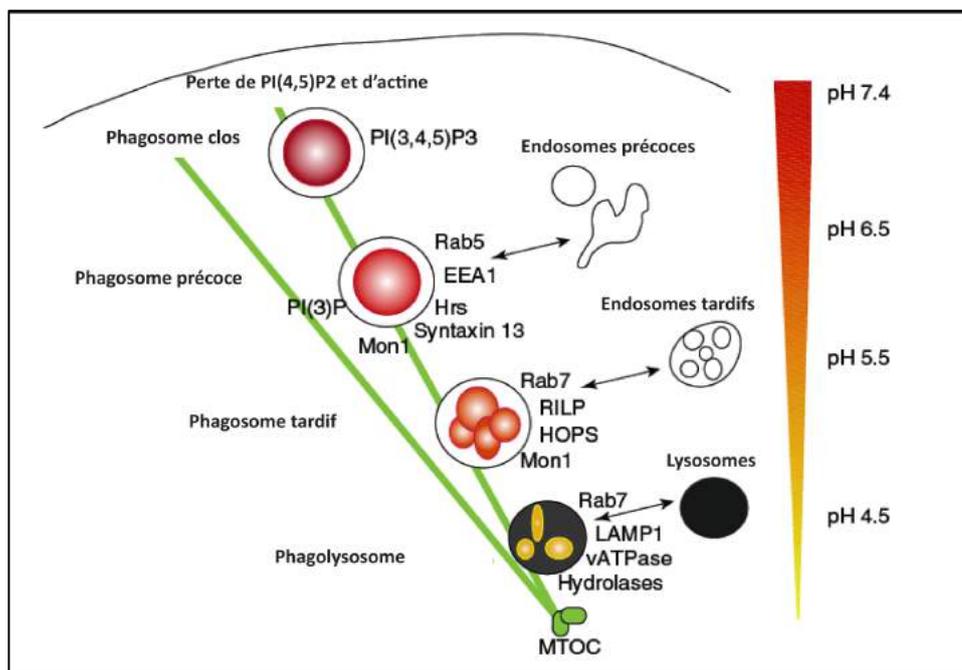


Figure 20 : La maturation des phagosomes. Adapté de (Niedergang 2016)

### a. Le phagosome précoce

Suite à son internalisation, la métamorphose du phagosome commence immédiatement. Le phagosome précoce est similaire à l'endosome précoce. Il possède un pH de 6,1-6,5 et présente les marqueurs classiques des endosomes précoces, Rab5 et son effecteur EEA1 (« early endosome antigen 1 »). Rab5 coordonne le trafic endocytique et la biogenèse du phagosome précoce. Le mécanisme de son recrutement à la membrane phagosomale reste évasif mais sa présence est absolument requise pour la poursuite de la maturation. Les

travaux de Vieira *et al* montre que l'utilisation d'un mutant dominant négatif de Rab5 entraîne un défaut d'acquisition de son effecteur EEA1 et d'un marqueur caractéristique du phagolysosome LAMP1 (« lysosome-associated membrane protein-1 ») (Vieira, Bucci et al. 2003). Rab-5 exerce ses effets en recrutant EEA1, le complexe p150-Vps34, et les SNAREs.

La Sérine/thréonine kinase p150 permet le recrutement d'une PI3K de classe III, Vps34, sur les endosomes précoces Rab5 positifs. Cette dernière permet la génération de PI3P qui sera alors reconnu par des protéines possédant un domaine FYVE ou PX. L'inhibition de l'activité kinase de Vps34 bloque la maturation des phagosomes (Araki, Johnson et al. 1996, Vieira, Botelho et al. 2001). L'accumulation de PI3P à la membrane phagosomale permet le recrutement de la sous-unité p40 de la NADPH oxidase, de la protéine EEA1, et du facteur Hrs (« hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate »). La protéine EEA1 favorise l'ancrage et la fusion des endosomes précoces. Elle interagit directement avec la SNARE syntaxine 13 à la membrane du phagosome, ce qui stimule les événements de fusion entre les compartiments.

### b. Le phagosome tardif

Le passage d'un phagosome précoce à un phagosome tardif se caractérise par l'acquisition du marqueur des endosomes tardifs Rab7 et la perte de Rab5. Le phagosome tardif devient plus acide (pH 5,5-6,0) grâce à l'acquisition de la pompe à protons V-ATPase (« vacuolar ATPase ») qui favorise l'accumulation des protons H<sup>+</sup> dans le phagosome au détriment de l'ATP.

La transition de Rab5 à Rab7 est contrôlée par la protéine Mon1 effectrice de Rab5. Mon1 sur le phagosome précoce induit le recrutement de la protéine de liaison à Rab7, Ccz. Ainsi Ccz capture Rab7-GDP inactive (Kinchin and Ravichandran 2010, Nordmann, Cabrera et al. 2010, Poteryaev, Datta et al. 2010). Ce complexe Mon1/Ccz a la capacité de déplacer la GEF de Rab5, Rabex-5 et interagit directement avec le complexe HOPS (« Homotypic fusion and protein sorting »).

Lors d'expériences chez la levure, le complexe protéique appelé HOPS a été identifié comme régulateur de l'activation de Rab7 et participe également à la conversion Rab5-

Rab7(Rink, Ghigo et al. 2005). Le complexe HOPS est constitué d'un core protéique, incluant Vps21, Vps16, Vps18 et Vps33, attaché à la vacuole et s'associe avec des protéines accessoires possédant une activité GEF pour Rab7, Vps 41 et Vps39.

Tout comme Rab5 sur les phagosomes précoces, l'inhibition de Rab-7 par surexpression d'un mutant dominant négatif dans une lignée de macrophages murins induit un arrêt de la maturation caractérisé par une absence d'acidification du phagosome (Harrison, Bucci et al. 2003). Des effecteurs de Rab7 sont recrutés sur le phagosome tardif. C'est le cas notamment des protéines adaptatrices (RILP, ORPL1) pour la dynéine, un moteur moléculaire des microtubules responsable du transport de cargos de l'extrémité négative à l'extrémité positive des microtubules(Johansson, Rocha et al. 2007).

Les phagosomes tardifs sont également enrichis en protéine LAMP1 (Lysosome-associated membrane protéine 1) connu pour maintenir l'intégrité des endosomes tardifs et jouer un rôle également dans la maturation du phagosome. En effet des cellules déficientes pour LAMP1/2 sont incapables de digérer des bactéries *Neisseria gonorrhoeae* (Binker, Cosen-Binker et al. 2007, Huynh, Eskelinen et al. 2007).

### c. Le phagolysosome

Le phagosome mature peut digérer des protéines, des lipides et des carbohydrates par des mécanismes que je ne détaillerai pas ici. En bref, la fusion du phagosome tardif avec les lysosomes conduit à l'acquisition de tous les facteurs microbicides. Cette fusion est permise en particulier grâce à l'interaction entre les SNAREs : VAMP7 et syntaxine 7. Le phagolysosome présente un pH de 4,5-5,0 ce qui favorise l'activité des hydrolases telles que les cathepsines qui sont enrichies dans le phagolysosome. De plus la présence de la pompe NADPH oxydase NOX2 et de l'enzyme iNOS (« inducible nitric oxide synthase ») sur le phagolysosome conduit à la synthèse d'espèces réactives oxygénées et d'oxyde nitrique respectivement (Savina and Amigorena 2007, Flannagan, Jaumouillé et al. 2012). Ces molécules sont très délétères pour les protéines cellulaires, les lipides et les acides nucléiques. L'environnement ainsi créé au sein du phagosome induit l'élimination de la particule telles que les débris cellulaires ou les microorganismes.

#### d. Activation des macrophages et présentation antigénique.

Suite à la digestion d'un pathogène, les macrophages peuvent présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4+ (LT CD4+). Bien qu'ils ne soient pas considérés comme les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) les plus puissantes, les macrophages expriment à leur surface les molécules de CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II). Ce complexe est constitué de deux chaînes polypeptidiques transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$ , chacune possédant deux domaines « immunoglobuline like » ( $\alpha$ 1-  $\alpha$ 2 et  $\beta$ 1-  $\beta$ 2). Les domaines  $\alpha$ 1- $\beta$ 1, lient ensemble un peptide antigénique, issu de la dégradation par les hydrolases (Germain 1994, Castellino, Zhong et al. 1997). Une étude de Ramachadran *et al* utilisant des phagosomes extraits des macrophages murins chargés avec des billes de latex conjuguées avec de l'ovalbumine, montre que le complexe CMH-II est présent à la surface des phagosomes et que le chargement se fait au sein du phagosome. Le CMH-II colocalise avec la protéine LAMP1 et provient de la fusion entre le phagosome et les compartiments de la voie d'endocytose (endosomes tardif, corps multivésiculaires (MVB), lysosomes) qui contiennent un pool de molécules de CMHII (Mantegazza, Magalhaes et al. 2013). Parallèlement, les cellules présentatrices d'antigènes peuvent activer les lymphocytes T CD8+ grâce à la présentation croisée. (Ackerman, Kyritsis et al. 2003, Guernonprez, Saveanu et al. 2003, Houde, Bertholet et al. 2003).

Outre la présentation antigénique, les macrophages activés induisent le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires (cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes T, les cellules NK (« natural killer »), macrophages) par le biais des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qu'ils sécrètent. En effet, certains récepteurs phagocytaires activés induisent d'une part la formation des phagosomes et d'autre part des cascades de signalisation variées qui aboutissent à une réponse inflammatoire du macrophage. Par exemple, l'engagement des récepteurs Fc $\gamma$  ou Dectine-1 induit le recrutement de la kinase Syk qui stimule, en parallèle, le recrutement des Rho-GTPases (Rac et Cdc42) impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine et le recrutement du complexe CARD9-Bcl10-Malt1 impliqué dans l'activation des voies MAPK (« mitogen-activated protein kinases ») et NF $\kappa$ B qui conduisent à la transcription de gènes codant pour les cytokines et chimiokines

produites (Moretti and Blander 2014). De plus, les TLRs engagés par des agents microbiens durant la phagocytose contribuent eux aussi à l'activation des voies NFκB, MAPK et d'autres facteurs de transcription conduisant à une réponse inflammatoire. Ils participent également à la maturation des phagosomes grâce à la production de signaux qui favorisent l'assemblage de la NADPH oxydase, NOX2, et de la v-ATPase. Les voies et les mécanismes associés à la production des cytokines et chimiokines ne seront pas détaillés dans le présent manuscrit.

## **7. Phagocytose FcγR et CR3: deux types de phagocytose différentes mais interdépendantes.**

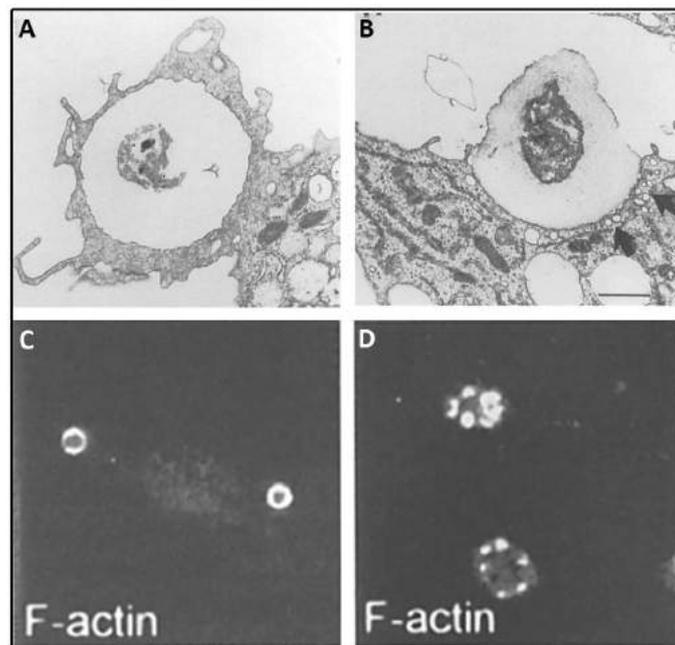
### **a. Différences de morphologies des coupes phagocytaires**

Les phagocytoses dépendantes du FcγR ou du CR3 aboutissent toutes deux à la polymérisation d'actine, mais font intervenir divers acteurs moléculaires (Figure 22). Ceci induit la formation de coupes phagocytaires qui semblent présenter des morphologies différentes. Le premier à observer ces différences par microscopie électronique est Kaplan en 1977. En effet, il décrira que les macrophages mis au contact de globules rouges opsonisés avec des IgG forment de larges protrusions membranaires autour de la particule à internaliser, tandis que ceux mis au contact de globules rouges opsonisés avec des IgM et du complément n'en font pas. Dans ce dernier cas, la particule semble « tomber » dans la cellule (Kaplan 1977). Par la suite Allen *et al* mettront en évidence que ces différences de structures sont dues à la mise en jeu d'acteurs moléculaires différents. Au cours de la phagocytose FcγR, les protéines impliquées telles que le nucléateur d'actine Arp2/3, l'actine-F et ses protéines de liaison (vinculine, α-actinine) forment toutes un anneau circulaire continu au site de la phagocytose (Figure 21 A-C). En revanche au cours de la phagocytose dépendante du CR3, les protéines sont détectées sous forme de « foci » autour de la particule en cours d'internalisation (Figure 21 B-D).

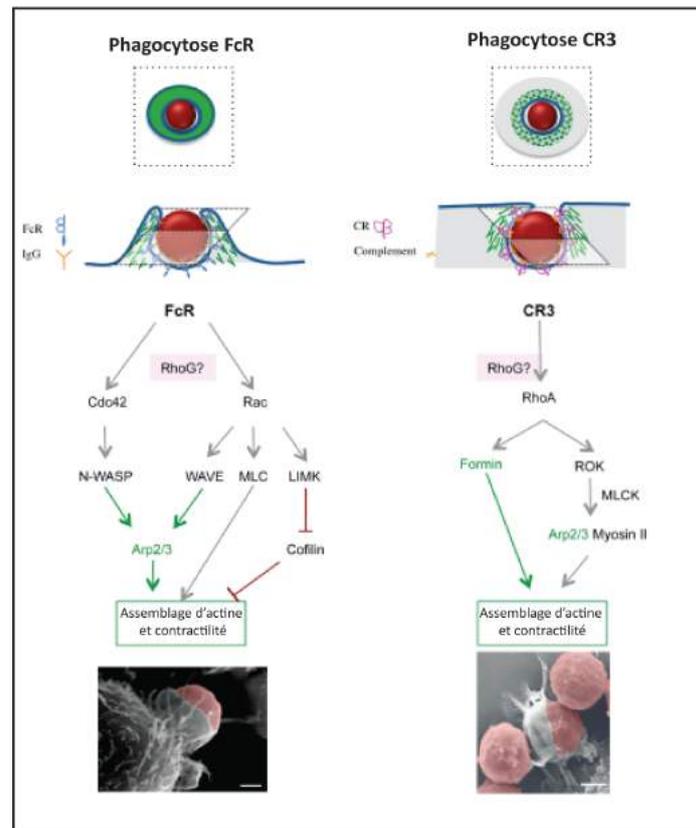
Ces différences dans l'organisation du réseau d'actine pourraient peut-être s'expliquer par la différence entre les nucléateurs d'actine mis en jeu : Arp2/3 et mDia1. En effet, dans la phagocytose dépendante du FcγR seul Arp2/3 a été rapporté comme requis

pour la formation d'un réseau branché d'actine. En revanche, dans la phagocytose dépendante du CR3, les nucléateurs Arp2/3 et Dia1, connu pour la formation de filaments droits, sont tous deux requis pour le remodelage d'un réseau d'actine nécessaire à une phagocytose efficace. Cependant, plus récemment, une étude de microscopie électronique à transmission dans des macrophages péritonéaux de souris a montré que les phagocytoses CR3 et Fc $\gamma$ R induisent des pseudopodes qui s'étendent autour des particules opsonisées et que des « ruffles » membranaires se forment également suite à l'activation du CR3 (Hall, Gakidis et al. 2006, Patel and Harrison 2008).

L'étude de l'organisation tridimensionnelle de ces différents réseaux ainsi que les forces mécaniques qui s'appliquent lors de la formation des coupes phagocytaires seraient d'un très grand intérêt.



**Figure 21 : Différences morphologiques des coupes phagocytaires induites par les Fc $\gamma$ R et CR3** (Allen and Aderem 1996). (A-B) Sections de cryo-microscopie électronique de macrophages péritonéaux de souris mis au contact de zymosan opsonisés par des IgG (A) ou du complément (B) durant 2 min à 37°C. Dans le cas de la phagocytose Fc $\gamma$ R, les pseudopodes entourent de façon continue la particule. En revanche dans le cas de la phagocytose CR3, les extensions membranaires sont moins visibles. Barre d'échelle 1  $\mu$ m. (C-D) Photos de microscopie à fluorescence des macrophages péritonéaux de souris mis au contact de billes opsonisées avec des IgG (C) ou du zymosan opsonisé avec du complément (D) durant 3min à 37°C. L'actine-F est enrichie sous forme d'un anneau continu dans le cas de la phagocytose Fc $\gamma$ R et sous forme de « foci » dans le cas de la phagocytose CR3. Les flèches en B indiquent des vésicules directement sous la coupe phagocytaire induite par le CR3 qui sont absentes sous les coupes phagocytaires dépendantes du Fc $\gamma$ R.



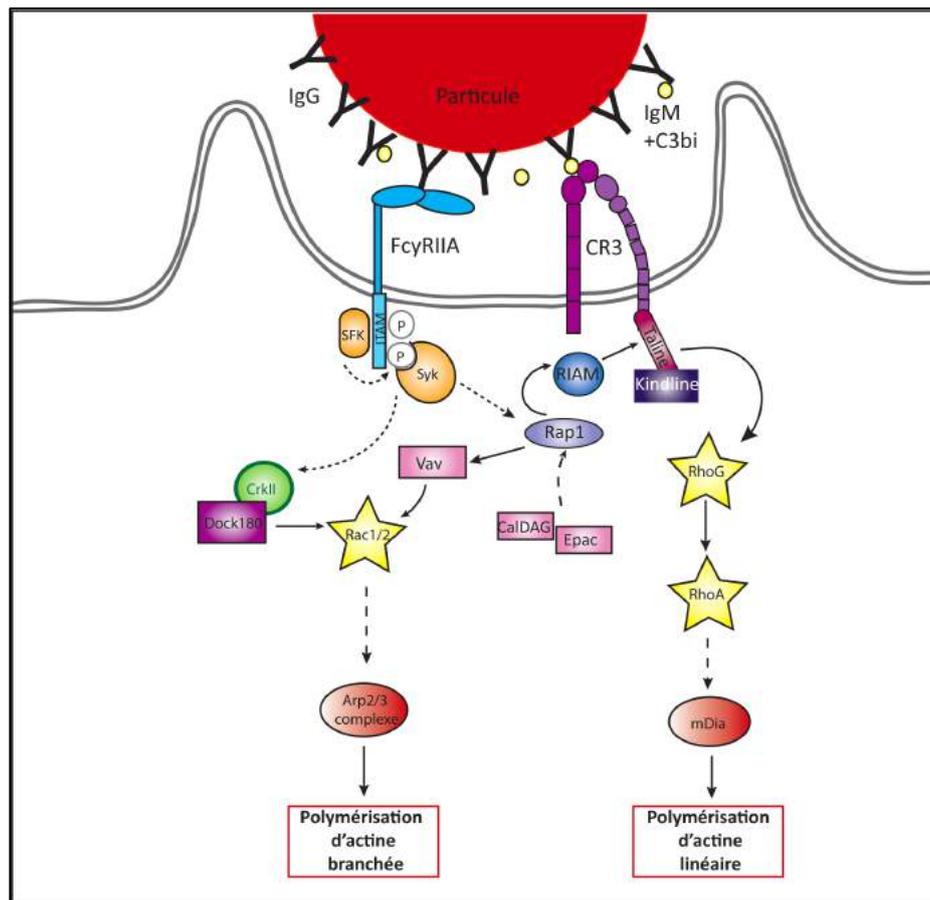
**Figure 22 : Signalisation conduisant à la polymérisation d'actine en aval des récepteurs Fc et CR3 au cours de la phagocytose.** L'actine est représentée en vert, la membrane plasmique en bleu et la particule en rouge. Les encadrés supérieurs représentent une vue sagittale des coupes phagocytaires. Durant la phagocytose FcR, Cdc42 induit le recrutement de N-WASP qui stimule l'activité du complexe Arp2/3 pour la nucléation de l'actine. En parallèle, Rac active le complexe WAVE qui contribue davantage à la polymérisation de l'actine, régule la contractilité par le biais de la chaîne légère de la myosine (MLC) et la dépolymérisation de l'actine par le biais de la cofiline sous contrôle de la kinase LIM (LIMK). Durant la phagocytose CR3, RhoA active la Rho kinase (ROK) qui régule l'activité de la myosine II par le biais de le kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), le complexe Arp2/3 et la formine mDia1. La GTPase RhoG est impliquée dans les deux mécanismes mais son rôle en amont de Rac, Cdc42 et RhoA reste à confirmer. Des photos de microscopie électronique montre les extensions membranaires autour des érythrocytes opsoninés dans le cadre de la phagocytose FcR (gauche) ou CR3 (droite). Barre d'échelle, 5µm.

### b. Coopération entre les récepteurs FcγR et les intégrines

Les modèles expérimentaux utilisés pour étudier la signalisation spécifique en aval des récepteurs phagocytaires ne correspondent pas aux situations réelles. En effet les phagocytes sont rarement exposés à un seul stimulus. Au contraire, ils sont confrontés à des particules présentant de multiples ligands.

Une étude a rapporté que dans les macrophages l'activation du récepteur Fc $\gamma$ R entraîne une augmentation de la mobilité des CR3, leur recrutement à la coupe phagocytaire, leur activation et augmente l'avidité du CR3 pour son ligand. L'action des tyrosines kinases de la famille Src en aval du Fc $\gamma$ R est requise pour l'activation du CR3. Parallèlement l'utilisation d'anticorps bloquant la chaîne  $\beta$ 2 du CR3 ou encore l'expression de la chaîne  $\alpha$  uniquement, inhibe l'internalisation de particules opsonisées avec des IgG. Ces résultats mettent en évidence une régulation croisée entre les deux voies (Jongstra-Bilen, Harrison et al. 2003).

Une étude récente de Freeman et ses collègues montre le rôle précis des intégrines et de l'actine au cours de la formation des coupes phagocytaires en aval du Fc $\gamma$ R. Au début de la formation des coupes phagocytaires, la phosphorylation des tyrosines kinases est une étape essentielle du processus. L'exclusion de phosphatases du site de la phagocytose est alors nécessaire au maintien du signal. Grâce à des techniques de suivi de molécule unique par microscopie à fluorescence et des surfaces opsonisées avec des groupements d'IgG, ils ont montré que la phosphatase CD45 est exclue de la zone d'étalement des macrophages et que cette exclusion est possible grâce à une barrière créée par les intégrines et l'actine polymérisée en anneau, qui empêchent la diffusion des phosphatases vers le centre de la région d'internalisation. De plus, lorsqu'une particule n'est pas opsonisée de façon homogène avec des IgG, les intégrines servent de pont et favorisent le mécanisme de fermeture éclair par lequel les récepteurs Fc lient une série d'IgG opsonisant une particule (Freeman, Goyette et al. 2016).



**Figure 23 : Coopération des voies de signalisation FcR et CR3.** L'engagement du récepteur Fc et la phosphorylation des domaines ITAMs (« immunoreceptor tyrosine based activation ») génèrent un signal d'activation de la GTPase Rap impliquée dans le signal d'activation « inside-out » du CR3. Ce dernier engagé va induire un signal « outside-in » permettant l'activation des Rho-GTPases (RhoG, RhoA). Parallèlement le récepteur Fc, lui aussi, active des RhoGTPases (Rac et Cdc42). Ensemble ces signaux favorisent la polymérisation d'un réseau d'actine branché et de filaments droits.

## Chapitre 2 : La dynamine

L'endocytose est un processus par lequel la cellule internalise une portion de sa membrane plasmique avec du matériel extracellulaire. De nombreux mécanismes d'endocytose ont été décrits depuis plus d'un siècle et ont permis de classifier différentes voies, d'une part l'endocytose dépendante de la clathrine, d'autre part l'endocytose indépendante de la clathrine. Cette dernière regroupe plusieurs voies notamment la phagocytose, la macropinocytose ou encore l'endocytose dépendante des cavéoles. L'ensemble des voies d'endocytose se caractérise par un bourgeonnement de membrane conduisant à la formation de vésicules de différentes capacités. Ce bourgeonnement est orchestré par un grand nombre de protéines cytosoliques qui induisent l'invagination de la membrane suivie de la scission et libération de la vésicule dans le milieu intracellulaire. L'une des protéines les mieux décrites et qui participe directement à la fission de la vésicule est une GTPase nommée dynamine. Elle est la protéine fondatrice de la superfamille des dynamines qui sont de larges GTPases bien différentes des petites protéines G de la superfamille Ras. Au cours de ce chapitre, je présenterai les principales fonctions et propriétés de la dynamine.

### 1. Vue d'ensemble des protéines de la superfamille des dynamines

Les membres de la superfamille dynamine sont des GTPases mécano-chimiques qui convertissent l'énergie de liaison et d'hydrolyse du GTP en action mécanique. Les membres de cette superfamille présents à la fois chez les animaux, les plantes et les bactéries, sont impliqués dans le remodelage membranaire à travers toute la cellule notamment par le bourgeonnement de vésicules de transports, la fusion/fission des organelles, la cytokinèse ou encore la résistance aux pathogènes (Praefcke and McMahon 2004). Les différentes sous-familles sont présentées dans le tableau 2.

**Les dynamines classiques** correspondent aux larges GTPases. Leur cycle n'est pas régulé par des facteurs GEFs ou GAPs. Chez les mammifères, on retrouve trois isoformes de la dynamine numérotées de 1 à 3, qui ont principalement été caractérisées pour leur activité

de scission des vésicules d'endocytose et des vésicules provenant de l'appareil de Golgi / endosomes.

**Les protéines « dynamines-like » (DPLs)**, contrairement aux dynamines classiques, ne possèdent pas de domaine PRD. Elles sont impliquées dans les mécanismes de fission des membranes mitochondriales et peroxisomales. Ces mécanismes sont cruciaux dans la maintenance de l'ADN mitochondrial, l'activité respiratoire, l'apoptose ou encore le développement embryonnaire. Parmi les DLPs, on retrouve Drp1 (« dynamin related protein 1 ») ou encore la dynamine A chez *Dictyostelium discoideum* qui en plus d'être impliquée dans la fission des mitochondries, joue également un rôle dans la cytokinèse, la morphologie des organites et dans l'endocytose.

**Les protéines « Optic atrophy 1 » (OPA1)** ont la même structure que les DLPs mais présentent en plus une séquence d'import mitochondriale dans leur région N-terminale suivie d'un domaine transmembranaire en hélice. Ceci leur permet de s'insérer entre les membranes interne et externe des mitochondries et de réguler la fusion de ces organites. Parallèlement, **les mitofusines**, localisées sur la face cytosolique de la membrane externe des mitochondries, coordonnent la fusion des mitochondries en favorisant leur arrimage.

**Les protéines « Mixovirus » (Mx)** sont impliquées dans la protection contre les infections virales suite à une induction par l'interféron de type I. Il existe deux isoformes chez l'homme MxA et MxB. Dans des cellules non-infectées, MxA se localise au réticulum endoplasmique. Sous l'effet d'une infection MxA est redistribuée aux sites de la réplication virale. L'expression d'un mutant de MxA dépourvu de son domaine GTPase inhibe la multiplication du virus de la stomatite (« *Thogoto virus* »). L'oligomérisation et l'activité GTPase de MxA ne sont donc pas requises pour l'activité antivirale. En revanche le domaine GTPase stabilise la protéine ce qui permet le maintien d'un pool protéique intracellulaire (Janzen, Kochs et al. 2000). Elles ne possèdent ni de domaine PH ni de domaine PRD.

**Les protéines de liaison au guanylate (GBPs)** sont des GTPases induites par l'interféron de type II. Ce groupe se compose de sept membres chez l'homme et protège l'organisme contre des pathogènes intracellulaires tels que *Listeria* ou *Mycobacteria*. Les GBPs ont la particularité d'hydrolyser consécutivement le GTP en GDP puis en GMP. Le rôle

physiologique de l'hydrolyse du GDP en GMP n'est pas encore déterminé. De même, les détails moléculaires et fonctionnels des oligomères de GBPs restent à élucider.

**Les protéines Atlastines**, chez les eucaryotes sont associées au réticulum endoplasmique et au *cis*-Golgi. Elles sont très proches des GBPs et sont impliquées dans la fusion des tubules du RE aboutissant à la formation d'un réseau tubulaire (Faelber, Gao et al. 2013).

Dans ce chapitre nous intéresserons particulièrement aux dynamines classiques : découverte, structure, fonctions cellulaires, et rôle potentiel au cours de la phagocytose.

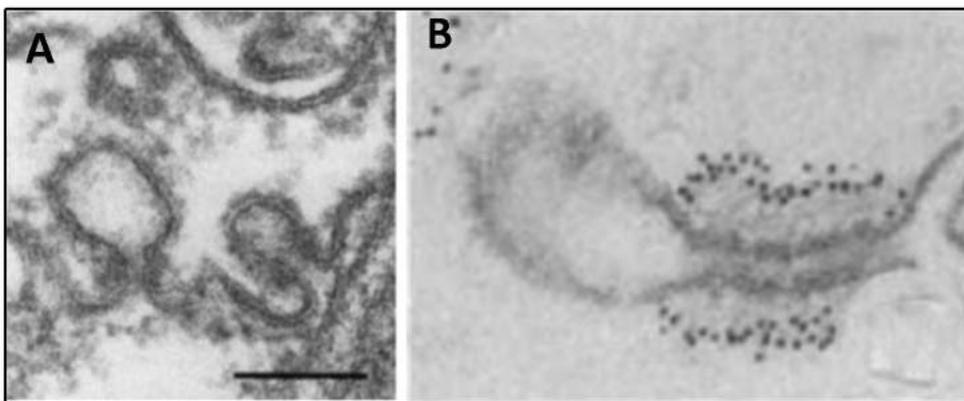
Organismes	Dynamine Homologue	Localisation subcellulaire	Fonction
Animaux	Dynamines classiques	Membrane plasmique	Fission des membranes
		Réseau trans-golgien, endosomes	
		Corps intermédiaire ("Midbody")	Cytokinèse
		Réseau d'actine Arp2/3 dépendant	Régulation de la polymérisation d'actine
	Drp1	Mitochondries (membrane externe) Peroxisomes	Division des organites
	OPA1	Mitochondries (membrane interne)	Fusion et division des mitochondries
	Mitofusine	Mitochondries (membrane externe)	Fusion et division des mitochondries
	Protéines Mx	Réticulum endoplasmique (RE)	Résistance virale
	GBPs	Vésicules intracellulaires	Résistance virale et pathogènes bactériens
Atlastin1	Réticulum endoplasmique (RE)	Fusion des tubules du RE	

**Tableau 2 : Liste des fonctions et localisations principales des dynamines classiques et apparentées.** Drp1, « dynamin-related protein » ; OPA1, « optic atrophy 1 » ; GBPs, « Guanylate-binding proteins ». Adapté de (Praefcke and McMahon 2004, Ferguson and De Camilli 2012) .

## 2. Découverte de la dynamine

La dynamine fut initialement décrite comme une protéine de liaison aux microtubules, extraite du cerveau de veau. Elle a été co-purifiée avec des microtubules en présence de GTP et AMP-PNP (Adenylyl-Imidodiphosphate), un inhibiteur des systèmes dépendants de l'ATP. Par microscopie électronique, il a été observé que la dynamine décore les microtubules (Shpetner and Vallee 1989, Obar, Shpetner et al. 1991). Son rôle dans l'endocytose fut découvert en 1991 chez le mutant shibire de *Drosophila melanogaster* qui présente une

paralyse dépendante de la température. Ce phénotype est le résultat d'une inaptitude des vésicules d'endocytose neuronales à être séparées de leur membrane d'origine et par conséquent d'une déplétion des vésicules pré-synaptiques. Ce phénotype fut associé à des mutations du gène *shibire* codant pour une protéine homologue de la dynamine (Chen, Obar et al. 1991, van der Bliek and Meyerowitz 1991). Par la suite, la visualisation de vésicules présentant un cou allongé entouré d'un assemblage oligomérique de dynamine dans des neurones de rats exposés à une forme analogue du GTP non hydrolysable (GTP $\gamma$ S), ont confirmé ces résultats (Takei, McPherson et al. 1995) (Figure 24).



**Figure 24 : Photos de microscopie électronique de vésicules d'endocytose en formation décorées de dynamine.** (A) Puits couverts de clathrine de la drosophile décoré avec un matériel dense autour d'un cou allongé (Kosaka and Ikeda 1983). (B) Photo de microscopie électronique montrant une invagination membranaire bloquée en présence de GTP $\gamma$ S, avec un cou entouré de dynamine marqué par un anticorps dirigé contre la dynamine et couplé à des microparticules d'or (Takei, McPherson et al. 1995).

Enfin, des études menées par le groupe de Sandra L. Schmid et basées sur la surexpression de formes mutées de la dynamine (DynK44A) qui ne lient ni hydrolyse le GTP ont montré la fonction de la dynamine au cours de l'endocytose chez les mammifères (van der Bliek, Redelmeier et al. 1993, Damke, Baba et al. 1994). En effet, dans des cellules non-neuronales, la dynamine et son activité GTPase sont essentielles pour l'internalisation dépendante de la clathrine des récepteurs à la transferrine et l'EGF (« epidermal growth factor »). La surexpression dans des cellules Hela du mutant dominant négatif DynK44A, entraîne une inhibition de l'internalisation de ces récepteurs, avec la présence de tubules retenus à la membrane plasmique (Damke, Baba et al. 1994).

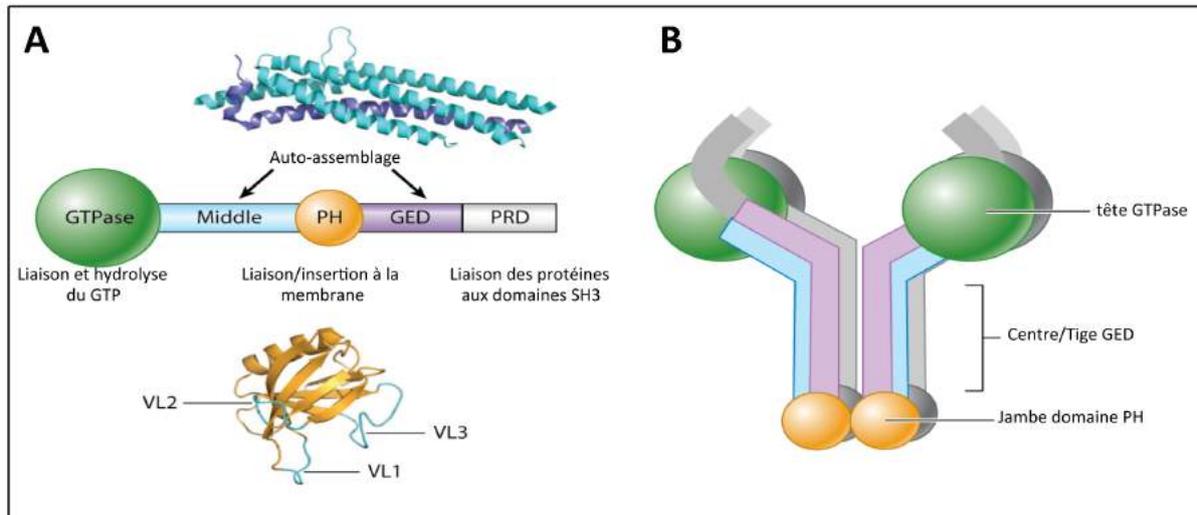
Il existe chez les mammifères trois isoformes de la dynamine. Elles présentent les mêmes domaines d'organisation avec environ 80% d'homologie et diffèrent par leur distribution tissulaire. La dynamine-1 (dyn-1) est exprimée fortement et majoritairement dans les neurones et est très peu détectable dans les tissus non-neuronaux bien que présente dans des lignées cellulaires (Reis, Chen et al. 2015). Elle est impliquée dans la formation des vésicules synaptiques. La dynamine-2 (dyn-2), quant à elle, responsable de l'endocytose dépendante de la clathrine ou non est exprimée de façon ubiquitaire. Enfin, la dynamine-3 est retrouvée de façon prédominante dans les testicules, les poumons, le coeur et le cerveau à un niveau moindre comparé à la dynamine-1 (Cook, Urrutia et al. 1994, Cao, Garcia et al. 1998). Bien que ces isoformes soient très similaires, elles ne sont pas fonctionnellement redondantes sur tous les plans. Ceci s'explique par quelques différences structurales (Liu, Neumann et al. 2011, Ferguson and De Camilli 2012).

### **3. Organisation structurale de la dynamine**

La dynamine de 100 kDa comprend un domaine GTPase N-terminal (domaine G), une région centrale tige (« stalk/middle domain »), un domaine « pleckstrin homology » (PH), un domaine « GTPase-enhancing » (GED) et un domaine riche en proline (PRD) C-terminal (Figure 25). Les monomères de dynamine s'associent en tétramères qui s'oligomérisent pour former un polymère hélicoïdal autour de plateformes tubulaires telles que le cou des vésicules d'endocytose, les microtubules et les faisceaux d'actine. L'assemblage de la dynamine est possible grâce à ses différents domaines.

#### **a. Le domaine tige (« stalk/middle »)**

Des études de cristallographie de la dynamine-1 ont révélé une structure dimérique composée de deux sous-unités dont les domaines GTPases s'opposent. La région de dimérisation correspond au domaine central « stalk » tige (Faelber, Posor et al. 2011, Ford, Jenni et al. 2011). Les dimères sont les unités de bases conduisant au polymère hélicoïdal.



**Figure 25 : Structure de la dynamine et fonction des différents domaines.** (A) Les dynamines classiques se composent de cinq domaines : un domaine GTPase (vert) qui lie et hydrolyse le GTP ; le domaine central (« middle ») (bleu) et le domaine GED (violet) qui interagissent ; Le domaine « pleckstrin homology » (PH) (orange) et le domaine PRD (gris). La structure de haute résolution des domaines PH et GED-« middle » est représentée VL, boucle variable (B) Structure d'un tétramère de dynamine en solution. Les codes couleurs sont les mêmes que pour (A). Adapté de (Schmid and Frolov 2011).

### b. Les domaines GTPase et GED

Le domaine GTPase est encadré par deux régions « bundle signalling element » (BSE) qui sont responsables de l'interaction avec le domaine BSE situé à proximité du domaine GED. Sous forme de monomère, la dynamine lie GTP avec une faible affinité et l'hydrolyse faiblement. L'oligomérisation de la dynamine augmente son activité GTPase (Warnock, Hinshaw et al. 1996, Stowell, Marks et al. 1999). De plus, le domaine GED, fonctionne comme une GAP intramoléculaire. En effet, une étude de Sever *et al* a mis en évidence que l'assemblage de la dynamine en polymère permet le contact entre deux domaines GED ce qui initie l'activité GAP. L'expression d'un mutant ne pouvant s'oligomériser (dynK694A) stimule l'endocytose. Les auteurs suggèrent que l'activation de la GAP est générée lors de l'empilement des tétramères qui ne peut se former qu'à l'issue d'un tour complet d'une spirale de dynamine (Sever, Muhlberg et al. 1999). Il existe alors probablement un senseur qui mesure les dimensions du cou de la vésicule afin de suivre la progression de la réaction de fission.

### c. Le domaine « pleckstrin homology »

Le domaine PH interagit avec les phospholipides acides du feuillet interne de la membrane plasmique et avec le PI(4,5)P<sub>2</sub> en particulier, via des acides aminés chargés positivement au sein de ce domaine PH. Initialement, l'affinité d'un unique domaine PH pour des lipides anioniques est faible. En revanche, la liaison coopérative des domaines PH du polymère de dynamine augmente l'avidité (Klein, Lee et al. 1998). Le domaine PH présente des boucles variables et hydrophobes d'insertion dans la membrane (VL) (Ramachandran, Pucadyil et al. 2009). La boucle VL1 génère des courbures membranaires et promeut la scission en déstabilisant la bicouche lipidique. Les isoformes dynamine-1 et -2 présentent des aptitudes différentes dans la génération des courbures membranaires sur des modèles lipidiques et ceci est dû à un acide aminé de différence dans la boucle variable VL3 (Liu, Neumann et al. 2011). En effet, la dynamine-1 est capable de générer des courbures membranaires entraînant la formation de vésicules tandis que la dynamine-2 a peu d'activité. Le remplacement d'une leucine dans la boucle VL3 de la dynamine-2 par une tyrosine présente dans la boucle VL3 de la dynamine-1, est suffisant à conférer la capacité de générer des courbures membranaires. La dynamine-2 est plus dépendante aux courbures membranaires et est impliquée dans l'endocytose lente.

### d. Le domaine riche en proline (PRD)

La dynamine possède plusieurs motifs PXXP inclus dans son domaine PRD. Elle peut alors interagir avec une trentaine de protéines possédant un domaine SH3 et ainsi exercer différentes fonctions cellulaires. Au cours de l'endocytose dépendante de la clathrine, la dynamine-2 est recrutée par des protéines contenant des domaines BAR (« Bin/Amphiphysin/Rvs »), impliquées dans la détection des courbures membranaires comme notamment l'endophiline, l'amphiphysine (David, McPherson et al. 1996, Ringstad, Gad et al. 1999, Takei, Slepnev et al. 1999, Sundborger, Soderblom et al. 2011). La dynamine est également mise en relation avec le réseau d'actine par le biais de son interaction avec des protéines de liaison à l'actine comme la cortactine ou Abp1 (« Actin binding protein 1 ») (McNiven, Kim et al. 2000, Kessels, Engqvist-Goldstein et al. 2001).

## 4. La dynamine et ses fonctions cellulaires

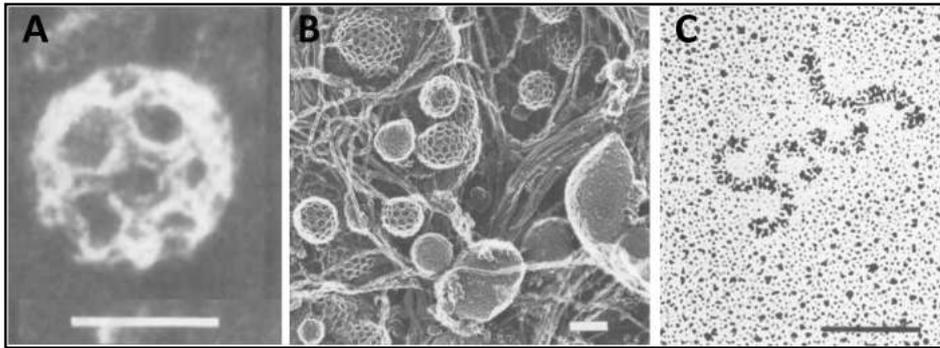
La dynamine fut très tôt associée à son activité de scission des vésicules d'endocytose. Cependant, ces dernières années, de nombreuses études dans différents domaines tels que la cancérologie, la biologie cellulaire, la neurologie ou la myologie ont révélé de nouvelles fonctions pour cette large GTPase. Dans cette partie, je présenterai le rôle de la dynamine dans l'endocytose suivi de son rôle dans la régulation du cytosquelette.

### a. Rôle de la dynamine dans l'endocytose

#### i. Initiation de l'endocytose dépendante de la clathrine

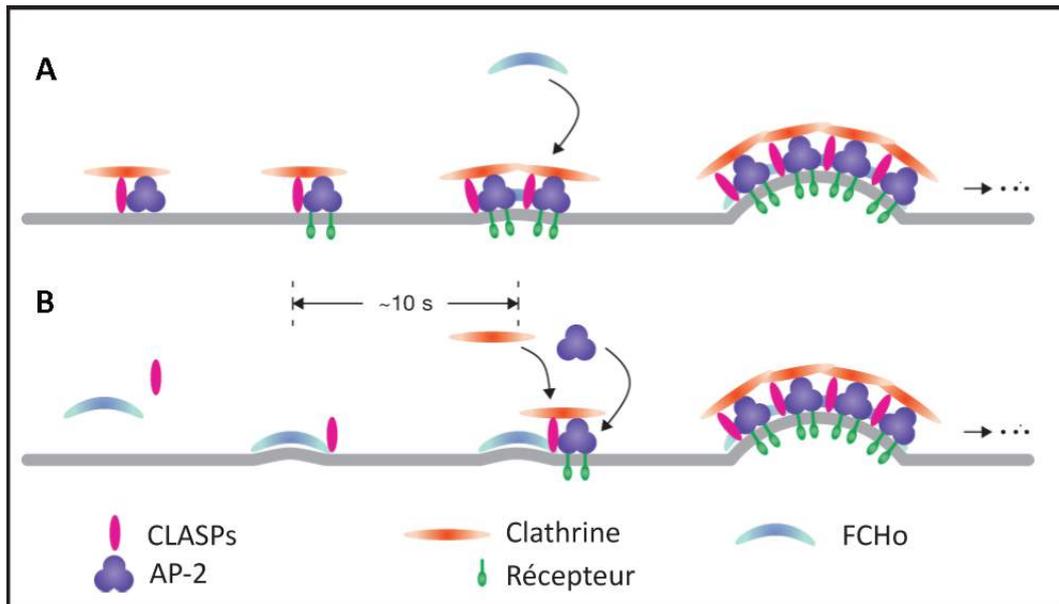
L'endocytose dépendante de la clathrine est la voie d'endocytose la mieux caractérisée dans la littérature. Elle permet l'internalisation de récepteurs membranaires et de molécules extracellulaires par la formation d'une invagination de la membrane plasmique. Cette invagination est possible grâce à l'assemblage d'un manteau de clathrine sur le feuillet interne de la membrane. La clathrine est une protéine hexamérique et constituée de trois chaînes légères (30kDa) qui chacune s'associent à une chaîne lourde (190 kDa). Les trois chaînes lourdes sont associées par leur domaine C-terminal et ensemble forment un « triskèle » (Figure 26).

In vitro, les « triskèles » s'assemblent spontanément en cages. Cependant, en conditions physiologiques, leur assemblage sur le feuillet interne de la membrane plasmique requiert des facteurs appelés protéines d'assemblage. La cinétique du recrutement des protéines impliquées dans la nucléation des puits couverts de clathrine (CCPs) n'est pas totalement élucidée. Toutefois, le complexe AP-2, les protéines FCHO (« Fer/Cip4 homology domain only ») et Eps15 (« EGFR pathway substrate 15 ») sont indispensables au recrutement du manteau de clathrine (Figure 26) (Reider, Barker et al. 2009, Stimpson, Toret et al. 2009, Henne, Boucrot et al. 2010, Cocucci, Aguet et al. 2012)



**Figure 26 : Photos de microscopie électronique de la clathrine.** (A) Cage de clathrine vide isolée à partir du cerveau qui présente une structure en polygone. Barre d'échelle 0,05  $\mu\text{m}$  ; Grossissement 230,000X (B) Vue de la surface cytoplasmique de la membrane plasmique de cellule du foie avec de nombreux puits couverts de clathrine, et des filaments. Barre d'échelle 0,1  $\mu\text{m}$  (C) Triskèles de clathrine visualisés par microscopie électronique. Barre d'échelle 0,05  $\mu\text{m}$  ; Grossissement 580,000X. Tiré de (Steer and Klausner 1983)

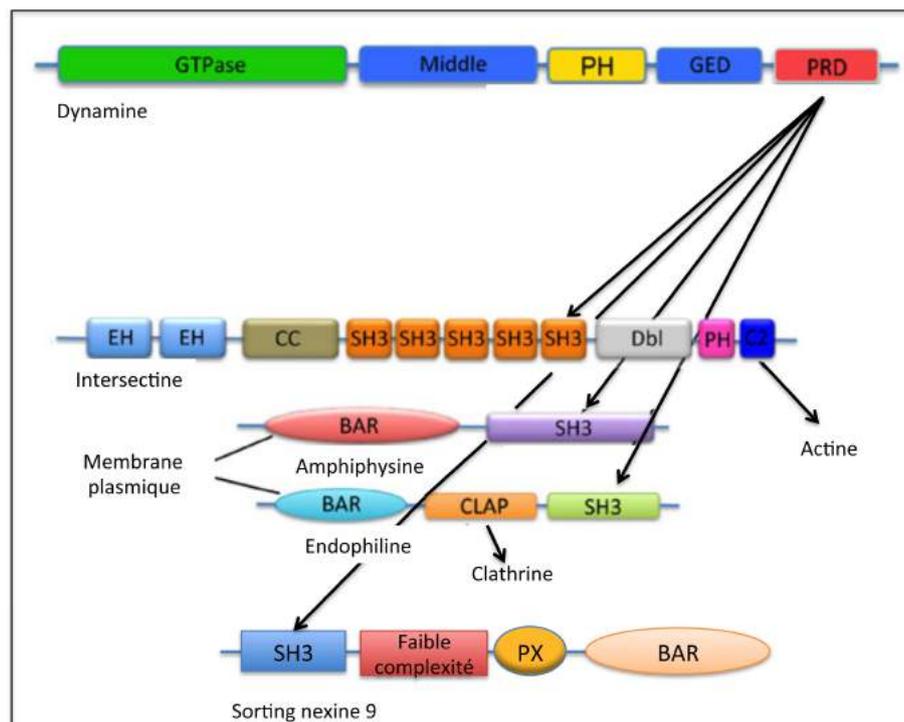
Le complexe AP-2 va permettre le recrutement de protéines accessoires qui stabilisent le puits de clathrine et favorisent le recrutement des cargos. Il interagit directement avec les motifs cytosoliques de certains récepteurs transmembranaires, avec des protéines adaptatrices en lien avec le cargo, mais également avec le  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ . La protéine Eps15, quant à elle, est constitutivement associée au complexe AP-2 et participe à l'assemblage des puits. La protéine FCHO possède un domaine F-BAR responsable de la déformation des membranes peu courbées. Les epsines qui se caractérisent par un domaine ENTH (« epsin N-terminal homology domain ») favorisent elles aussi la courbure membranaire responsable de l'invagination. Ce domaine ENTH s'introduit dans le feuillet interne de la membrane plasmique et se lie au  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ . La taille des vésicules d'endocytose couvertes de clathrine (CCVs) est régulée par la protéine CALM (« clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein ») et son hélice amphiphatique qui détecte les courbures membranaires. Elle régule ainsi la maturation des CCPs.



**Figure 27 : Deux modèles d'initiation de l'endocytose.** (A) Le complexe AP-2 est recruté à la membrane plasmique en premier, puis recrute la clathrine et les protéines accessoires (CLASPs, « clathrine associated sorting proteins ») qui permettront la courbure membranaire. (B) La protéine FCHO lie la membrane plasmique et induit la courbure membranaire qui permet par la suite le recrutement d'AP-2, de la clathrine et des protéines accessoires. Adapté de (Merrifield 2012).

## ii. Le recrutement de la dynamine au site de l'endocytose clathrine dépendante

L'assemblage de toutes ces protéines accessoires et la polymérisation de la clathrine génèrent une force qui certes induit l'invagination, mais reste insuffisante pour la séparation de la vésicule de la membrane plasmique. Le recrutement de la dynamine au site de l'endocytose est dépendante de son domaine PRD et non de son interaction avec la clathrine (Shpetner, Herskovits et al. 1996). Plusieurs protéines ont été mises en évidence pour leur capacité d'interaction et de recrutement de la dynamine au site de l'internalisation : l'amphiphysine, l'endophiline, la SNX9 (« sorting nexin 9 ») et l'intersectine (Figure 28). Ces protéines possèdent des domaines SH3 chargés négativement capable de lier les séquences riches en proline de la dynamine.



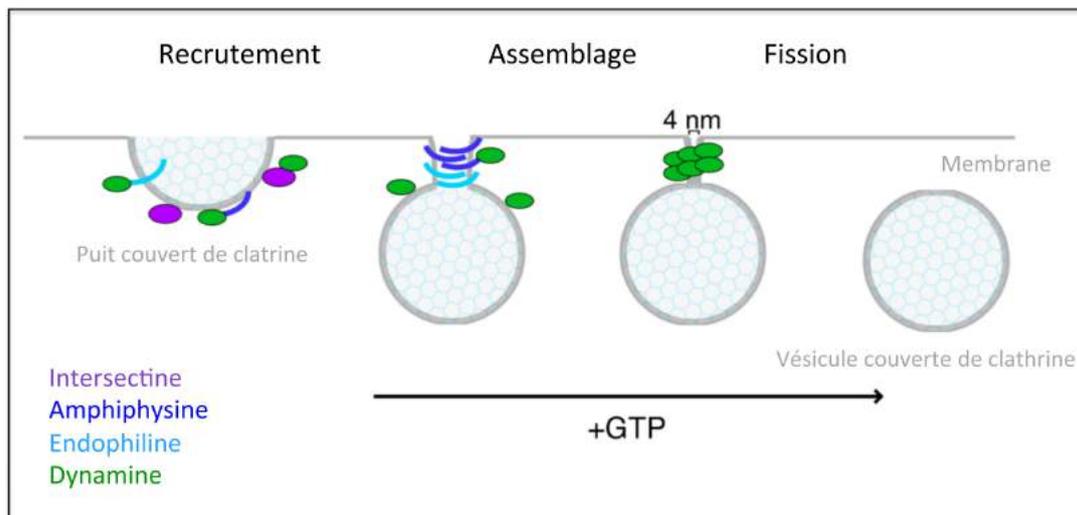
**Figure 28 : Les protéines à domaines SH3, partenaires de la dynamine au cours de l'endocytose.** PH, « Pleckstrin homology » ; GED, « GTPase enhance domain » ; PRD « Prolin rich domain » ; EH, « Eps15 homology » ; CC, « coiled-coil » ; SH3, « Src homology type 3 » ; PX, « Phox domain » ; BAR, « Bin/amphiphysin/Rvs ». Adapté de (Lundmark and Carlsson 2003, Sundborger and Hinshaw 2014)

Tout d'abord, l'intersectine est une protéine d'échafaudage identifiée dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, comme une protéine à multi-domaines contenant deux domaines EH (« Eps15 homology »), une région centrale en hélice, et cinq domaines SH3. Des expériences de sélection par affinité avec les domaines SH3 ont permis d'identifier deux protéines associées à l'endocytose : la dynamine et la phosphatase synaptojanine (Yamabhai, Hoffman et al. 1998). Ce premier résultat suggère le rôle potentiel de l'intersectine dans l'endocytose. Plus tard, des expériences de déplétion transitoire de l'intersectine dans des neurones ou une lignée de cellules épithéliales montreront une inhibition de l'internalisation de l'EGF et de la transferrine respectivement (Martin, Mohny et al. 2006, Thomas, Ritter et al. 2009). Cependant, chez des souris dépourvues du gène codant pour l'intersectine, aucun effet n'est observé sur l'internalisation de la transferrine, ce qui est significatif de l'existence probable de mécanismes compensatoires exercés par les différentes isoformes de la protéine (Das, Scappini et al. 2007). Des études chez la

drosophile révèlent qu'une mutation de Dap160, orthologue de l'intersectine, entraîne d'une part une réduction de la dynamine et de l'endophiline au site d'endocytose et d'autre part, une diminution du nombre de vésicules d'endocytose intracellulaires. L'absence de l'intersectine induit la formation d'invaginations membranaires couvertes de clathrine bloquées à un stade intermédiaire et la formation vésicules de taille aberrante visualisées par microscopie électronique (Koh, Verstreken et al. 2004, O'Bryan 2010). L'intersectine interagit aussi avec les composés du réseau d'actine notamment Cdc42 et N-WASP et favorise le remodelage du cytosquelette (Hussain, Jenna et al. 2001, Pechstein, Shupliakov et al. 2010).

Ensuite, l'amphiphysine et l'endophiline possèdent un domaine N-BAR, en plus de leurs domaines SH3. Par homodimérisation, ces protéines détectent les courbures membranaires positives grâce à une hélice amphipatique présente dans leur partie N-terminale. Cette hélice s'insère dans la bicouche lipidique et favorise les fortes courbures membranaires. Ainsi l'endophiline et l'amphiphysine augmentent les courbures initiées par la protéine FCHO recrutée précocement au site de l'endocytose. Il a été montré que la dynamine-2 se lie préférentiellement aux membranes fortement courbées et aux cous des puits couverts de clathrine (Takei, McPherson et al. 1995, Roux, Koster et al. 2010). Une étude élégante utilisant la technique d'édition du génome dans une lignée cellulaire de fibroblastes a permis d'observer par microscopie à fluorescence la dynamine-2 endogène couplée à l'eGFP (« enhanced Green fluorescent protein ») lors de l'endocytose. Cette étude révèle qu'il existe une coopération entre l'amphiphysine et l'endophiline dans le recrutement de la dynamine-2 aux CCPs. La déplétion par ARN interférence de ces deux protéines individuellement n'affecte pas l'internalisation de la transferrine ni le recrutement de la dynamine. En revanche la déplétion concomitante de ces deux protéines induit à la fois une diminution significative du recrutement de la dynamine-2 à la membrane plasmique et une diminution de l'internalisation de la transferrine (Meinecke, Boucrot et al. 2013). L'amphiphysine joue un rôle clé dans la localisation précise de la dynamine et/ou dans sa fonction. En contrepartie, la déplétion de la dynamine empêche le recrutement de l'endophiline à la membrane plasmique ce qui indique une coopération entre ces dernières. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* grâce à des vésicules unilamellaires géantes (GUVs,

« Giant unilamellar vesicles »). De plus, l'utilisation d'un mutant de la dynamine incapable de lier les lipides, et de l'endophiline *in vitro* montre le recrutement de la dynamine et son assemblage à la membrane lipidique en dépit de son absence de liaison aux lipides. Ceci confirme que le domaine PH de la dynamine n'est pas responsable du recrutement de la dynamine au site de l'endocytose (Neumann and Schmid 2013). En conclusion, les protéines contenant des domaines N-BAR sont des plateformes de recrutements de la dynamine aux cours des vésicules couvertes de clathrine (CCVs) en formation. Elles génèrent la courbure qui favorise le recrutement efficace de la dynamine et son assemblage (Figure 29) (Boucrot, Ferreira et al. 2015).



**Figure 29 : Les étapes du recrutement de la dynamine au cours de l'endocytose clathrine dépendante.** Au cours de l'assemblage des puits de clathrine, les protéines aux domaines SH3 : intersectine, amphiphysine, endophiline sont recrutées. L'intersectine sert de protéine d'échaffaudage et permet le recrutement de la dynamine et d'autres protéines participant au processus. L'amphiphysine et l'endophiline (protéines BAR) favorisent l'invagination membranaire et la formation d'un « cou » permettant l'assemblage de la dynamine en hélice. L'hydrolyse du GTP conduit à des réarrangements conformationnels de la dynamine qui exerce son activité de fission des membranes. Adapté de (Sundborger and Hinshaw 2014).

Enfin, la « sorting nexin 9 » (SNX9) est une protéine caractérisée dans sa région N-terminale par un domaine SH3, suivi d'une région de faible complexité et un domaine de liaison aux phosphoinositides PX (« phox ») dans sa région C-terminale (Figure 28). Une étude menée dans des cellules hématopoïétiques l'a identifiée comme une protéine de

liaison au complexe AP-2. Peu après, les mêmes auteurs complètent leurs travaux en démontrant par des expériences de précipitations et de spectrométrie de masse que la SNX9 lie le complexe AP-2 et la clathrine via sa région de faible complexité. De plus, dans le cytosol, la SNX9 forme un complexe avec la dynamine-2 par le biais de son domaine SH3. Ce complexe est maintenu inactif par une aldolase qui masque les domaines de liaison de la SNX9 à la membrane plasmique, à AP-2 et à la clathrine. La phosphorylation du site de liaison de l'aldolase sur la SNX9 induit une dissociation de l'aldolase et le recrutement du complexe SNX9-dynamine-2 à la membrane plasmique. Il y a alors une co-localisation du complexe AP-2, de la clathrine, de la SNX9 et de la dynamine-2 au site de bourgeonnement des vésicules d'endocytose. De plus, la déplétion de la SNX9 dans les cellules Hela aboutit à une altération de la distribution de la dynamine-2 à la membrane plasmique ou encore la surexpression d'un mutant dépourvu de son domaine C-terminal inhibe l'internalisation de la transferrine. L'ensemble de ces résultats montre que la SNX9 est une protéine régulatrice du recrutement de la dynamine-2 à la membrane plasmique en coopération avec d'autres protéines accessoires (Lundmark and Carlsson 2002, Lundmark and Carlsson 2003, Lundmark and Carlsson 2004).

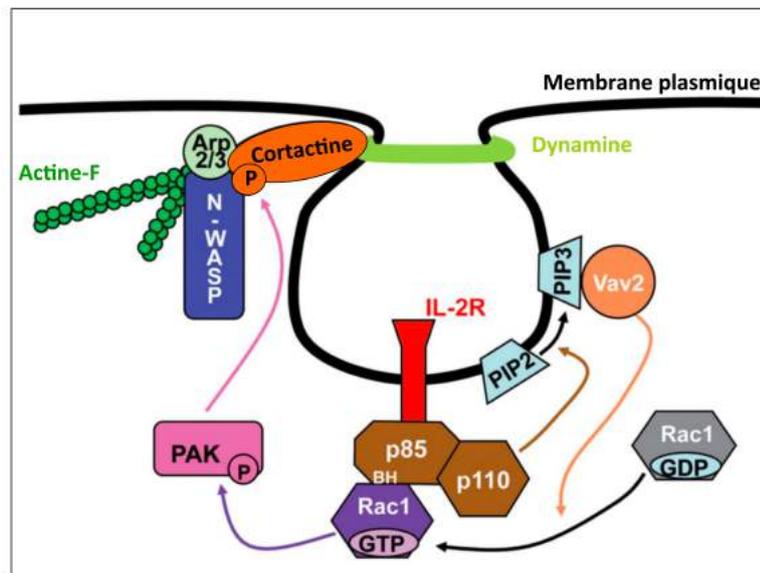
### iii. Recrutement de la dynamine dans l'endocytose indépendante de la clathrine

Bien que l'endocytose dépendante de la clathrine soit la plus décrite, il existe d'autres voies d'endocytose indépendante de ce manteau protéique. Ces voies peuvent être classées selon la taille des vésicules formées, la présence d'un manteau protéique, la polymérisation d'actine ou encore la présence de la dynamine. Parmi les voies dépendantes de la dynamine se distinguent l'endocytose dépendante des cavéoles et l'endocytose du récepteur à l'interleukine-2 (IL-2R).

Les cavéoles sont des invaginations membranaires en forme de bulbe de 50-60nm. Elles ont été l'une des premières structures décrites comme participant à l'endocytose indépendamment de la clathrine. Les cavéolines et cavines sont les protéines structurales

qui s'assemblent et donnent un aspect en spirale très caractéristique des cavéoles. Les effets de la suppression de l'activité de la dynamine par des anticorps bloquants ou des mutants dominants négatifs ont été analysés par microscopie à fluorescence et électronique. Ces analyses ont révélé d'une part la colocalisation entre la dynamine et la caveoline à la surface cellulaire et d'autre part l'inhibition de l'internalisation de la sous-unité B de la toxine cholérique, cargo caractéristique de cette voie (Henley, Krueger et al. 1998, Oh, McIntosh et al. 1998). Le mécanisme détaillé du recrutement de la dynamine au site de l'endocytose dépendante des cavéoles n'est pas totalement élucidé. Cependant, l'intersectine est présente avec la dynamine et SNAP-23 en complexe à la membrane plasmique. L'intersectine et la dynamine s'accumulent préférentiellement autour des couds rattachant les cavéoles à la membrane plasmique, suggérant ainsi leur rôle dans la fission des vésicules. La déplétion de l'intersectine ou la surexpression d'un mutant dominant négatif dans des cellules épithéliales aboutissent à une inhibition de la fission des cavéoles. De plus, une étude *in vitro* a démontré que le premier domaine SH3 (SH3A) de l'intersectine lie la dynamine 2, stimule son oligomérisation et son activité GTPase favorisant ainsi l'activité de scission de cette dernière (Predescu, Predescu et al. 2003, Knezevic, Predescu et al. 2011).

L'endocytose du récepteur à l'IL-2 ne nécessite pas de manteau protéique. Il se localise dans des microdomaines membranaires riches en cholestérol (Lamaze, Dujancourt et al. 2001) qui s'invaginent grâce à une machinerie dépendante de l'actine. La liaison ligand-récepteur va induire une cascade de signalisation via la PI3K qui conduit au recrutement et à l'activation des Rho GTPases Rac et RhoA (Basquin and Sauvonnnet 2013). Les kinases PAK1 et PAK2 activées en aval de Rac sont requises pour la phosphorylation de la cortactine et son recrutement à la membrane plasmique. Une fois phosphorylée, la cortactine interagit avec N-WASP, nucléateur de l'actine qui stimule la polymérisation de l'actine par activation du complexe Arp2/3 (Sauvonnnet, Dujancourt et al. 2005, Grassart, Dujancourt et al. 2008, Grassart, Meas-Yedid et al. 2010). Enfin le mécanisme de recrutement de la dynamine au site de l'internalisation reste à élucider. Cependant, la cortactine est essentielle à une internalisation efficace des récepteurs à la transferrine et de la chaîne  $\gamma$ c de l'IL-2R. Elle fait le lien entre la dynamine et le cytosquelette d'actine (Figure 30) (Basquin, Trichet et al. 2015).



**Figure 30 : Modèle d'endocytose du récepteur de l'IL-2.** L'activation de la PI3K (sous-unités p85-p110) en aval du récepteur à l'IL-2 conduit à l'activation et au recrutement de Rac1 au site d'internalisation. Ceci induit alors la cascade de signalisation Rac1-Pak1-cortactine-N-WASP 3 qui stimule la polymérisation d'actine-F via le complexe Arp2/3. La cortactine et la dynamine interagissent et conduisent à la fission de la vésicule. (Basquin, Malarde et al. 2013).

#### iv. La dynamine et le mécanisme de fission

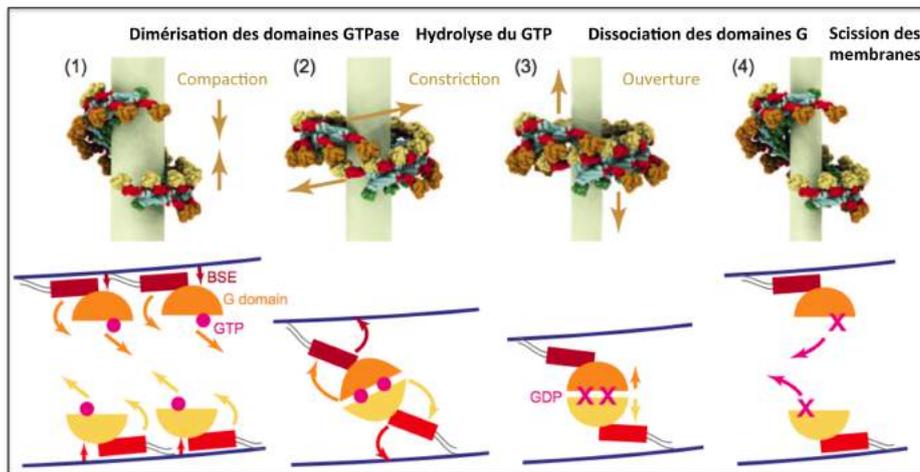
De nombreuses études ont été dédiées à la compréhension du mécanisme moléculaire de fission des membranes au cours de l'endocytose. L'une des premières observations est que le mécanisme de séparation de la vésicule couverte de clathrine de la membrane plasmique nécessite la présence de GTP et que la présence de GTP non hydrolysable (GTP $\gamma$ S) bloque le processus (Lamaze, Baba et al. 1993). La dynamine fut l'une des premières protéines identifiées comme impliquée dans ce processus. L'observation par microscopie électronique de la dynamine a permis d'avancer l'hypothèse selon laquelle elle pourrait induire la contractilité et la fusion des deux extrémités du cou des vésicules d'endocytose en s'auto-assemblant sous forme d'un anneau (Hinshaw and Schmid 1995).

Le groupe de Jenny Hinshaw a confirmé que la fission des membranes dans ce contexte, dépend de la présence de GTP et de l'activité GTPase de la dynamine. Celle-ci est capable de se polymériser en hélice qui entoure et déforme les membranes en tubules circulaires. L'addition de GTP induit la constriction de ces tubules aboutissant à leur clivage

en petites vésicules (Hinshaw and Schmid 1995, Sweitzer and Hinshaw 1998, Sundborger and Hinshaw 2014). L'hydrolyse du GTP est stimulée par l'auto-assemblage des monomères de dynamine. Des études biochimiques et structurales indiquent que cette hydrolyse résulte de l'interaction des domaines GTPases entre deux anneaux adjacents de l'hélice formée par le polymère de dynamine (Chappie, Acharya et al. 2010, Chappie, Mears et al. 2011). Ceci suggère que lors du cycle hydrolytique du GTP, les oligomères de dynamine suivent un cycle de liaison/dissociation entre deux anneaux adjacents. Ce phénomène induit une activité contractile de la dynamine. En plus de cette contractilité, des études plus détaillées par cryo-microscopie électronique révéleront que cette contractilité est aussi due à une torsion de l'hélice de dynamine au niveau de son domaine tige (« stalk »). En effet 15 dimères par tour d'hélice de dynamine ont été observés en absence de GTP, tandis que seuls 13 dimères par tour ont été trouvés en présence de GTP non hydrolysable (Chen, Zhang et al. 2004, Mears, Ray et al. 2007). De ce fait, la fission semble être le résultat global d'une torsion de l'hélice et de la compaction entre deux anneaux de dynamine.

De plus, une autre étude *in vitro*, basée sur l'utilisation de liposomes géants avec réservoir de membrane, a montré que les courts polymères de dynamine sont plus efficaces dans la fission des membranes que les polymères de grande taille. Une autre conclusion de cette étude est que la fission des membranes est concomitante avec la dépolymérisation de la dynamine (Pucadyil and Schmid 2008).

L'ensemble de ces résultats et d'autres non présentés ici, permettent de proposer un modèle de fission des membranes par la dynamine. La polymérisation de la dynamine en hélice autour du cou de la vésicule conduit à la constriction de la membrane. Puis suite à l'hydrolyse du GTP une torsion de l'hélice se produit conduisant à un stade d'hemi-fission de la membrane. L'hydrolyse du GTP affaiblit la liaison du polymère de dynamine et aboutit à sa dépolymérisation. Ainsi la fission complète de la membrane se produit (Lenz, Morlot et al. 2009) (Figure 31).



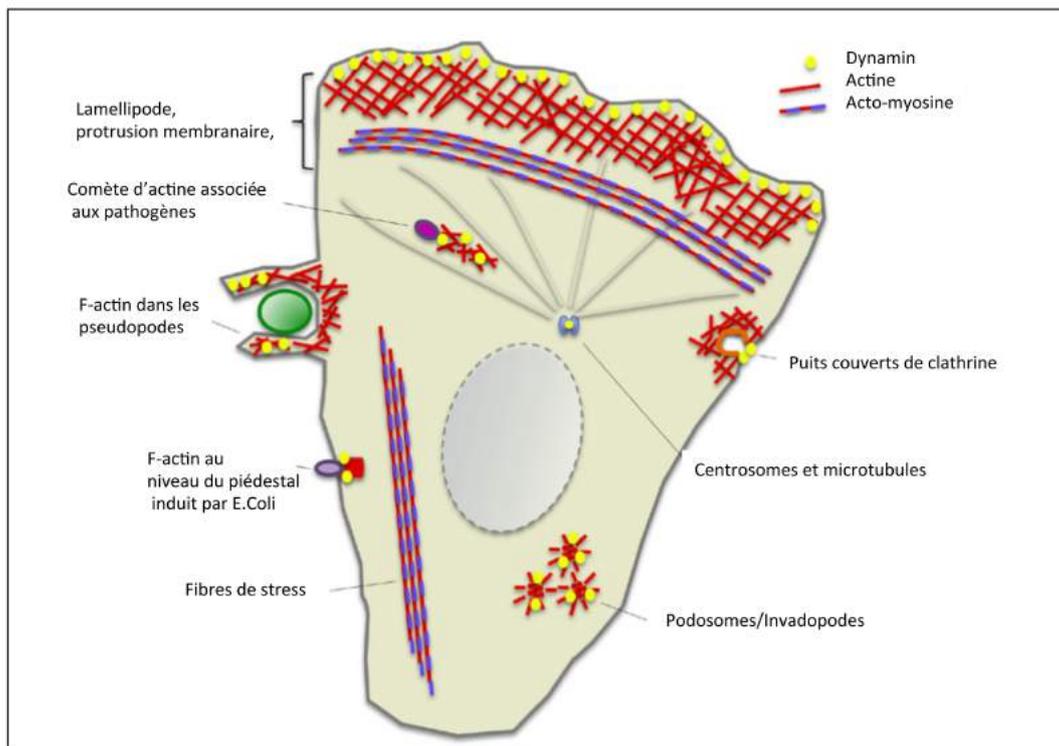
**Figure 31 : Modèle du mécanisme de fission des membranes par la dynamine.** (1) La dynamine se polymérise en hélice autour d'un tubule membranaire. Au bout d'un tour les domaines GTPases des anneaux voisins se font face et se dimérisent induisant une compaction. (2) L'hydrolyse du GTP induit un changement conformationnel qui favorise le glissement d'un tour d'hélice sur l'autre et un phénomène de constriction. (3) Suite à l'hydrolyse du GTP, les domaines GTPases se séparent. (4) Dissociation du polymère de dynamine et fission de la membrane. Adapté de (Faelber, Gao et al. 2013).

Ce mécanisme de fission peut être régulé par les protéines SH3/BAR telles que l'amphiphysine et l'endophiline qui accompagnent le recrutement de la dynamine juste avant la fission des vésicules d'endocytose dépendante de la clathrine. Une étude récente a révélé que le domaine PRD de la dynamine se localise à la surface du polymère de dynamine à proximité du domaine GTPase, suggérant une interaction entre ces deux domaines. Ainsi les protéines SH3/BAR pourraient influencer l'activité GTPase de la dynamine assemblée en polymère (Sundborger, Fang et al. 2014).

### b. Rôle de la dynamine dans la régulation du cytosquelette

Le cytosquelette est un système structural qui coopère avec les membranes cellulaires, la matrice extracellulaire (MEC) et les protéines cytosoliques afin de contrôler des fonctions cellulaires essentielles telles que le maintien de leur morphologie, leur division, la migration cellulaire, et le trafic intracellulaire. Des centaines de protéines régulent ce système. Ces dernières années la dynamine n'apparaît plus simplement comme une GTPase régulant uniquement la fission de membranes mais émerge comme une protéine régulatrice

des filaments du cytosquelette. Dans cette partie, nous nous intéresserons d'une part à la coopération de la dynamine et de l'actine et d'autre part de la coopération dynamine-microtubules (Figure 32).



**Figure 32 : Influences de la dynamine sur le cytosquelette d'actine.** Adapté de (Menon and Schafer 2013)

### i. Dynamine et Actine

- *Coopération entre la dynamine et l'actine-F durant l'endocytose*

L'actine et la dynamine régulent l'endocytose dépendante de la clathrine mais aussi d'autres formes d'endocytose dans les cellules de mammifères. Chez la levure, les filaments d'actine sont absolument requis pour l'invagination et la scission des vésicules d'endocytose. En revanche dans les cellules de mammifères l'actine n'est pas absolument nécessaire mais favorise la scission des vésicules (Aghamohammadzadeh and Ayscough 2009, Ferguson, Raimondi et al. 2009, Taylor, Lampe et al. 2012).

Une étude basée sur la visualisation par microscopie à ondes évanescentes des CCPs a permis d'observer le faible recrutement de la dynamine et de l'actine au stade précoce de formation de la vésicule. Puis l'actine-F est recrutée transitoirement avant une accumulation

rapide de la dynamine qui précède la scission des vésicules (Merrifield, Feldman et al. 2002). Les facteurs associés à la machinerie de polymérisation de l'actine tels que le complexe Arp2/3, la protéine N-WASP et la cortactine sont également recrutés (Merrifield, Qualmann et al. 2004, Taylor, Lampe et al. 2012).

Par la suite, des travaux menés sur des fibroblastes de souris déplétées pour la dynamine-1 et la dynamine-2 montreront un enrichissement de l'actine-F et du complexe Arp2/3 au site des invaginations couvertes de clathrine, indiquant que la dynamine n'est pas requise pour l'assemblage de l'actine. Cependant, la déstabilisation du réseau d'actine par des drogues (latrunculine et cytochalasine) dans des cellules dépourvues de dynamine augmente la proportion de puits de clathrine peu profonds avec de larges cous (Ferguson, Raimondi et al. 2009). Cette observation confirme le rôle de l'actine dans la formation et stabilisation des invaginations membranaires, par le biais de son interaction directe avec la dynamine ou indirecte via les protéines contenant des domaines SH3/N-BAR (Kaksonen, Sun et al. 2003, Merrifield, Perrais et al. 2005, Zhu, Zhou et al. 2005). L'interaction actine-dynamine favorise donc la scission des vésicules d'endocytose. Cependant, il est à noter que le rôle de l'actine dans la formation des puits couverts de clathrine dépend de la tension membranaire. En effet, une étude réalisée sur des cellules polarisées (cellules épithéliales MDCK) montre qu'à la membrane apicale, l'inhibition de la dynamique de l'actine induit un arrêt du processus de formation des puits couverts de clathrine qui gardent une forme en « U » tandis qu'à la membrane basolatérale, les puits se ferment complètement. En bref, plus la tension membranaire est élevée, plus l'actine est nécessaire à la formation des puits couverts de clathrine (Boulant, Kural et al. 2011).

L'activité GTPase de la dynamine influence en retour l'assemblage et le désassemblage de l'actine-F au site des structures couvertes de clathrine (CCS). En effet, l'expression de mutant de la dynamine sans activité GTPase diminue le recrutement de l'actine-F et augmente son désassemblage aux CCS. Il existe donc une interdépendance entre l'actine et la dynamine durant l'endocytose clathrine dépendante (Taylor, Lampe et al. 2012).

La collaboration entre la dynamine et l'actine est aussi présente au cours de l'endocytose clathrine indépendante notamment dans l'endocytose de l'IL-2R comme décrit précédemment (Sauvonnet, Dujeancourt et al. 2005). La cortactine qui lie à la fois le

domaine PRD de la dynamine et le complexe Arp2/3 sert de véritable pont nécessaire à une internalisation efficace des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  de ce récepteur.

- *Dynamine, protrusions membranaires et structures d'adhésions :*

La dynamine-2 a été trouvée associée à différents réseaux d'actine notamment celui constituant les protrusions membranaires tels que les lamellipodes, les « ruffles » dorsaux, mais aussi aux filaments d'actine composant des structures spécialisées comme les podosomes, les invadopodes et les pseudopodes. Toutes ces structures possèdent un réseau d'actine branché dynamique résultant de l'action du complexe nucléateur d'actine Arp2/3.

Deux mécanismes de régulation des filaments d'actine par la dynamine ont été mis en évidence. D'une part, un mécanisme indirect par le biais de la cortactine et d'autre part par une liaison directe de la dynamine et l'actine-F.

En effet, le recrutement de la dynamine au niveau des « ruffles » dorsaux suite à une stimulation par le facteur de croissance PDGF (« platelet-derived growth factor ») est dépendant de son domaine PRD (Krueger, Orth et al. 2003). En effet, la dynamine-2 interagit avec la cortactine via ce domaine et se localise au niveau de larges « ruffles » dorsaux. Ces structures ne se forment pas en présence du mutant dominant négatif de la dynamine-2 tronquée de son domaine PRD. De plus, ces auteurs ont montré que, suite à la stimulation dans les fibroblastes par le PDGF, il y a la formation d'un complexe multiprotéique composé de N-WASP, Rac, cortactine, et dynamine-2 (Krueger, Orth et al. 2003). Une autre étude *in vitro*, révèle que la cortactine stimule l'activité GTPase intrinsèque de la dynamine 2 et maintient le lien entre le réseau d'actine et la dynamine (Mooren, Kotova et al. 2009). L'interaction entre la dynamine-2 et la cortactine serait également requise lors de la formation des podosomes et invadopodes. Ces structures adhésives dynamiques entre la cellule et la MEC, formées dans les macrophages, les ostéoclastes ou encore les cellules tumorales, permettent la libération de métalloprotéases responsables de la dégradation de la MEC. Il a été montré que ces structures ne se forment pas dans les cellules exprimant le mutant de la dynamine dominant négatif dépourvu du domaine PRD (Dyn $\Delta$ PRD) et que la cortactine est essentielle à leur fonctionnement (Baldassarre, Pompeo et al. 2003, Clark,

Whigham et al. 2007, Tehrani, Tomasevic et al. 2007, Oser, Yamaguchi et al. 2009). De plus, l'activité GTPase de la dynamine est également impliquée dans le remodelage de l'actine-F. En son absence, les podosomes se forment moins fréquemment et présentent un faible taux de remodelage comparé aux cellules témoins (Ochoa, Slepnev et al. 2000).

Des études récentes ont révélé la présence d'un domaine très conservé de liaison à l'actine (ABD) au niveau du domaine tige (« stalk ») de la dynamine (Gu, Yaddanapudi et al. 2010). Le groupe de Sanja Sever a mis en évidence par des expériences *in vitro* de co-sédimentation et de microscopie électronique que la dynamine empaquette les filaments d'actine. Dans les cellules, l'expression de la dynamine mutée au niveau du domaine ABD réduit la formation des fibres de stress et altère l'actine corticale. De plus, sous sa forme polymérisée en anneau, la dynamine lie préférentiellement les filaments courts d'actine qui à leur tour stimulent l'activité GTPase de la dynamine et son auto-assemblage. L'oligomérisation de la dynamine dépendante de l'actine est également dépendante de la capacité de la dynamine à lier et hydrolyser le GTP (Gu, Chang et al. 2014). Enfin, ces auteurs ont démontré que la dynamine polymérisée favorise le décoiffage des filaments d'actine en déplaçant la gelsoline de leur extrémité barbue. Ceci induit alors une polymérisation de l'actine.

En résumé, de nombreuses évidences supportent l'idée que la dynamine agit, directement ou indirectement via la cortactine, sur les filaments d'actine. Son activité GTPase module le réseau d'actine cellulaire en stimulant la polymérisation ou le remodelage de l'actine-F.

## ii. Dynamine et Microtubules

Depuis sa découverte en tant que protéine de liaison des microtubules, la dynamine a été impliquée dans de nombreux processus dépendant de ceux-ci, à savoir, la mitose, la maintenance de la structure du centrosome et dans la dynamique de déstabilisation des microtubules.

Durant l'interphase, la dynamine colocalise avec la  $\gamma$ -tubuline au centrosome. Lors de la formation du fuseau mitotique, la dynamine se retrouve tout au long des microtubules

puis à un stade plus tardif au niveau du corps intermédiaire (Thompson, Skop et al. 2002, Hamao, Morita et al. 2009). Dans des cellules dépourvues de dynamine-2, bien que le fuseau mitotique paraisse normal, le temps de division complète est plus long comparé à des cellules témoins (Liu, Surka et al. 2008). De même, la diminution de l'expression de la dynamine chez *Caenorhabditis elegans* induit un arrêt de la cytokinèse. Ces résultats soutiennent un rôle direct de la dynamine dans la division cellulaire.

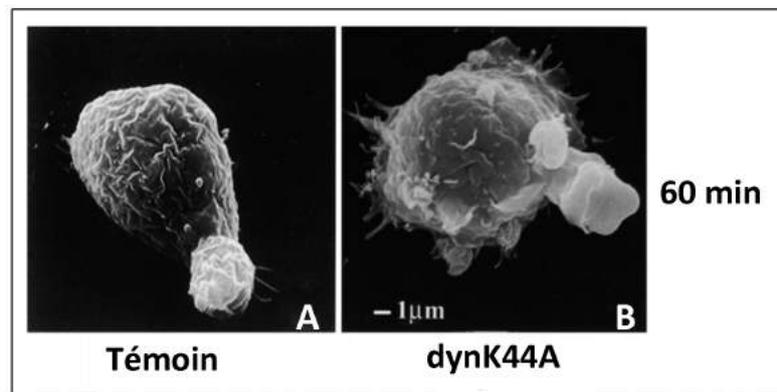
Le rôle de la dynamine dans le maintien de la structure des centrosomes a aussi été démontré par ARN interférence dans des fibroblastes. En absence de dynamine-2, les centrosomes sont séparés d'environ 3  $\mu\text{m}$  sans modification apparente de l'organisation des microtubules. Il reste donc à déterminer le rôle fonctionnel de cette activité de la dynamine (Thompson, Cao et al. 2004).

Le domaine PRD de la dynamine régule négativement son interaction avec les microtubules. En effet, l'expression d'un mutant de la dynamine dépourvu de la portion C-terminale du domaine PRD confère une résistance à la dépolymérisation des microtubules induite par le froid et se localise tout le long des microtubules durant l'interphase (Hamao, Morita et al. 2009). Dans des cellules déplétées en dynamine-2 le nombre de microtubules stables caractérisés par la tubuline acétylée est considérablement augmenté comparé aux cellules exprimant la dynamine-2 (Tanabe and Takei 2009, Henmi, Tanabe et al. 2011). De plus la stabilisation des microtubules induit un défaut de transport des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi. Par conséquent, la dynamine-2 pourrait indirectement contrôler la dynamique des microtubules durant la mitose et influencer le transport vésiculaire.

### c. Dynamine et phagocytose

La dynamine-2 fut identifiée comme étant un acteur moléculaire au cours des phagocytoses FcR, CR3 et zymosan dans une étude menée par l'équipe d'Alan Aderem. Cette GTPase est enrichie dans les coupes phagocytaires et l'expression du mutant dominant négatif DynK44A, qui ne peut ni lier ni hydrolyser le GTP induit un défaut d'internalisation des particules. Dans les cellules exprimant le mutant DynK44A, l'observation par microscopie électronique à balayage des coupes phagocytaires révèle un arrêt de l'extension des pseudopodes à mi-chemin, au niveau la région équatoriale de la particule (Figure 33). Ce

phénotype est également observable suite à l'inhibition de la PI3K par des drogues inhibitrices. Cette étude montre que le recrutement de la dynamine au site de la phagocytose est dépendant de l'activité de cette kinase (Figure 32) (Gold, Underhill et al. 1999). Par la suite, le même groupe rapporte que le recrutement de la dynamine-2 au site de la phagocytose dépend de son interaction avec l'amphiphysine en aval de la PI3K (Gold, Morrissette et al. 2000). De plus, la dynamine-2 joue un rôle dans l'exocytose focalisée des compartiments intracellulaires au site de la phagocytose (Di 2003). En effet la dynamine participe à la formation des vésicules couvertes de clathrine bourgeonnant de la surface du *trans*-Golgi et des endosomes de recyclages (van Dam and Stoorvogel 2002). Des expériences de mesures de capacitances suite à l'initiation de la phagocytose dans des cellules traitées avec des anticorps bloquant l'activité de la dynamine, montre une absence d'augmentation de la capacitance caractéristique d'un défaut d'exocytose (Di, Nelson et al. 2003).



**Figure 33 : Le mutant dominant négatif DynK44A inhibe l'extension des pseudopodes.** Des macrophages murins exprimant de façon transitoire le mutant dynK44A (B) et des cellules témoins (A) sont mis au contact durant 1h avec des érythrocytes opsonisés avec des IgG. Les cellules témoins internalisent totalement les particules tandis que les cellules exprimant dynK44A n'étendent que partiellement les pseudopodes autour des particules. Barre d'échelle 1  $\mu\text{m}$ . (Gold, Underhill et al. 1999)

En outre, des études dans les macrophages (Gold, Underhill et al. 1999, Di, Nelson et al. 2003, Tse, Furuya et al. 2003), des analyses dans les cellules de Sertoli ont rapporté que la dynamine joue un rôle dans la dynamique de l'actine au cours de la phagocytose. L'utilisation d'une drogue inhibitrice de la dynamine telle que le dynasore empêche la

formation des coupes phagocytaires et réduit la polymérisation d'actine (Nakanishi, Abe et al. 2008, Otsuka, Abe et al. 2009). Le rôle de la dynamine au cours de la scission des phagosomes n'a jamais pu être traité indépendamment de son rôle dans la formation des phagosomes.

Une étude sur la maturation des phagosomes, chez *C.elegans*, qui repose sur l'extinction de gènes cibles, révèle que la dynamine joue un rôle durant les étapes précoces de la maturation du phagosomes. En effet, des cellules dans lesquelles l'expression de la dynamine est négativement régulée, présentent une diminution du nombre de corps apoptotiques internalisés ainsi qu'une anomalie de maturation des phagosomes formés malgré tout (Yu, Odera et al. 2006, Kinchen, Doukoumetzidis et al. 2008). Ces auteurs proposent un modèle dans lequel la dynamine lie Vps34, une PI3K de classe III, qui à son tour interagit avec Rab5-GDP inactif à la surface du phagosome. Ils démontrent que ces protéines peuvent être co-immunoprécipitées et forment un complexe tripartite *in vitro*. Toutefois, ce modèle reste à confirmer dans des cellules de mammifères.

Chez *Dictyostelium*, la dynamine A (DymA) joue un rôle essentiel dans la maturation des phagosomes. La perte de fonction de la dynamine A résulte en un blocage de l'acidification et de la protéolyse. Au stade précoce de leur maturation, elle régule la présence de protéines de liaison à l'actine-F, Abp1, sur les phagosomes. Selon le modèle proposé, cette interaction favorise le recyclage précoce à partir du phagosome (Gopaldass, Patel et al. 2012). Une étude récente révèle de nouveaux partenaires de la dynamine A, la famille des protéines EHD (« Eps15 homology domain ») au cours de la maturation des phagosomes. Ces protéines qui interagissent sont recrutées simultanément, précocement (pic à 5 min) mais indépendamment l'une de l'autre à la surface des phagosomes (Gueho, Bosmani et al. 2016). Bien que recrutées ensembles, ces protéines n'exercent pas de fonctions redondantes dans ce contexte. En effet, l'absence de la protéine EHD induit une accélération de la maturation des phagosomes tandis que l'absence de la dynamine A bloque la maturation des phagosomes au stade précoce. Les fonctions détaillées respectives de ces protéines restent à détailler.

## 5. Quelques inhibiteurs de la dynamine.

L'analyse des mécanismes d'action de la dynamine au cours des différentes fonctions cellulaires n'aurait pas été possible sans le développement et l'utilisation de drogues inhibitrices ciblant son activité GTPase ou son domaine de liaison aux phospholipides. En effet, l'utilisation de petites molécules inhibitrices en traitement rapide et efficace a permis de bloquer des processus biologiques dynamiques à des temps d'intérêt et ainsi de mieux appréhender les cinétiques d'action des acteurs moléculaires jouant un rôle au cours de ces processus.

Grâce à un crible sur 16 000 petites molécules, le groupe de Tomas Kirchhausen a identifié une molécule nommée dynasore comme drogue inhibitrice de la dynamine. Celle-ci interfère *in vitro* avec l'activité GTPase de la dynamine-1, dynamine-2 et Drp1. Le dynasore n'empêche pas l'assemblage de la dynamine en polymère ni sa liaison aux phospholipides. Il agit *in vitro* comme un inhibiteur non compétitif de la dynamine-1 et de la dynamine-2. Son action est rapide. Dès 3 minutes d'action, il induit une inhibition de moitié des puits d'endocytose nouvellement formés. Le dynasore est modérément puissant avec une IC<sub>50</sub> de 15 µM *in vitro* et la cellule y est perméable. En utilisant cette drogue sur des cellules Hela, les auteurs ont pu montrer un défaut d'internalisation de la transferrine, des lipoprotéines à faible densité (« Low density lipoprotein », LDL) et de la toxine cholérique. Toutes ces molécules empruntent des voies d'endocytose connues pour leur dépendance à l'activité de scission de la dynamine. De plus l'observation de la formation de vésicules couvertes de clathrine par microscopie électronique révèle qu'en présence de cette drogue, deux phénotypes majoritaires sont détectés : (i) un puits couvert de clathrine lâche en forme de U évasé ; (ii) une vésicule couverte de clathrine presque fermée mais rattachée à la membrane plasmique par un cou membranaire étroit (Macia, Ehrlich et al. 2006, Kirchhausen, Macia et al. 2008).

Par la suite, Dyngo, un composé analogue de la dynamine fut développé (McCluskey, Daniel et al. 2013). Présenté comme plus puissant que le dynasore, il inhibe *in vitro* de façon préférentielle la formation des anneaux de dynamine comparée à la formation en hélice. De plus, il inhibe l'endocytose dépendante de la clathrine mais contrairement au dynasore,

n'inhibe pas l'internalisation de la toxine cholérique. D'autres familles de composés telles que les iminochromènes, les rhodadyne inhibent l'activité GTPase des dynamines 1 et 2 (Hill, Mariana et al. 2010, Robertson, Hadzic et al. 2012). L'iminodyn-22 se lie au domaine GTPase de la dynamine sans interférer avec la liaison du GTP.

L'action spécifique du dynasore et de dyngo a été remise en question suite à des travaux menés dans les souris déficientes pour les trois dynamines (Park, Shen et al. 2013). En effet, malgré l'absence de ses trois protéines cibles, ces drogues inhibent la pinocytose et diminuent le signal d'actine-F au niveau des lamellipodes. Toutefois, il est possible qu'en absence de leurs cibles principales, le dynasore et le dyngo s'orientent sur des cibles de moindre affinité qui normalement ne seraient pas touchées en présence de la dynamine. Par conséquent les effets secondaires mentionnés ne seraient pas existants dans le contexte d'une cellule normale.

Drogues	Caractéristiques <i>in vitro</i>				Effet <i>in vivo</i>	Références
	Liaison du GTP	Activité GTPase	Fission	Liaison aux phospholipides		
Dynasore	+	-	---	+	Inhibition de l'endocytose dynamine dépendante	(Macia, Ehrlich et al. 2006)
Dyngo	+	---	---	+	Inhibition l'endocytose dépendante de la clathrine	(McCluskey, Daniel et al. 2013)
Iminodyn 22	+	---	---	+	Inhibition de l'endocytose dynamine dépendante	(Hill, Mariana et al. 2010)
Rhodadyne	+	---	---	+	Inhibition de l'endocytose clathrine dépendante de la transferrine	(Robertson, Hadzic et al. 2012)
MitMAB	+	-	---	-	Inhibition de l'endocytose dynamine dépendante	(Quan, McGeachie et al. 2007)
OctMAB	+	-	---	-		
<b>Mutants</b>						
K44A	-	-	---	+	Dominant négatif fort	(Damke, Baba et al. 1994)
$\Delta$ PRD	+	+	+++	+	Dominant négatif	(Soulet, Schmid et al. 2006)

**Tableau 3 : Quelques inhibiteurs et mutants de la dynamine et leurs caractéristiques**

D'autres composés inhibent la liaison de la dynamine aux phospholipides sont non compétitifs avec la liaison du GTP. Parmi eux sont retrouvés le MiTMAB et l'OctMAB qui induisent un défaut d'endocytose des récepteurs à la transferrine et de l'EGF (Hill, Odell et al. 2004, Quan, McGeachie et al. 2007).

## OBJECTIFS

---

Au travers de l'introduction, vous avez pu constater que les connaissances des mécanismes cellulaires impliqués dans la phagocytose et en particulier celle induite par les récepteurs Fc $\gamma$ , évoluent jour après jour. En revanche, suite à l'engagement des récepteurs au complément CR3, les mécanismes moléculaires sont moins bien décrits.

Le rôle crucial du réseau d'actine-F et des endomembranes exocytées au cours de la formation et l'extension des pseudopodes a largement été démontré. Cependant, au moment où j'ai débuté mon projet de thèse, une étape de l'internalisation restait encore obscure. Les acteurs moléculaires responsables de la fermeture des coupes phagocytaires et de la scission des phagosomes étaient méconnus. Bien entendu, des études ont tenté d'identifier les différentes protéines indispensables à la fermeture des phagosomes mais du fait de la dynamique du processus, observer le moment et le site de fermeture des phagosomes n'était pas simple.

Dans un premier temps, j'ai donc décidé d'étudier le rôle de la dynamine-2 au cours de la scission des phagosomes. Cette GTPase connue pour sa capacité de scission des membranes, a été démontrée comme étant nécessaire au cours de la phagocytose dépendante des récepteurs Fc $\gamma$  et CR3 (Gold, Underhill et al. 1999). En revanche, son rôle dans la scission du phagosome n'a pas été mis en évidence. Pour répondre à cette question j'ai utilisé des modèles expérimentaux de phagocytose induite par les Fc $\gamma$ R sur cellules fixées visualisées par microscopie à épifluorescence. Mais j'ai également utilisé des cellules vivantes dans un système dédié à la visualisation de la formation et de la fermeture des phagosomes par microscopie à ondes évanescentes (TIRFM, « Total internal reflection fluorescence microscopy ») de haute résolution. Ce système expérimental original a été mis au point dans mon laboratoire et j'ai contribué à l'adapter. Il a fait l'objet de la publication d'un protocole filmé. L'étude du rôle de la dynamine a fait l'objet d'une publication dans le journal « Traffic » (Marie-Anais, Mazzolini et al. 2016).

Dans un second temps, mon objectif était d'analyser la réorganisation du cytosquelette d'actine en aval des récepteurs CR3. Pour ce faire, j'ai observé l'organisation

spatio-temporelle du réseau d'actine au cours de la formation des coupes phagocytaires dans un système de phagocytose frustrée visualisée par microscopie à ondes évanescentes. Parallèlement, j'ai analysé l'influence de la filamine, protéine connue pour son rôle dans la régulation de l'activation des intégrines, mais aussi pour son activité de pontage des filaments d'actine, au cours de la phagocytose. Les résultats obtenus sont préliminaires.

## RESULTATS

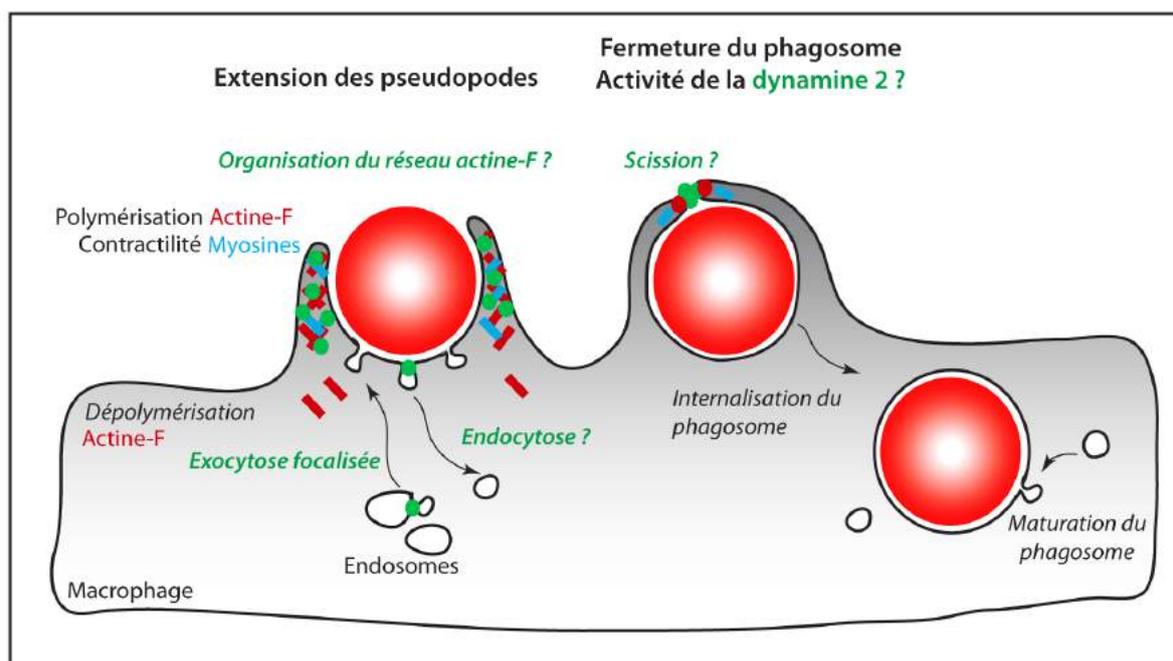
---

1<sup>ère</sup> partie : Rôle de la dynamine-2 au cours de la formation et fermeture des phagosomes dans les macrophages.

### 1. Hypothèses de travail.

L'implication de la dynamine-2 au cours de la phagocytose dans les macrophages a été décrite par plusieurs équipes (Gold, Underhill et al. 1999, Di, Nelson et al. 2003). Elle est requise pour une exocytose focalisée et une internalisation efficace. La dynamine-2 est largement décrite pour sa capacité de scission des vésicules d'endocytose clathrine dépendantes et indépendantes, et des vésicules intracellulaires. Par analogie entre l'endocytose dépendant de la clathrine et la phagocytose, nous avons supposé que cette GTPase pourrait directement être responsable de la scission des phagosomes. De plus, ces dernières années, une fonction émergente de la dynamine-2 dans la régulation du cytosquelette d'actine, nous a laissé penser qu'elle pourrait aussi être impliquée dans le remodelage de l'actine-F au site de la phagocytose. Enfin, il n'était pas à exclure que la dynamine-2 pourrait jouer un rôle dans des phénomènes d'endocytose compensatoires au site de la phagocytose (Figure 34).

Pour élucider ces différentes fonction de la dynamine-2 au cours de la phagocytose, j'ai utilisé principalement deux systèmes expérimentaux: la phagocytose frustrée et phagocytose en trois dimensions (phagocytose 3D) visualisées par TIRFM.



**Figure 34 : Schéma représentatif des activités potentielles de la dynamine 2 au cours de la formation et fermeture des phagosomes.** Lors de la formation des coupes phagocytaires caractérisée par l'extension des pseudopodes, la dynamine 2 (en vert) pourrait jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine (en rouge) et la scission de vésicules d'endocytose dépendantes de la clathrine. Puis lors de la fermeture des phagosomes, la dynamine 2 pourrait être responsable de la scission du phagosome. Il a été démontré qu'elle est impliquée dans la génération de vésicules nécessaires à l'exocytose focalisée.

## 2. Systèmes expérimentaux.

Le modèle de particule internalisée utilisé pour analyser la phagocytose au cours de mon étude est le globule rouge frais. Il mesure 3  $\mu\text{m}$  environ et entre dans la catégorie des particules de grandes tailles ( $> 0,5 \mu\text{m}$ ). Il s'agit d'une particule inerte qui n'est pas du tout reconnue par les macrophages lorsque le globule rouge n'est pas altérée ou senescent, mais qui est facilement opsonisable. Les macrophages murins immortalisés de la lignée RAW264.7 ont été largement utilisés pour étudier la phagocytose. Bien que moins « agressifs » (phagocytose plus lente et moins efficace en termes de maturation et dégradation du matériel ingéré) que les macrophages primaires, les macrophages murins de cette lignée ont été très utilisés pour disséquer les mécanismes moléculaires impliqués durant la formation des phagosomes, qui ont été largement confirmés dans les macrophages primaires. De plus,

du fait de la facilité à les transfecter, les RAW264.7 sont un modèle de choix pour la surexpression de protéines mutées ou sauvages.

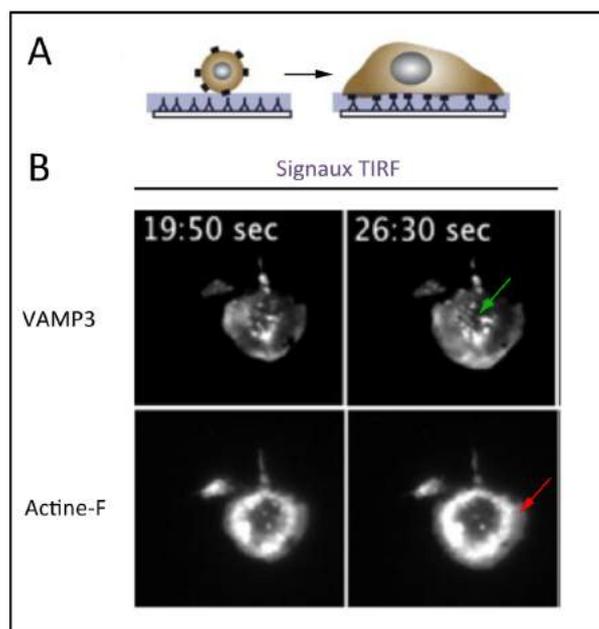
#### a. Phagocytose frustrée

Pour rappel, lors de la formation des phagosomes, la polymérisation d'actine constitue la force motrice qui permet l'extension membranaire nécessaire à la formation des pseudopodes. Ces extensions membranaires sont également possible grâce à l'apport de membranes que constituent les vésicules issues des compartiments intracellulaires tels que les endosomes de recyclages (VAMP3+), les endosomes tardifs (VAMP7+), le réticulum endoplasmique ou encore les lysosomes (Desjardins 2003, Braun, Fraisier et al. 2004, Braun, Deschamps et al. 2007, Samie, Wang et al. 2013, Niedergang 2016).

L'organisation spatio-temporelle du cytosquelette d'actine et des vésicules durant la formation des pseudopodes a été mise en évidence grâce à un système expérimental appelé phagocytose frustrée. Le système repose sur l'utilisation d'une lignée cellulaire de macrophages murins exprimant de façon transitoire des protéines couplées à une étiquette fluorescente telles que le peptide lifeact-mCherry capable de lier l'actine-F et la protéine de fusion VAMP3-GFP caractéristique des endosomes de recyclages. Les macrophages sont déposés sur une lamelle de verre préalablement recouverte par des IgG. Ainsi la phagocytose dépendante des FcγRs est mimée par des macrophages qui s'étaleront sur la lamelle en formant une « zone phagocytaire frustrée » (Marion, Mazzolini et al. 2012) (Figure 35A). Ce processus est entièrement visualisé par microscopie à onde évanescente. Il est possible d'observer la formation d'un anneau d'actine-F qui se polymérise à ses extrémités et se dépolymérise en son centre, là où des vésicules de recyclage sont en mouvements (Figure 35B). Ceci correspondrait à la polymérisation d'actine dans les pseudopodes en extension et la dépolymérisation à la base de la coupe phagocytaire où fusionnent des vésicules de recyclage.

La microscopie à onde évanescente utilise une onde pour exciter les fluorophores dans une zone mince à l'interface entre un solide transparent (lamelle) et un liquide (milieu de culture cellulaire). Cette onde illumine environ 100 nm à partir de la lamelle de verre et permet la visualisation d'événements moléculaires proches de la membrane plasmique.

C'est pour cela que cette microscopie est beaucoup utilisée dans l'étude des événements d'endocytose et d'exocytose. Elle permet une amélioration du rapport signal/bruit de fond en limitant le recueil de fluorescence en dehors du plan d'intérêt. De plus l'épaisseur de la région illuminée permet de diminuer la cytotoxicité due à l'éclairage (Johnson, Jaiswal et al. 2012).



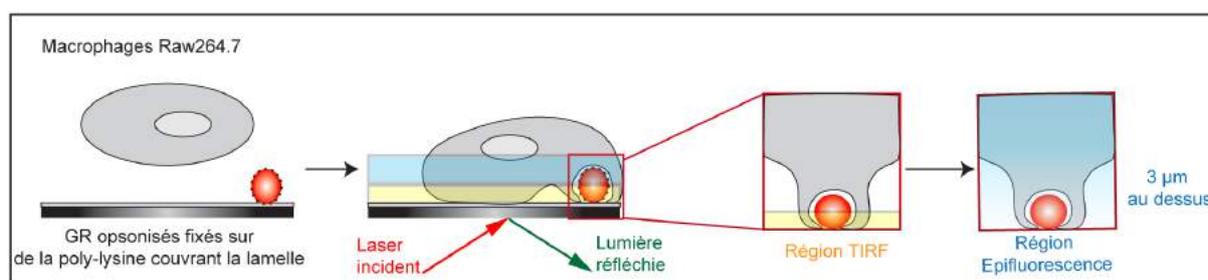
**Figure 35: Organisation spatio-temporelle de l'actine-F et de VAMP3 au cours de la phagocytose frustrée.** (A) Représentation schématique de la phagocytose frustrée. Les IgG couvrent la lamelle. Les récepteurs Fc reconnaissent leur ligand et induisent le processus d'internalisation. (B) Les macrophages murins RAW264.7 expriment transitoirement Lifeact-mCherry (panel du bas) et VAMP3-GFP (panel du haut). Les images de l'étalement de la cellule dans les différents canaux sont acquises alternativement par TIRFM à 37°C toutes les 100 ms durant 120 s. La flèche verte indique le centre de la région d'étalement où s'accumulent les vésicules VAMP3 positives. La flèche rouge indique la périphérie de la zone d'étalement où l'anneau d'actine polymérise. Adapté de (Marion, Mazzolini et al. 2012).

### b. Phagocytose 3D

L'approche expérimentale par phagocytose frustrée a été complétée par le développement d'un nouveau système dédié à l'étude de l'étape de fermeture des phagosomes appelé « phagocytose 3D » ou « test de fermeture du phagosome » (Marie-Anais, Mazzolini et al. 2016). En effet jusqu'à cette nouvelle méthode, aucune technique ne permettait de stabiliser l'extension des pseudopodes au delà de la région équatoriale des particules, et la visualisation du site de fermeture des phagosomes était donc très difficile à

capturer par vidéomicroscopie « classique ». Habituellement, les expériences de phagocytose sont réalisées en déposant des particules cibles au dessus des cellules adhérentes. Ainsi les particules sont directement mises au contact de la face dorsale des cellules, qui, phagocytent donc vers le haut.

Au laboratoire, Julie Mazzolini a « renversé » le système. En effet, les particules cibles sont fixées de façon non covalente à la surface d'une lamelle de verre, puis les macrophages qui ont été décrochés sont déposés au dessus des particules. Ils entourent et détachent la particule qu'ils phagocytent au niveau de leur surface ventrale. L'extrémité des pseudopodes est donc apposée à la surface de verre au moment de la fermeture du phagosome. Cette conformation permet de visualiser en temps réel par microscopie à onde évanescente (TIRFM), les évènements moléculaires qui se déroulent au site de fermeture des phagosomes.

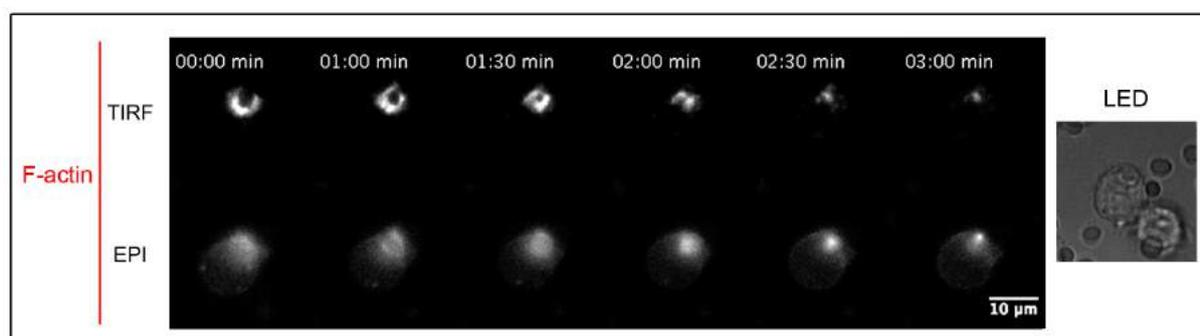


**Figure 36 : Représentation schématique de la phagocytose 3D analysé par TIRFM.** La phagocytose 3D est réalisée à l'aide macrophages qui expriment transitoirement une ou deux protéines marquées par fluorescence. Les macrophages sont déposés sur des GR opsonisés avec des IgG et fixés de façon non covalente sur des lamelles de verre couvertes de poly-lysine. Les images sont enregistrées en mode TIRF pour détecter le site de fermeture des phagosomes et en épifluorescence pour détecter la base de la coupe phagocytaire. (Marie-Anais, Mazzolini et al. 2016)

L'onde évanescente est générée lorsque la lumière arrive avec un angle d'incidence faible à la surface de la lamelle verre. Ainsi, la lumière ne peut se propager dans le milieu cellulaire/liquide et est réfléchi. Elle illumine le milieu cellulaire/liquide dans une zone mince que appelée région TIRF. Le microscope iMIC TILL Photonics que nous utilisons nous permet d'alterner entre un mode TIRF et un mode épifluorescence (EPI) qui illumine toute la cellule. Par conséquent, l'utilisation de la microscopie à ondes évanescentes en alternance avec l'épifluorescence dans notre système de phagocytose 3D, permet d'observer à la fois

l'extrémité des pseudopodes et le site de fermeture des phagosomes en mode TIRF, ainsi que la base de la coupe phagocytaire en épifluorescence (EPI) (Figure 36).

C'est ainsi que Julie Mazzolini a montré qu'à l'extrémité des pseudopodes l'anneau d'actine-F se referme autour de la particule en un point fluorescent intense tandis qu'à la base de la coupe phagocytaire le signal est flou ce qui est significatif de la dépolymérisation d'actine-F (Figure 37).

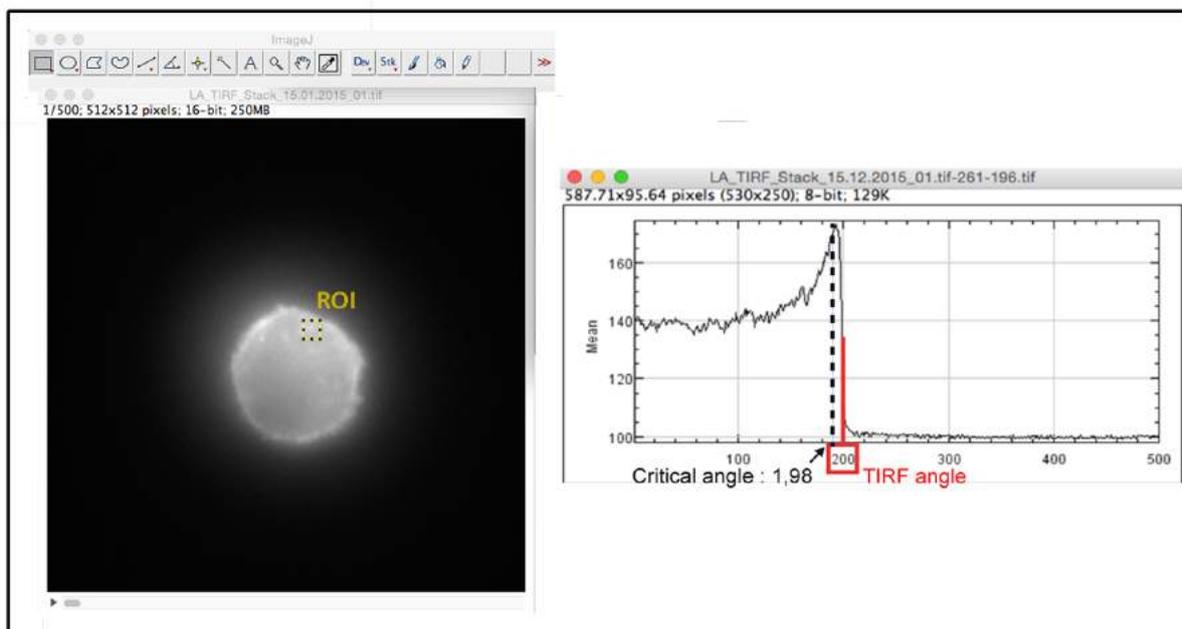


**Figure 37: L'actine-F s'accumule en un point sur le site de fermeture du phagosome.** Une phagocytose 3D a été réalisée avec des macrophages RAW264.7 exprimant transitoirement le peptide Lifeact-mCherry qui lie l'actine-F. Le signal d'actine-F à l'extrémité des pseudopodes est acquis en mode TIRF (en haut). Le signal à la base de la coupe phagocytaire est acquis en épifluorescence (EPI en bas). Le GR internalisé à 3 min est visible à la lumière transmise (LED). Barre d'échelle 10 μm (Marie-Anais, Mazzolini et al. 2016).

Afin de rendre la technique de phagocytose 3D plus visible et accessible, nous avons décidé de publier le détail du protocole expérimental filmé dans le journal *"Journal of Visualised Experiments"*. Celui-ci est actuellement sous presse (ANNEXE2) (Marie-Anais, Mazzolini et al. 2016). Il décrit les étapes d'opsonisation des GR, de fixation non covalente sur la lamelle de verre, les réglages du microscope et notamment la méthode de détermination de l'angle d'incidence (angle TIRF) des lasers nécessaires à la génération de l'onde évanescente.

Dans notre système, nous déterminons l'angle TIRF de façon systématique. En effet, sur une cellule fluorescente type, un protocole initie des captures d'images après illumination de la surface par les lasers suivant différents angles d'incidence de 0° à 5° avec un incrément de 0,01°. Un tracé du profil de fluorescence de la cellule (« Plot 7 axis profile ») sur le logiciel

d'imagerie ImageJ permet de déterminer l'angle critique qui correspond à l'angle où l'intensité de fluorescence de la cellule atteint son maximum avant une diminution brutale. L'angle TIRF est supérieur à cet angle (Figure 38).



**Figure 38: Détermination de l'angle TIRF sur Image J.** En utilisant la fonction « Plot Z-axis profile » sur ImageJ, le tracé de fluorescence d'une région d'intérêt (ROI en jaune sur la cellule fluorescence) est obtenu. La position x du maximum de fluorescence atteint correspond à l'angle critique (ligne pointillée noire). Toute valeur supérieure à cet angle peut être utilisée comme angle TIRF. Par exemple, 2,00° peut être choisi (ligne rouge). Adapté de (Marie-Anais, Mazzolini et al. 2016).

En résumé, la phagocytose frustrée et la phagocytose 3D permettent de suivre et disséquer la localisation et le comportement des acteurs moléculaires d'intérêt au cours de la formation et fermeture des coupes phagocytaires dans des cellules vivantes. Ils permettent d'observer en temps réel les effets de drogues sur le processus étudié. En les utilisant j'ai suivi le comportement de la dynamine-2 conjointement à l'actine-F au cours de la phagocytose dépendante des FcγRs. J'ai utilisé également des méthodes plus classiques telles que l'immunofluorescence sur cellules fixées et des expériences de co-immunoprécipitations.

### 3. Matériels et Méthodes

- *Cellules, transfections*

Les macrophages murins RAW264.7 (ATCC<sup>®</sup> TIB-71<sup>™</sup>) sont cultivés en milieu complet (RPMI 1640-Glutamax, HEPES 10 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 50  $\mu$ M, pyruvate de sodium 1 mM, L-glutamine 2 mM, sérum de veau fœtal 10% (SVF).

Ces cellules sont transfectées par électroporation avec le kit Optimix (Cell Project) dans des cuvettes 0,4 cm à 250 V, 950  $\mu$ F dans un appareil Gene Pulser II (Biorad) pour permettre la surexpression de plasmides. Habituellement, une boîte de 100 mm contenant des cellules subconfluentes et 20  $\mu$ g de plasmides (10  $\mu$ g/ plasmides lors de co-transfections) sont utilisés pour chaque transfection. Les cellules sont remises en culture en milieu complet durant 18 à 20h à 37°C 5% CO<sub>2</sub> dans des boîtes de culture 100 mm avec ou sans lamelles de verre.

- *Anticorps et plasmides*

Les anticorps (Ac) suivants ont été utilisés : l'Ac polyclonal de lapin anti-globules rouges de mouton (ICN), l'Ac polyclonal d'âne F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG de lapin couplé à l'AMCA (Jackson Immunoresearch), l'Ac polyclonal de chèvre anti-dynamine-2 (C-18) (Santa Cruz), l'Ac monoclonal de souris anti-GFP (Roche), l'Ac monoclonal de souris anti-actine (clone AC-40) (Sigma Aldrich). La phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa 546 (Molecular Probes) est utilisée pour marquer l'actine-F.

Les plasmides codant pour le peptide Lifeact-mCherry (donné par G.Montagnac, Institut Curie), DynWT-GFP et DynK44A-GFP (donnés par M. McNiven, Mayo Clinic), clathrine-DsRed (donné par T. Kirchhausen, Harvard Medical School) ont été utilisés.

- *Réactifs*

Le modèle de particules à internaliser utilisé est le globule rouge de mouton (Euromedex). Les inhibiteurs de l'activité GTPases de la dynamine qui ont été utilisés au cours des différents tests de phagocytose sont :

- Dynasore (Sigma Aldrich) à 80 $\mu$ M au cours des expériences de phagocytose classique et 100  $\mu$ M dans les expériences de phagocytose 3D
- Iminodyne-22<sup>TM</sup> (Abcam) à 60  $\mu$ M dans les expériences de phagocytose 3D

Les inhibiteurs de la polymérisation de l'actine utilisés sont:

- Latrunculine A (Sigma Aldrich) à 0,26  $\mu$ M durant des expériences de phagocytose 3D.
- Cytochalasine D (Sigma Aldrich) à 0,2  $\mu$ g/ml durant des expériences de phagocytose frustrée.
- CK-869 (Calbiochem) inhibiteur du complexe Arp2/3 utilisé à 0,01 ng/ml dans les expériences de phagocytose 3D.

- *Oponisation des globules rouges avec des IgG.*

Les globules rouges (GR) dont le nombre utilisé varie en fonction de l'expérience de phagocytose réalisée, sont lavés deux fois dans 100  $\mu$ l de PBS1X/BSA 0,1% à 600 g durant 4min. Le culot est resuspendu dans une solution de PBS1X/BSA 0,1% additionnée de l'IgG de lapin anti-GR à une concentration subagglutinante au préalable déterminée par test d'hémagglutination. Les GR sont alors incubés 30 min à température ambiante en rotation lente. Ils sont ensuite centrifugés (600 g, 4 min) et lavés deux fois en PBS1X/BSA 0,1%. Le culot est resuspendu dans un milieu dit de « phagocytose » dépourvu de sérum de veau foetal (SVF) (RPMI 1640 Glutamax, HEPES 10 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 50  $\mu$ M, L-glutamine 2 mM, pyruvate de sodium 1 mM) et préchauffé à 37°C.

- *Phagocytose classique et Immunofluorescence*

Les GR opsonisés (3.10<sup>6</sup> GR/puit de 1,9 cm<sup>2</sup>) avec des IgG sont mis au contact, durant différents temps (2 min, 5 min, 60 min), avec des macrophages murins RAW264.7 (3.10<sup>5</sup> cellules/lamelle) adhérents sur des lamelles de verre ( $\varnothing$ 12 mm). Après internalisation des GR, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4%/sucrose durant 45 min à 4°C. Le PFA est neutralisée avec du NH<sub>4</sub>CL (50 mM) en PBS1X durant 7 min. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec du PBS1X/SVF 2% /saponine 0,05% afin de marquer l'actine-F

(phalloïdine-Alexa 546), et les globules rouges (F(ab)<sub>2</sub> anti-IgG de lapin couplé à l'AMCA). Les lamelles sont montées sur lame en milieu de montage Fluoromount G.

Le nombre de GR internalisés est compté sur cinquante cellules observées par microscopie à épifluorescence (Microscope LEICA DMI6000 inversé, objectif 100x (1,4 NA), caméra MicroMAX (Princeton Instruments)). Les images acquises ont été traitées avec le logiciel ImageJ.

- *Phagocytose frustrée et Phagocytose 3D*

La veille des expériences de phagocytose frustrée et 3D, les cellules RAW264.7 cultivées en milieu complet (RPMI 1640-Glutamax, HEPES 10 mM, β-mercaptoéthanol 50 μM, pyruvate de sodium 1 mM, L-glutamine 2 mM, sérum de veau foetal 10% (SVF)) sont transfectées par électroporation (Biorad) avec des plasmides codant pour des protéines d'intérêts fusionnées à une protéine fluorescente.

- *Phagocytose frustrée*

Les cellules transfectées sont déposées sur une lamelle de verre (Ø 35 mm) contenue dans des boîtes (MatTek). Ces lamelles ont préalablement été lavées trois fois avec du PBS1X, puis incubée toute la nuit à 4°C avec de l'anticorps IgG anti-GR de mouton dilué (1/200) en PBS1X. L'adhésion des cellules à la surface opsonisée est suivie par microscopie à ondes évanescentes (iMIC, TILL Photonics). Le microscope est équipé d'une caméra CCD refroidie (iXonEM, Andor Technology), d'une chambre thermostatée à 37°C et du logiciel « Live Acquisition » de contrôle. Les vidéos sont traitées avec le logiciel ImageJ (Figure 1A de l'article).

- *Phagocytose 3D*

Les lamelles de verre des boîtes sont traitées durant 30 min avec de la poly-lysine 0,01% à température ambiante, puis rincées trois fois avec du PBS1X. Ensuite les GR (7. 10<sup>6</sup>/lamelles) opsonisés avec des IgG qui ont resuspendus dans du milieu de phagocytose dépourvu de rouge de phénol (RPMI 1640 Glutamax, HEPES 10 mM, β-mercaptoéthanol 50 μM, L-glutamine 2 mM, pyruvate de sodium 1 mM) sont distribués dans les boîtes contenant les lamelles. Les GR sont alors centrifugés 2 min à 500 g. Les GR sont lavés par du PBS1X/BSA 10% puis incubés 30 min à température ambiante avec du PBS1X/BSA 10%. Les

GR sont lavés trois fois avec du PBS1X avant d'être mis dans du milieu phagocytose dépourvu de rouge de phénol. Les macrophages RAW 264.7 transfectés la veille sont déposés sur les GR. La phagocytose est suivie par microscopie à ondes évanescentes (iMIC, TILL Photonics). Le microscope est équipé d'une caméra CCD refroidie (iXonEM, Andor Technology), d'une chambre thermostatée à 37°C et du logiciel « Live Acquisition » de contrôle. Les vidéos sont traitées avec le logiciel ImageJ (Figure 1C de l'article *Traffic* et ANNEXE 2).

#### 4. Résumé des principaux résultats

A l'aide d'un système de « phagocytose 3D » que nous avons spécialement développé pour visualiser la formation et la fermeture des phagosomes sur cellule vivante, nous avons pu démontrer le recrutement simultané de la dynamine-2 et de l'actine-F durant la formation des coupes phagocytaires. Nous avons également mis en évidence le rôle crucial de la dynamine-2 dans la scission du phagosome et la mise en place d'une régulation croisée entre la dynamine-2 et l'actine-F tout au long de l'étape d'internalisation de la phagocytose.

Dans cette partie, je vous présenterai les principaux résultats obtenus, suivis de l'article publié.

##### a. La dynamine-2 est recrutée à la coupe phagocytaire durant l'extension et la fermeture des pseudopodes.

Dans un premier temps, afin d'observer la localisation de la dynamine-2 au cours de l'étape précoce d'extension des pseudopodes, nous avons réalisé des expériences de phagocytose frustrée visualisée par microscopie à ondes évanescentes. Les macrophages murins RAW264.7 transitoirement transfectés pour exprimer la dynamine-2 sauvage fusionnée à la GFP (Dyn-2-GFP) et le peptide Lifeact, qui se fixe à l'actine polymérisée, fusionnée à la mCherry (Riedl, Crevenna et al. 2008), ont été mis au contact d'une surface opsonisée avec des IgGs afin de cibler les FcγRs présents à leur surface. Lors de la formation d'une coupe phagocytaire « frustrée », la dynamique de polymérisation de l'actine et le recrutement de la dynamine-2 sont enregistrés par microscopie à ondes évanescentes

(TIRFM) (Figure 1B de l'article). L'actine-F forme un anneau qui se polymérise à ses extrémités et se dépolymérise en son centre comme visualisée précédemment (Marion, Mazzolini et al. 2012). Parallèlement, la dynamine-2 est recrutée dans la zone d'étalement de la cellule de façon homogène puis par la suite, forme également un anneau qui co-localise avec l'actine-F.

Dans un second temps, nous avons observé le devenir de la dynamine-2 et de l'actine-F à l'extrémité des pseudopodes en utilisant la « phagocytose 3D » visualisée par TIRFM. Nous assistons à la fermeture de l'anneau d'actine-F et de dynamine-2, entourant la particule, en un point fluorescent intense qui disparaît progressivement (Figure 1D-E de l'article).

La visualisation de la dynamine-2 à l'extrémité des pseudopodes suggère qu'elle joue un rôle dans la scission du phagosome.

#### b. La dynamine-2 ne colocalise pas avec la clathrine durant la formation et fermeture des phagosomes.

Du fait du rôle connu de la dynamine-2 dans la scission des vésicules d'endocytose dépendante de la clathrine, nous avons voulu savoir si la présence de la dynamine-2 au site de la phagocytose était due à la présence de puits de clathrine. En utilisant le système de « phagocytose 3D » avec des macrophages murins RAW264.7 exprimant la dynamine-2-GFP et la clathrine-DsRed, visualisée par TIRFM, nous avons pu démontrer que la présence de la dynamine-2 au site de la phagocytose n'est pas due à la présence de clathrine à l'extrémité des pseudopodes. En effet celle-ci est totalement exclue du site de la phagocytose, confirmant les données publiées (Braun, Deschamps et al. 2007) alors qu'elle est visualisable sous forme de points dans la région adhérente de la cellule (Figure 2 de l'article).

#### c. L'inhibition de l'activité GTPase de la dynamine-2 induit un défaut de phagocytose et de polymérisation d'actine.

Comme décrit, l'inhibition de l'activité GTPase de la dynamine-2 par surexpression du mutant dominant négatif Dyn2K44A-GFP qui ne lie et n'hydrolyse pas le GTP, ou par traitement au dynasore (80  $\mu$ M) induit un défaut d'internalisation des globules rouges

opsonisées avec des IgGs (Figure 3 de l'article). Cette inhibition n'est pas due à un défaut d'association entre les particules opsonisées et les récepteurs phagocytaires car le nombre de particules associées aux macrophages en présence ou en absence de l'activité GTPase de la dynamine-2 n'est quasiment pas modifié. L'inhibition de phagocytose a été confirmée dans des macrophages murins RAW264.7 déplétés par ARN interférence pour la dynamine-2.

Ainsi l'inhibition de l'activité GTPase ou de l'expression de la dynamine-2 empêche la formation des phagosomes.

Afin de mieux caractériser l'effet de l'absence d'activité GTPase de la dynamine-2 au cours de la formation des coupes phagocytaires, nous avons quantifié le signal d'actine-F présent à la coupe phagocytaire dans des macrophages d'une part traités ou non avec du dynasore ; d'autre part transfectés séparément avec la dynamine-2-GFP sauvage, le mutant Dyn-2K44A ou la GFP seule. L'absence d'activité GTPase de la dynamine-2 induit un défaut d'accumulation d'actine-F à la coupe phagocytaire (Figure 3 de l'article). La dynamine-2 active est donc requise pour la polymérisation initiale de l'actine-F au site de la phagocytose.

#### d. L'inhibition en temps réel de l'activité GTPase de la dynamine-2 bloque l'extension et la fermeture des coupes phagocytaires.

L'une des plus grandes difficultés dans la détermination des protéines impliquées au cours de la fermeture des phagosomes, était l'impossibilité de bloquer le mécanisme d'internalisation au moment précis de la scission. En utilisant le système de « phagocytose 3D » et l'addition de dynasore sur les cellules vivantes au moment de l'accumulation de la dynamine-2 en un point correspondant au site de fermeture des phagosomes, nous avons pu mettre en évidence une persistance et une accumulation du signal dynamine-2-GFP contrairement au phénotype observé lors du déroulement normal du processus sans inhibition de la dynamine-2. Le globule rouge visible en contraste de phase reste accolé à la membrane plasmique. La scission n'a pas eu lieu (Figure 4B de l'article).

Parallèlement, à un stade plus précoce de l'extension des pseudopodes qui se caractérise par l'accumulation d'actine-F et de dynamine 2 autour de la particule, l'addition de dynasore conduit à la formation d'une coupe phagocytaire abortive. Nous avons observé une perte

rapide du signal d'actine-F et une perte progressive de la dynamine-2 au site de la phagocytose. Le globule rouge en contact avec la cellule n'est pas internalisée (Figure 4A de l'article).

Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une autre drogue inhibitrice de la dynamine-2 appelée Iminodyne-22<sup>TM</sup>. L'addition de l'Iminodyne-22<sup>TM</sup> induit une accumulation et une persistance de la dynamine-2 à l'extrémité des pseudopodes accompagnée d'actine-F juste avant sa disparition progressive. Le globule rouge se retrouve bloqué à la membrane plasmique (Figure 4C de l'article).

L'ensemble de ces résultats démontre que la dynamine-2 est requise pour le maintien et l'extension du réseau d'actine-F durant la formation des pseudopodes mais également pour son activité de scission du phagosome.

#### e. La dynamine-2 et l'actine-F interagissent durant la formation des phagosomes.

Des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées dans le but de mieux caractériser l'interaction potentielle entre la dynamine-2 et l'actine-F au cours de la phagocytose. En parallèle, une cinétique de phagocytose a été réalisée avec des macrophages RAW264.7 exprimant la dynamine-2-GFP ou la GFP seule comme témoin. A 10 min de phagocytose, nous avons observé une co-immunoprécipitation de l'actine avec la dynamine-2-GFP qui n'existe pas lors de l'immunoprécipitation avec la GFP seule. Ce résultat confirme une interaction directe ou indirecte entre la dynamine-2 et l'actine (Figure supplémentaire 1 de l'article).

#### f. L'inhibition en temps réel de la polymérisation d'actine empêche le recrutement et l'activité de la dynamine-2.

Du fait de la diminution rapide de la polymérisation d'actine lors de l'inhibition de l'activité GTPase de la dynamine, nous nous sommes intéressés à l'interdépendance entre ces deux protéines. Nous avons utilisés des drogues inhibitrices de la polymérisation d'actine (latrunculine A, cytochalasine D, CK-869) lors d'expériences de phagocytose frustrée ou 3D

sur des macrophages murins exprimant de façon transitoire la dynamine-2-GFP et le peptide lifeact-mCherry (Figure 5 de l'article).

L'addition de la cytochalasine D au cours de l'étalement de la cellule sur une surface opsonisée par des IgG, mimant la formation des coupes phagocytaires, arrête la formation de l'anneau d'actine-F caractéristique de l'extension des pseudopodes et empêche le recrutement de la dynamine-2 dans la zone d'étalement. Par conséquent la polymérisation initiale de l'actine-F au site de la phagocytose est nécessaire au recrutement de la dynamine-2.

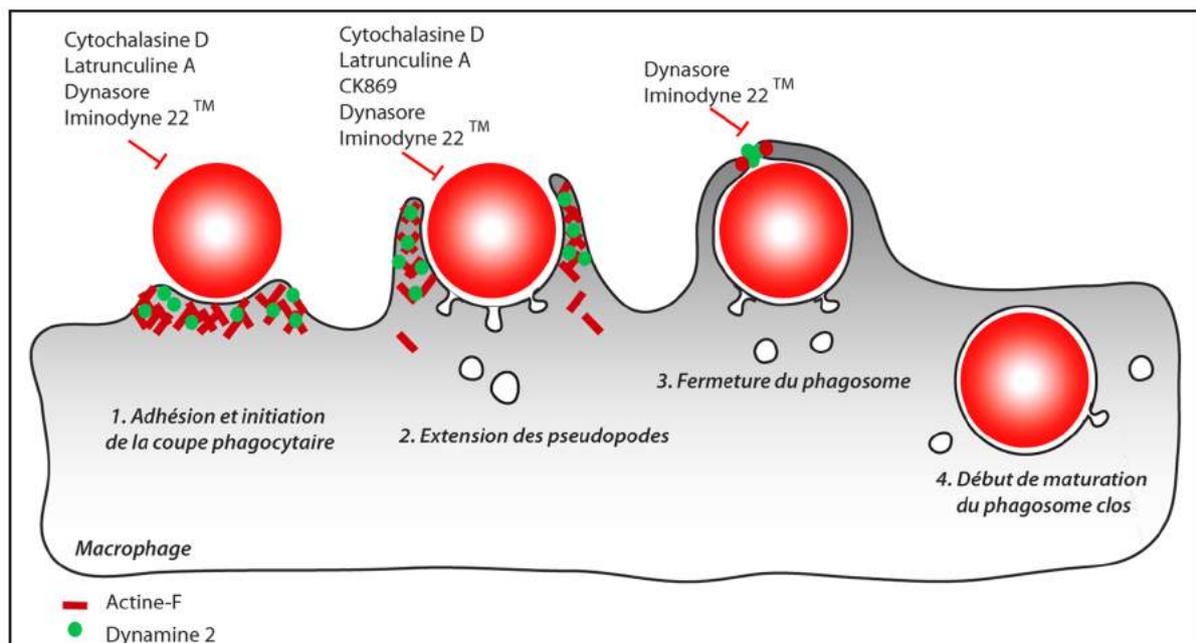
L'addition de latrunculine A au moment de la fermeture des coupes phagocytaires autour des GR opsonisés par des IgG, visualisée par TIRFM, démontre un arrêt rapide de la polymérisation d'actine-F à l'extrémité des pseudopodes avec une accumulation transitoire de dynamine-2 ce qui aboutit à l'expulsion de la particule qui était presque internalisée. La polymérisation d'actine et son accumulation au site de fermeture des phagosomes sont nécessaires au recrutement ou à l'activité de la dynamine-2 lors de la scission du phagosome.

Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur du complexe Arp2/3 sur un macrophage en cours d'internalisation de deux globules rouges induit d'une part un arrêt et une stabilisation des pseudopodes autour d'une particule, qui ne sera donc pas internalisée, et d'autre part le second globule rouge est totalement internalisé car l'extension des pseudopodes au moment de l'addition de la drogue inhibitrice CK-869 était beaucoup plus avancé. En effet l'actine-F et la dynamine-2 étaient accumulées en un point au site de fermeture des phagosomes au moment de l'ajout du CK-869. Ce résultat suggère donc que la polymérisation d'actine-F au moment de la fermeture du phagosome n'est pas requise pour la scission du phagosome.

### g. Conclusion

L'ensemble de ces résultats indique que lors de la formation des coupes phagocytaires, la polymérisation initiale d'actine-F permet le recrutement de la dynamine-2 au site de phagocytose. L'accumulation de cette dernière permet une augmentation de la

polymérisation d'actine-F qui favorise l'extension des pseudopodes autour de la particule à internaliser. Ainsi cette polymérisation favorise la formation et la maintenance d'un cou de phagosome où la dynamine-2 s'accumule et exerce son activité de scission (Figure 39).



**Figure 39 : Modèle d'organisation de la dynamine-2 et de l'actine durant la formation du phagosome.** La liaison d'une particule opsonisée pour cibler le FcγR induit une signalisation intracellulaire conduisant à la polymérisation de l'actine (1) nécessaire à l'extension des pseudopodes (2). La dynamine-2 est recrutée au même moment avec l'actine-F et dépend de sa polymérisation. L'activité GTPase de la dynamine-2 soutient la polymérisation d'actine-F. Progressivement l'actine-F se dépolymérise à la base de la coupe phagocytaire alors qu'elle continue à polymériser à l'extrémité des pseudopodes. La dynamine-2 s'accumule également à ces extrémités et est impliquée dans la scission de la membrane. Cette scission membranaire nécessite la liaison et l'hydrolyse du GTP par la dynamine-2. Une régulation croisée entre la dynamine-2 et l'actine-F est nécessaire à la formation et fermeture des phagosomes (3). Le phagosome clos initie sa maturation (4).

## 5. Article publié.

# Dynamin-Actin Cross Talk Contributes to Phagosome Formation and Closure

Florence Marie-Anaïs<sup>1,2,3</sup>, Julie Mazzolini<sup>1,2,3,4</sup>, Floriane Herit<sup>1,2,3</sup> and Florence Niedergang<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France.

<sup>2</sup>CNRS, UMR 8104, Paris, France.

<sup>3</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

<sup>4</sup>Current address: Centre for Neuroregeneration, The University of Edinburgh, Edinburgh, UK

\*Corresponding author: Florence Niedergang, florence.niedergang@inserm.fr

## Abstract

Phagocytosis is a mechanism used by macrophages to internalize and eliminate microorganisms or cellular debris. It relies on profound rearrangements of the actin cytoskeleton that is the driving force allowing plasma membrane extension around the particle. The closure step of phagocytosis, however, remains poorly defined. We used a dedicated experimental setup with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) to monitor phagosome formation and closure in three dimensions in living cells. We show that dynamin-2, which mediates the scission of endocytic vesicles, was recruited early and concomitantly with actin during phagosome formation. Dynamin-2 accumulated at the site of phagosome closure in living macrophages. Inhibition of

its activity with dominant negative mutants or drugs demonstrated that dynamin-2 is implicated in actin dynamics and pseudopod extension. Depolymerization of actin led to impaired dynamin-2 recruitment or activity. Finally, we show that dynamin-2 plays a critical role in the effective scission of the phagosome from the plasma membrane. Thus, we establish that a cross talk between actin and dynamin takes place for phagosome formation and closure before dynamin functions for scission.

**Keywords** actin, dynamin, phagocytosis, pseudopods, macrophages, scission

Received 9 July 2015, revised and accepted for publication 2 February 2016, uncorrected manuscript published online 5 February 2016

Phagocytosis is the mechanism of uptake of relatively large particulate material into an intracellular compartment called the phagosome (1). It is initiated by phagocytic receptors, including receptors for various surface components of microorganisms or receptors specific for opsonins, such as immunoglobulins [Fc receptors (FcRs)] or complement [complement receptors (CRs)] (2,3). Phagocytosis is used by innate immune cells including macrophages, to internalize microorganisms or cellular debris. It is crucial for pathogen clearance and resolution of inflammation, and also participates in the regulation of immune responses.

Upon activation, these receptors trigger intracellular signaling leading to a profound remodeling of the cytoskeleton and the plasma membrane (1–4). FcR-mediated phagocytosis requires actin

polymerization that is driven by the small GTPases Rac1, Rac2 and Cdc42. Downstream effectors, such as the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) activate the Actin-Related Protein 2/3 complex (Arp2/3) that nucleates actin filaments. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) is essential for the initial actin polymerization that drives pseudopod formation, and its conversion to PI(3–5)P<sub>3</sub> is required for pseudopod extension and phagosome closure. In addition, efficient phagocytosis relies on focal exocytosis of intracellular compartments that contributes to the release of membrane tension and recruits signaling components required for efficient F-actin turnover, allowing efficient phagosome formation around large particles (5,6). Thus, a tight regulation in time and space between vesicles transport, signal and actin is required for efficient phagosome formation.

www.traffic.dk 487

Notwithstanding the increasing amount of knowledge on the mechanisms involved downstream of FcRs for the phagocytic cup formation, the mechanism and molecular players required for phagosome closure and membrane scission remain poorly defined, possibly because these were difficult steps to visualize and monitor.

Here we used the three-dimensional phagocytosis assay that we developed to study phagosome formation and closure in living cells using Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) (6). We observed that dynamin-2, an important mediator of budding and scission of endocytic pits at the plasma membrane (7–9), is concomitantly recruited with F-actin during phagocytic cup formation and plays a crucial role in phagosome fission.

## Results

### Dynamin-2 is recruited during phagocytic cup formation and closure

To study the early steps of phagosome formation in living macrophages, we first performed ‘frustrated phagocytosis’ experiments, in which cells are allowed to spread on IgG-coated coverslips (10) (Figure 1A). We used TIRFM to record the dynamic events close to the plasma membrane in RAW264.7 macrophages transfected to transiently express F-actin-mCherry and dynamin-2-GFP (Figure 1B and Movie S1, Supporting Information). The F-actin signal was clearly detected as an intense ring in the peripheral region of the spreading cell, corresponding to F-actin polymerization at the edges and depolymerization in the center of the spreading zone as described previously (6). While its distribution was rather homogenous when the cells started to spread, dynamin-2 gradually accumulated in the periphery of the cell together with F-actin.

Next we used the ‘phagosome closure assay’ that we setup, in which coverslips are coated with IgG-opsonized red blood cells (IgG-RBCs) noncovalently bound on the poly-lysine-activated glass surface (6) (Figure 1C). This assay allows visualization of phagocytic cup extension and closure in the TIRF region, as macrophages engulf the RBCs. When macrophages transiently expressing F-actin-mCherry and dynamin-2-GFP were allowed to engulf RBCs, the local concentration of F-actin was detected as a ring corresponding to the extremities of

pseudopods and then as an intense dot at the site of fusion and scission (Figures 1D, red arrow at 2 min and Movie S2) before it disappeared (Figure 1D, 5 min). Of note, dynamin-2 was also recruited at the tips of the pseudopods surrounding the RBC and accumulated as an intense dot (Figure 1D, green arrow at 2 min), which progressively disappeared (Figure 1D, 5 min). Using a kymograph representation of the phagocytic site, we visualized the extension of the pseudopods over time, showing F-actin and dynamin-2 signals accumulating in the same place and at the same time during phagosome closure (Figure 1E). Therefore, dynamin-2 is concomitantly recruited with F-actin during phagocytic cup formation.

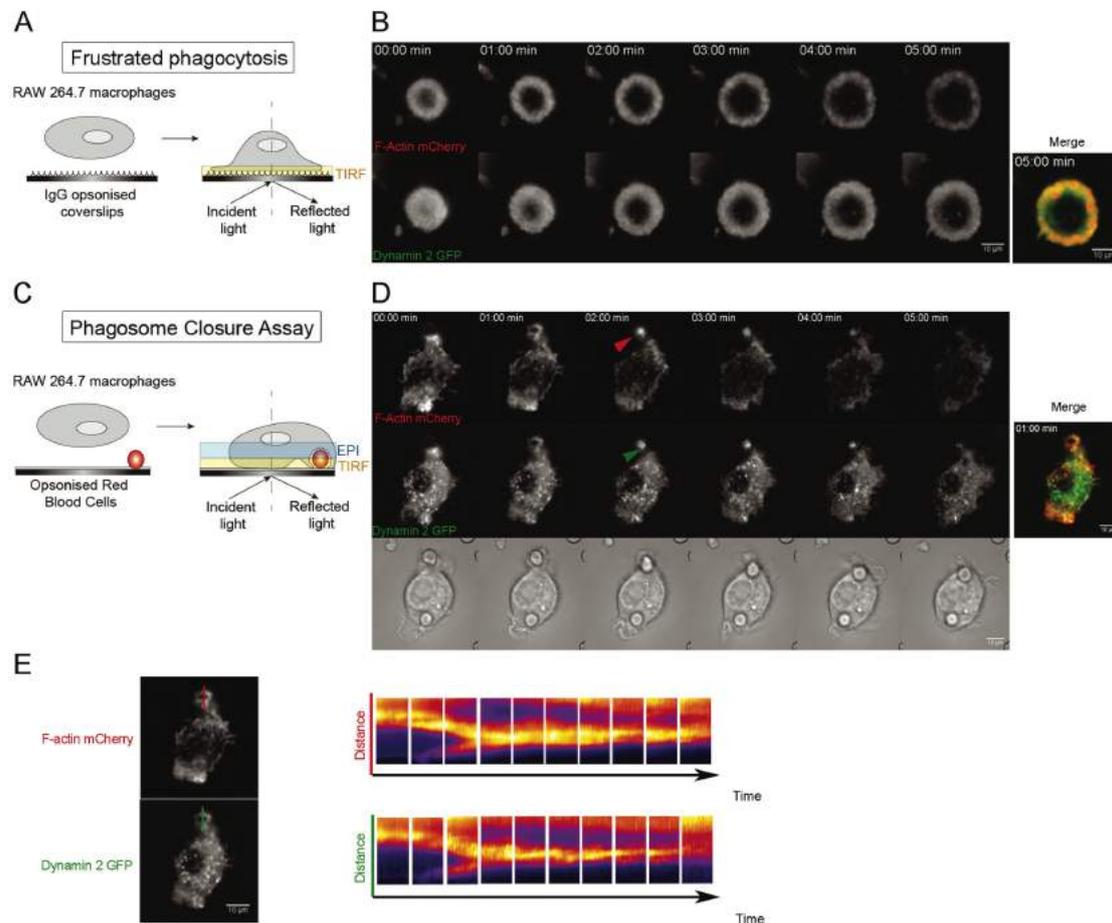
### Dynamin-2 does not colocalize with clathrin during phagocytic cup formation and closure

To address if the recruitment of dynamin-2 at the phagocytic cup was associated with clathrin-mediated endocytosis events, we examined the localization of clathrin and dynamin-2 during phagocytic cup extension and closure in macrophages using the ‘phagosome closure assay’ visualized using TIRFM. As described in Figure 1, dynamin-2 was recruited at the phagocytic site and accumulated in the tips of the pseudopods. No clathrin signal was detected at the site of phagocytosis (red region), but dotted labeling probably corresponding to clathrin-coated structures was detected in the adhesion region (cell body contours in white) (Figure 2 and Movie S3). These observations suggest that the presence of dynamin-2 during phagocytic cup formation and closure is independent from clathrin-mediated endocytosis, which is consistent with previously published data (11,12).

### Inhibition of dynamin-2 impairs F-actin assembly and phagocytic cup formation

Expression of a GTPase deficient mutant of dynamin-2 (Dyn2K44A) was reported to block pseudopod extension and phagocytic cup formation (13). To further characterize how phagocytosis was impaired when dynamin-2 activity was inhibited, we analyzed FcR-mediated phagocytosis and the recruitment of F-actin in phagocytic cups in macrophages treated with dynasore or expressing the Dyn2K44A mutant. Macrophages were allowed to phagocytose IgG-RBCs for 5 or 60 min, then fixed and stained for external and internal RBCs and F-actin (Figure 3). In

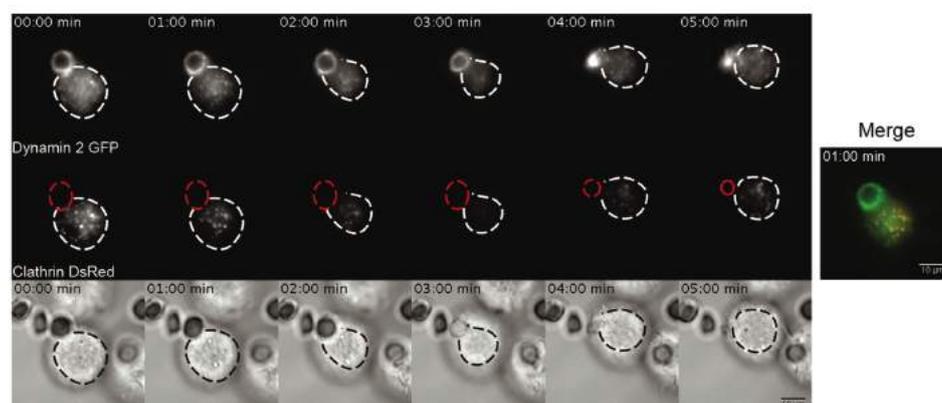
Role of Dynamin in Phagosome Formation and Closure



**Figure 1: Dynamin-2 is concomitantly recruited with F-actin during phagocytic cup formation and closure.** A) Schematic representation of the frustrated phagocytosis assay analyzed using TIRFM. B) Frustrated phagocytosis was performed using RAW264.7 murine macrophages transiently expressing Lifeact-mCherry and Dyn2WT-GFP. Lifeact-mCherry (top) and Dynamin-2-GFP (bottom) imaging using TIRFM were performed alternatively at 37°C every 50 ms during 5 min. Scale bar: 10 μm. C) Schematic representation of the phagosome closure assay. Cells are allowed to phagocytose opsonized particles that are noncovalently bound to the coverslip, allowing the site of closure to be observed using TIRFM. D) Phagosome closure assay was performed using RAW264.7 macrophages transiently expressing both Lifeact-mCherry and Dynamin-2-GFP. Lifeact-mCherry (top) and Dynamin 2-GFP (middle) imaging by TIRFM were performed alternatively at 37°C every 50 ms during 5 min. Transmitted light images are presented at the bottom. The arrowheads indicate the actin (red) and dynamin-2 (green) closure 'ring'. E) Graphical representation of actin and dynamin-2 signals at the closure site of the phagocytic cup over time (time in min below).

control cells, wild-type dynamin-2 was recruited around the RBCs in phagocytic cups labeled with F-actin, whereas in cells expressing the Dyn2K44A mutant that is unable to bind and hydrolyze GTP, the F-actin cups were hardly detected (Figure 3A). We quantified the number of RBCs

internalized into macrophages after 60 min of phagocytosis and observed a strong reduction in the phagocytosis efficiency in cells when dynamin-2 function was inhibited, both after expression of Dyn2K44A ( $53.2 \pm 6.5\%$ ) and treatment with dynasore ( $75.7\% \pm 14\%$ ) (Figure 3B,



**Figure 2: Dynamin-2 does not colocalize with clathrin during phagocytic cup formation and closure in macrophages.**

Phagosome closure assay was performed using RAW264.7 macrophages transiently expressing clathrin-DsRed and dynamin-2-GFP. Dynamin-2-GFP (top) and Clathrin-DsRed (middle) imaging using TIRFM were performed alternatively at 37°C every 50 ms during 5 min. The phagocytosis site and adhesion zone of the cell are highlighted in red and white, respectively. Transmitted light images are presented at the bottom with the cell adhesion zone in black.

middle panel). Initial binding of the particles was not affected (Figure 3B, left panel). Quantification of the fluorescence intensity associated with F-actin staining in phagocytic cups compared with the cortical area of the cell indicated that Dyn2K44A and dynasore reduced the F-actin enrichment in phagocytic cups by  $49.1 \pm 11.8$  and  $71.9 \pm 1.5\%$  respectively, compared with control macrophages.

These results were confirmed in cells treated with siRNA directed against dynamin-2 and GFP as a control, before phagocytosis was performed as described above (Figure 3C). We monitored the expression levels of dynamin-2 using western blot as compared with tubulin levels and estimated the depletion to be of  $51.7 \pm 15.6\%$  as compared with control cells. We quantified blindly the number of RBCs internalized into macrophages after 60 min of phagocytosis. We observed a reduction of  $36 \pm 7\%$  in the phagocytosis efficiency after treatment with siRNA against dynamin-2 as compared with control siRNA-treated cells, and no effect on particle association to the cells. Given that the depletion is only partial and that the phagocytosis efficiency was measured blindly in the whole cell population, the inhibition of phagocytosis we observed after dynamin-2 depletion was significant.

Our results show that inhibition of dynamin-2 expression or activity impairs the initial step of phagosome formation and actin recruitment. Thus dynamin-2 is necessary for the early events of phagosome formation that rely on F-actin polymerization.

#### Timely inhibition of dynamin-2 blocks the phagocytic cup closure

A well-characterized role of dynamin-2 is to mediate scission of endocytic vesicles from the plasma membrane (7–9). To determine whether dynamin-2 plays a role in closure and scission of phagosomes, we allowed living macrophages expressing dynamin-2 WT-GFP and Lifeact-mCherry to start assembling a phagosome during the phagosome closure assay. We then inhibited the activity of dynamin during the phagocytic process using dynasore (Figure 4).

First, we added dynasore to the medium at the beginning of internalization and when pseudopods had formed with F-actin and dynamin-2 enrichment (Figure 4A and Movie S4). After dynasore addition, the process was blocked. The F-actin signal decreased progressively but the dynamin-2 signal persisted or for a longer period. There was no internalization of the particle and the phagocytic cup aborted.

Role of Dynamin in Phagosome Formation and Closure

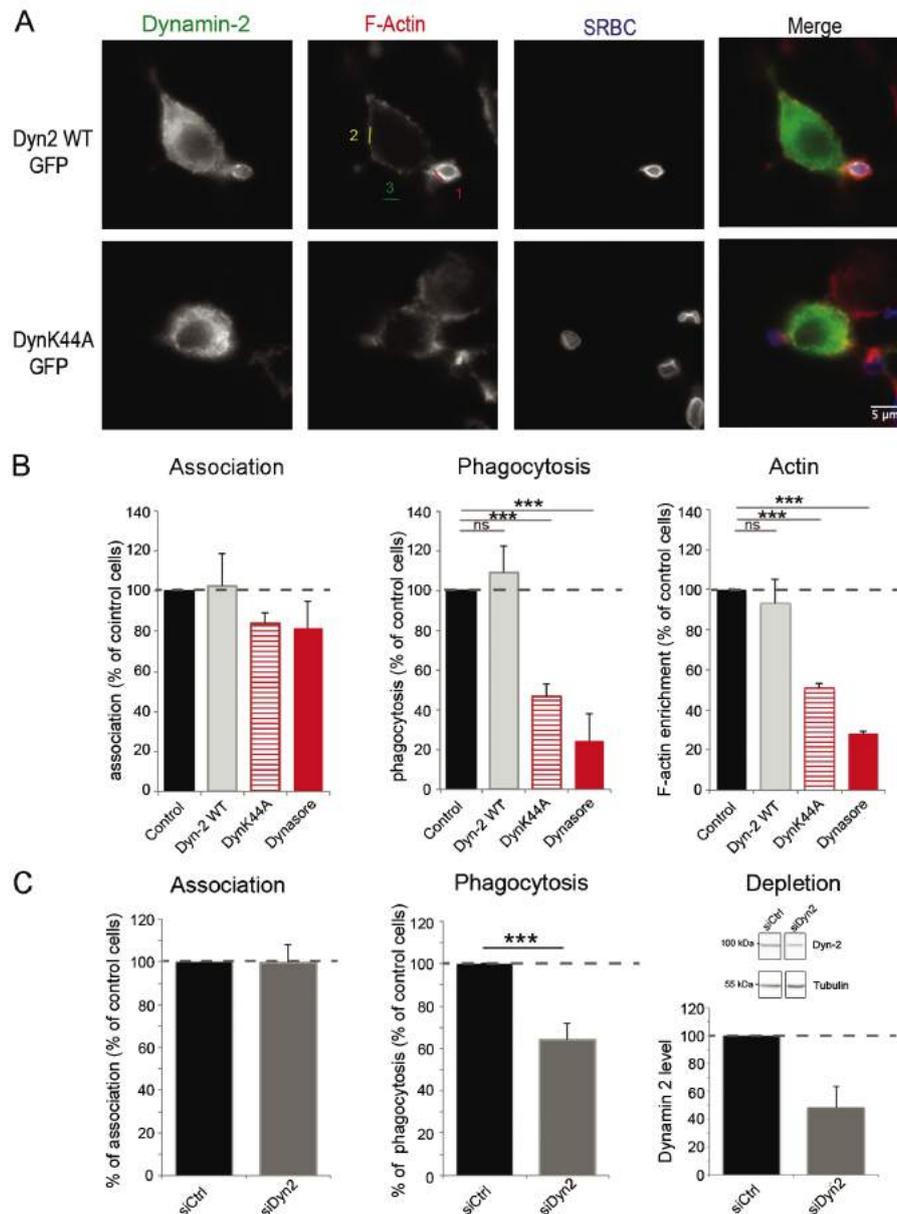


Figure 3: Legend on next page.

Next, we added dynasore to the medium when the process of internalization was close to the end, as defined by the accumulation of dynamin-2 and F-actin as a punctate structure (Figure 4B and Movie S5). Addition of dynasore led to a stronger accumulation of dynamin-2, which

increased and persisted at the very tips of the pseudopods. In contrast, the F-actin signal disappeared. The phagosome did not seal. To further confirm these observations, we used iminodan-22™, known to bind to the GTP domain of dynamins and to display uncompetitive antagonism with

respect to GTP (14) (Figure 4C and Movie S6). Indeed addition of iminodan-22 led to a strong accumulation of dynamin-2 at the tips of pseudopods, accompanied by F-actin before it progressively disappeared (Figure 4C). The completion of phagosome formation and the scission step appeared to be blocked in a stalled structure (Figure 4B,C). We conclude that the activity of dynamin-2 is required for sustained F-actin recruitment/polymerization and for constriction and scission of the phagosome.

To further document the potential interaction between actin and dynamin, we performed co-immunoprecipitation experiments with cells transiently transfected to express dynamin-2-GFP or GFP alone as a control and subjected to phagocytosis for 10 min (Figure S1). We observed co-immunoprecipitation of actin with dynamin-2-GFP but not with GFP in two different precipitation buffers, showing interaction between the two proteins in macrophages.

#### Timely inhibition of F-actin dynamics impairs dynamin-2 recruitment and/or activity

In order to dissect the cross talk between actin and dynamin-2, we treated the cells with cytochalasin D that disrupts F-actin network and prevents dynamic polymerization (Figure 5A and Movie S7). Addition of cytochalasin D during frustrated phagocytosis induced

an arrest in the cell spreading and prevented the recruitment of dynamin-2. Therefore, F-actin polymerization is required for efficient dynamin-2 recruitment at the sites of phagosome formation.

In addition, to determine if actin plays a role in the closure of phagosomes and activity of dynamin-2, we performed the phagosome closure assay using actin polymerization inhibitors during phagosome completion.

Latrunculin-A, which is known to sequester G-actin monomers (15), was added in the medium after 26 seconds of acquisition. This induced an arrest of F-actin polymerization at the tips of pseudopodia, characterized by a progressive loss of the fluorescent signal. Dynamin-2 was accumulated transiently (red arrowhead) but there was no phagosome closure and the RBC that was almost internalized was finally expelled (black arrowhead) (Figure 5B and Movie S8). This result suggests a role for F-actin in the recruitment and/or activity of dynamin-2.

We also used CK-869, an inhibitor of the Arp2/3 complex that leads to an acute arrest of the Arp2/3-mediated F-actin polymerization (Figure 5C and Movie S9). Here we show a transfected macrophage that had started to engulf two RBCs. Addition of CK-869 after 2 min 44 seconds of acquisitions led to arrest and stabilization of the phagosome around one of the RBCs (red arrowhead) that did

### Figure 3: Inhibition of Dynamin-2 impairs phagocytic cup formation and interferes with actin assembly on fixed cells.

A) RAW264.7 macrophages were transiently transfected to express Dynamin-2-GFP or the negative mutant Dyn2K44A-GFP. Cells were incubated with IgG-RBC for 5 min, and 60 min, fixed and stained for F-actin (red) and RBC (blue) and images were analyzed using wide field fluorescence microscopy. B) RAW264.7 cells transiently expressing Dynamin-2-GFP +/- Dynasore (80  $\mu$ M), or expressing the mutant DynK44A were incubated with IgG-RBC for 60 min, fixed and stained for F-actin (red) and RBC (blue). The efficiencies of association (left panel) and phagocytosis (middle panel) were calculated in 50 GFP-positive cells and 50 GFP-negative cells (control) per experiment. Results are expressed as a percentage of control cells. The means  $\pm$  SEM of at least three independent experiments are plotted ( $n = 3$  experiments, \*\*\* $p < 0.01$ ). The efficiency of F-actin recruitment was calculated (right panel). For this, the fluorescence intensities measured in the phagocytic cups were background subtracted and divided by the fluorescence intensities measured for cortical actin in the cell body after background subtraction. This ratio defined the index of enrichment that was then expressed as a percentage of control cells. The means  $\pm$  SEM of three independent experiments are plotted ( $n = 30$  actin cups/conditions, \*\*\* $p < 0.01$ ). C) RAW264.7 were treated with control siRNA and siRNA targeting dynamin-2 for 24 h. The efficiency of the depletion is verified using western blotting with anti-dynamin-2 and the chemiluminescent signal was quantified and expressed as related to the control condition (upper panel). RAW 264.7 were then allowed to phagocytose IgG-opsonized SRBCs for 1 h, fixed and stained to detect SRBCs with AMCA anti-rabbit IgG. The efficiencies of association and phagocytosis were calculated in 50 cells per experiment. Results are expressed as a percentage of control cells. The means  $\pm$  SEM of at least three independent experiments are plotted ( $n = 4$  experiments, \*\*\* $p < 0.01$ ) (bottom panel).

Role of Dynamin in Phagosome Formation and Closure

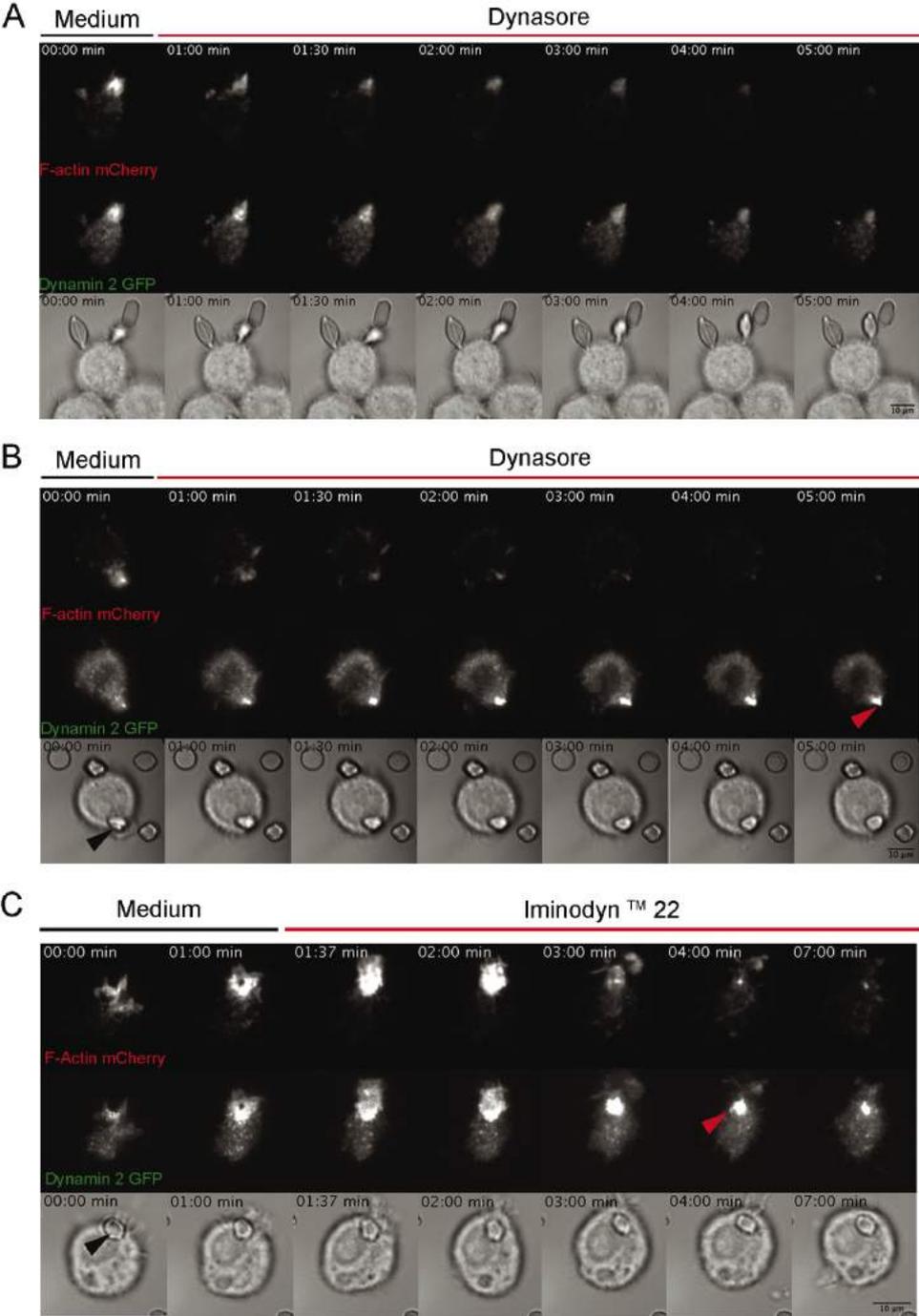


Figure 4: Legend on Next page

not close. F-actin and dynamin-2 signals decreased progressively. In contrast, the second phagosome completed the process, probably because pseudopodia were more extended around the RBC at the time of CK-869 addition in the medium (white arrowheads). Actin and dynamin-2 accumulated transiently as dots before disappearing while the RBC was internalized (white arrowhead), suggesting that actin polymerization is not required for the final scission step.

All these results indicate that actin polymerization is required for dynamin-2 recruitment early during phagosome formation, as well as during the closure step, probably to maintain the constriction of the phagosome neck, before the very final scission step.

## Discussion

In this study, we revisited the role of dynamin-2 during FcR-mediated phagocytosis and showed that dynamin-2 acts at two different steps, both during pseudopod extension and actin polymerization, and during phagosome closure (Figure 5D). For this, we used a TIRFM-based experimental setup to visualize phagosome formation and completion with high spatial and temporal resolution (6). This allows for an unprecedented view of phagosome closure in living cells, a step that has not been extensively studied so far because of its transiency and because treatments that inhibit phagosome formation lead to the formation of stalled phagocytic cups often blocked in an early stage. This was indeed the case after expression of a mutant of dynamin-2 unable to bind GTP (K44A), which led to the inhibition of particle internalization at the stage of membrane extension (13). Given that

dynamin-2 is implicated in clathrin-mediated endocytosis in all cells, an early hypothesis was that inhibiting its function would impair compensatory endocytosis that would take place in the nascent phagosome. This possibility, however, can be ruled out because clathrin is excluded from forming phagosomes and because interfering with clathrin-mediated endocytosis does not affect phagocytosis of large particles [this study and (11,12,16)].

Dynamin-2 is also involved in membrane traffic at the level of the Trans-Golgi Network (TGN) and recycling compartments (17), and could therefore control the focal exocytosis that is required for efficient phagosome formation (3,5). This was indeed suggested in a study measuring membrane capacitance as a marker for exocytosis (18). In addition, the role of dynamin on intracellular trafficking was reported during the engulfment and removal of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*, where it regulates the maturation of the phagosomes (19,20), as found also in *Dictyostelium discoideum* (21). The inhibition of FcR-mediated phagocytosis observed when dynamin K44A was expressed is reminiscent of the phenotype obtained with wortmannin, or after interference with the function of ARF6, AP1 or Bcl10, leading to stalled phagocytic cups (6,12,16,22). However, in all these cases where membrane delivery at the site of phagocytosis was perturbed, initial polymerization of F-actin was not impaired. By contrast, we observed that expression of the Dyn2K44A mutant led to impaired F-actin polymerization in nascent phagocytic cups. Without excluding a role in focal exocytosis, we therefore highlight here a primary role of dynamin-2 in the assembly and remodeling of actin at the phagosomal cup.

**Figure 4: Inhibition of Dynamin-2 impairs phagocytic cup formation and closure in living cells.** A and B) Phagosome closure assay was performed using RAW264.7 macrophages transiently expressing Lifeact-mCherry and DynWT-GFP. Lifeact-mCherry (top) and Dynamin 2-GFP (middle) imaging using TIRFM were performed alternatively at 37°C every 50 ms during 7 min. After 1 min of acquisition, corresponding to an early step of phagocytosis in A and to a later step in B, 100 µM of dynasore monohydrate was added into the medium. Only 5 min are represented because there were no changes in signal localization afterwards. Transmitted light images are presented at the bottom. C) Phagosome closure assay was performed using RAW264.7 macrophages transiently expressing Lifeact-mCherry and DynWT-GFP. Lifeact-mCherry (top) and Dynamin 2-GFP (middle) imaging using TIRFM were performed alternatively at 37°C every 50 ms during 7 min. Another dynamin-2 inhibitory drug, iminodan 22 (60 µM) was added in the medium after 1 min 37 of acquisition corresponding to a later step of phagocytosis. Corresponding transmitted light images are shown below. Black arrowhead indicates RBC in phase contrast and red arrowhead indicates the closure site of phagosome.

Role of Dynamin in Phagosome Formation and Closure

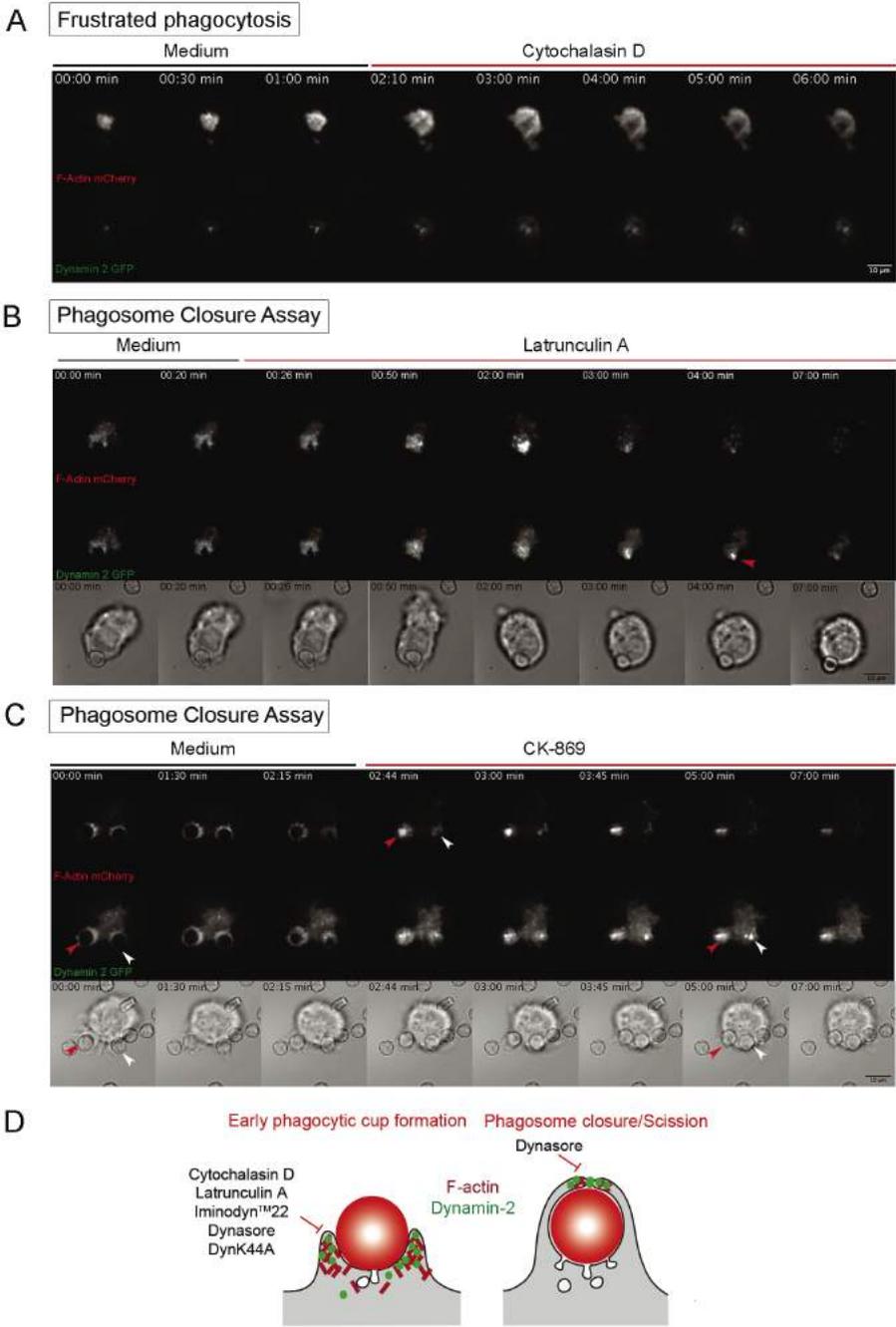


Figure 5: Legend on next page

Interestingly, inhibitory forms of dynamin-1, the neuron specific isoform, were without effect on phagocytosis, under conditions where clathrin-mediated endocytosis was obliterated (11), suggesting that the two isoforms might have differential roles despite their high degree of homology. Because dynamin-1 has been reported recently to be expressed also in some cancer cells (23), we tried to detect dynamin-1 in the RAW264.7 murine macrophages used in this study but we were unable to detect its expression and its depletion (not shown), suggesting that dynamin-2 is the major player during phagocytosis in these macrophages.

We show here that the integrity of the F-actin network is necessary for sustained recruitment and function of dynamin-2, in line with recent observations that actin precedes or accompanies dynamin recruitment at clathrin-coated pits in the last phases of clathrin-mediated endocytosis before the scission and release of vesicles (24–27). F-actin could help control the membrane tension and therefore complement the constriction activity of dynamin-2 for scission, as proposed (8). In addition, short actin filaments were found to promote the oligomerization of dynamin-1 into higher order structures and its GTPase activity, via a direct interaction between an actin-binding domain of dynamin-1 and actin (28,29). Self-assembled dynamin-1 in turn induces the release of the capping

protein gelsolin and elongation of actin filaments. Such a positive feedback loop could also occur during phagosome formation, as dynamin-2 also impacts on the actin cytoskeleton in growth factor stimulated cells or during migration (30–32), and because F-actin polymerization is strictly required for initial phagosome formation.

Finally, following the localization of the wild-type dynamin-2 in living phagocytosing cells instead of perturbing its function allowed us to point to the role of dynamin-2 in phagosome scission from the plasma membrane. The three-dimensional phagocytosis assay that we used here opens avenues for better definitions of the role of dynamin, its partners and other machineries in phagosome formation and closure in living cells.

## Materials and Methods

### Antibodies, Plasmids and Reagents

The following antibodies were used: rabbit anti-Sheep RBCs (SRBC) (ICN Biochemicals), donkey F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG-AMCA (Jackson ImmunoResearch), Phalloidine-Alexa 546 (Molecular Probes), goat anti-dynamin II (C-18) (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-GFP (clones 7.1 and 13.1) (Roche), mouse anti-actin (clone AC-40) (Sigma Aldrich).

The plasmid encoding Lifeact-mCherry (33) was kindly provided by G. Montagnac (Institut Curie); the plasmids encoding DynWT-GFP and DynK44A-GFP (31) were provided by Marc Mc Niven (Mayo Clinic);

**Figure 5: Cross talk between dynamin-2 and F-actin.** A) Frustrated phagocytosis was performed using RAW264.7 macrophages transiently expressing Lifeact-mCherry and DynWT-GFP. DynWT-GFP (top) and Lifeact-mCherry (bottom) and imaging using TIRFM were performed alternatively at 37°C every 50 ms during 5 min. After 2 min of acquisition, 2 µg/mL of Cytochalasin D was added into the medium. Transmitted light images are presented at the bottom. B and C) Phagosome closure assay was performed using RAW264.7 macrophages transiently expressing Lifeact-mCherry and DynWT-GFP. Lifeact-mCherry (top) and Dynamin 2-GFP (bottom) imaging by TIRFM were performed alternatively at 37°C every 50 ms during 7 min. After 26 sec (B) or 2 min 44 (C) by adding, respectively, Latrunculin A (0.26 µM) or CK-869 (0.01 ng/mL) the F-actin polymerization was blocked. B) The red arrowhead indicates transient dynamin-2 accumulation and the black arrowhead indicates expelled RBC. C) The red arrowhead indicates the not internalized SRBC, in contrast of white arrowhead that indicates the internalized one. Transmitted light images are presented at the bottom for each panel. D) Dynamin-2 and actin organization during phagosome formation. Opsonized particles trigger FcR clustering that induces intracellular signaling leading to actin polymerization. F-actin polymerization is the driving force behind membrane and pseudopod extension. Dynamin-2 is recruited at the same time as F-actin, in an actin-dependent manner. Dynamin-2-GTP-binding and hydrolysis activity supports F-actin dynamics and polymerization. Progressively, actin depolymerizes at the base of the phagocytic cup, while F-actin polymerization continues at the tips of the pseudopods until the formation of a ring and closure of the phagosome. Dynamin-2 gets accumulated at the tips of the extending membranes and is involved in membrane scission. This membrane scission requires the GTP-binding and hydrolysis capacity of dynamin-2. Thus, a cross talk between F-actin and dynamin-2 activity supports phagosome formation and closure.

## Role of Dynamin in Phagosome Formation and Closure

the plasmid encoding Clathrin-DsRed was obtained from Thomas Kirchhausen (Harvard Medical School).

Dynasore monohydrate was used at 80  $\mu\text{M}$  in phagocytosis assays and 100  $\mu\text{M}$  in phagosome closure assays. Latrunculin A was used at 0.26  $\mu\text{M}$ , cytochalasin D at 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (both from Sigma-Aldrich), iminodanil 22 at 60  $\mu\text{M}$  (Abcam) and CK-869 (Calbiochem) at 0.01  $\text{ng}/\text{mL}$  during phagosome closure assay.

siRNA sequences were as follows: 5'-CCACACGUGUUGAACUUGA-3' targets *mus musculus* dynamin-2 from (34). The control siRNA-targeting GFP was 5'-GAACGGCAUCAAGGUGAAC-3' (35).

### Cell culture and transfection

RAW264.7 macrophages were grown in complete medium, consisting of RPMI 1640-glutamax supplemented with 10  $\text{mM}$  HEPES, 1  $\text{mM}$  sodium pyruvate, 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 2  $\text{mM}$  L-Glutamine and 10% fetal calf serum (FCS) (all from Gibco). Cells were transfected by electroporation with the Electrobuffer kit (Cell project). Routinely, one 100  $\text{mm}$  plate of cells was grown to sub-confluence and 15  $\mu\text{g}$  of plasmid was used for each transfection. For co-transfection, 10  $\mu\text{g}$  of each plasmid was used. The cells were electroporated in 0.4  $\text{cm}$  cuvettes (Biorad) at 250 V, 900  $\mu\text{F}$  in an electroporation apparatus (X Pulser Bio-Rad Laboratories), then immediately resuspended in complete culture medium and plated in 100  $\text{mm}$  dishes containing 12  $\text{mm}$  coverslips. Efficiency of transfection was 10–40%.

Treatment with siRNA was obtained after 24 h with Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen), as described (6).

### Cell stimulation, immunoprecipitation and western blotting

For FcR stimulation, RAW264.7 were resuspended in RPMI 1640 without serum at  $10^7$  cells/mL. Hundred microliters cells were incubated with 20  $\mu\text{L}$  of IgG-SRBC ( $10^8/\mu\text{L}$ ). The cell mixture was pulsed-centrifuged to favor cellular interactions and incubated for 10 min at 37°C before adding ice-cold PBS to stop phagocytosis. Cells were lysed in 20  $\text{mM}$  Tris HCl, 150  $\text{mM}$  NaCl, 0.5% Triton supplemented with protease inhibitors. Lysates were incubated with or without 0  $\mu\text{M}$  5% BSA and 1  $\mu\text{g}$  of anti-GFP coupled to protein G sepharose beads (GE Healthcare). Immunoprecipitated proteins and total cells lysates were analyzed using western blotting.

### Phagocytosis assay

Phagocytosis assays were performed with RAW264.7 macrophages on glass coverslips before incubation with IgG-opsonized SRBC (IgG-RBC) as described (35). For this, RBCs were washed in PBS1X/BSA 0.1% and incubated with anti-RBC antibodies for 30 min at RT, then washed and resuspended in serum-free medium. After internalization of the IgG-RBC for the indicated times, cells were fixed in 4% PFA/4% sucrose for 45 min at 4°C. Cells were then permeabilized with 0.05% saponin before labeling of the intracellular RBC with AMCA-F(ab')<sub>2</sub> in PBS1X/saponin 0.05%/BSA 2%. We counted the number of internalized RBCs in 50 cells

randomly chosen on the coverslips, and calculated the phagocytic index, i.e. the mean number of phagocytosed RBCs per cell. The index obtained for transfected cells was divided by the index obtained for control non-transfected cells and expressed as a percentage of control cells. We also counted the number of cell-associated (bound + internalized) RBCs, calculated the association index (mean number of associated RBCs per cell) and expressed it as percentage of control non-transfected cells. A minimum of three independent experiments was performed. Immunofluorescence and image acquisition were performed on an inverted wide field microscope (Leica DMI6000) with a 100 $\times$  (1.4 NA) objective and a Micro-MAX Princeton Instruments). Z-series of images were taken at 0.3  $\mu\text{m}$  increments and deconvolution was performed with the software Huygens (Scientific Volume Imaging, Hilversum, the Netherlands).

To quantify the percentage of actin enrichment per phagocytic cup, primary maximum fluorescence intensities of selected regions were background corrected by subtracting the mean value from a cell-free region. Ratio values obtained by dividing the fluorescence intensities in the phagocytic cups by fluorescence intensities in the cell body were calculated. Results are expressed as a percentage of control non-transfected cells.

### Frustrated phagocytosis assay

The 35  $\text{mm}$  glass bottom dishes (MatTek Corporation) were coated with anti-RBC IgG in PBS1X overnight at 4°C, then washed twice with PBS. Macrophages were resuspended in serum-free microscopy medium (red phenol-free RPMI 1640, 2  $\text{mM}$  L-Glutamine, 10  $\text{mM}$  HEPES, 1  $\text{mM}$  sodium pyruvate and 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol), then allowed to sediment on the antibody-coated dishes at 37°C.

### Phagosome closure assay

IgG-RBCs were centrifuged onto 35  $\text{mm}$  glass bottom dishes (MatTek Corporation) pretreated with 0.01% poly-L-lysine in PBS for 30 min at RT. The dishes were then washed once with a 10% BSA in PBS and incubated for 30 min with 10% BSA in PBS. Then the dishes were incubated with prewarmed serum-free microscopy medium. Macrophages were resuspended and allowed to sediment onto opsonized sheep red blood cells (SRBC)-coated dishes at 37°C.

### Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM)

TIRFM was performed using a Till PHOTONICS iMIC microscope equipped with an oil-immersion objective (Apo N 100 $\times$ , NA1.49 Olympus America Inc.), a heating chamber and two cameras: a cooled iXonEM camera and an iXon3 897 Single Photon Detection EMCCD Camera (Andor Technology). The critical angle was verified at the beginning of each session by scanning all wavelengths and plotting the fluorescence intensity of a region of interest. Excitation was performed with a 491 and 561  $\text{nm}$  laser. For frustrated phagocytosis, streams of 1000 frames were acquired at 50 ms per frame. For the phagosome closure assay, streams of 550 frames were acquired at 10 ms per frame in TIRF mode, and 50 ms per frame in epifluorescence mode with Polychrome illumination at 3  $\mu\text{m}$

increment. TIRFM image streams were processed using IMAGEJ COLOR PROFILER software (NIH).

### Statistics

The statistical significance of the data was tested with an unpaired Student's *t*-test. Differences were considered significant if *p* value was less than 0.05 (\*) and 0.005 (\*\*).

### Acknowledgements

We thank Ahmed Zahraoui and Jamil Jubrail for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from CNRS, Inserm, Université Paris Descartes, Agence Nationale de la Recherche (2011 BSV3 025 02) and Fondation pour la Recherche Médicale ('Equipe FRM', FRM DEQ20130326518 including the doctoral fellowship of F. M. A.) to F. N. J. M. was supported by a doctoral fellowship from Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites (ANRS).

Editorial Process File is available in the online version of this article.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Movie S1:** Movie corresponding to Figure 1B.

**Movie S2:** Movie corresponding to Figure 1D.

**Movie S3:** Movie corresponding to Figure 2.

**Movie S4:** Movie corresponding to Figure 4A.

**Movie S5:** Movie corresponding to Figure 4B.

**Movie S6:** Movie corresponding to Figure 4C.

**Movie S7:** Movie corresponding to Figure 5A.

**Movie S8:** Movie corresponding to Figure 5B.

**Movie S9:** Movie corresponding to Figure 5C.

**Figure S1:** Actin is coimmunoprecipitated with dynamin-2. RAW264.7 transfected to express GFP or Dyn2WT-GFP were allowed to phagocytose RBCs during 10 min then lysed. Lysates were incubated with anti-GFP antibodies and immunoprecipitated in presence or absence of bovine serum albumin (BSA). Proteins were analyzed using immunoblotting using anti-actin and anti-GFP antibodies.

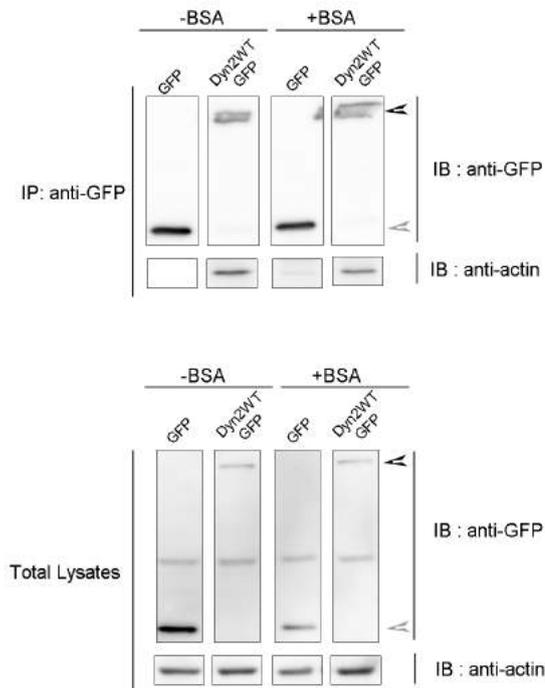
### References

- Niedergang F. Phagocytosis. In: Bradshaw Ralph A, Stahl Philip D, editors. *Encyclopedia of Cell Biology*. Waltham, MA: Academic Press; 2016, pp. 751–757.
- Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 2012;7:61–98.
- Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev* 2014;262:193–215.
- Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:639–649.
- Deschamps C, Echard A, Niedergang F. Phagocytosis and cytokinesis: do cells use common tools to cut and to eat? Highlights on common themes and differences. *Traffic* 2013;14:355–364.
- Marion S, Mazzolini J, Herit F, Bourdoncle P, Kambou-Pene N, Haifinger S, Sachse M, Ruland J, Benmerah A, Echard A, Thome M, Niedergang F. The NF- $\kappa$ B signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles. *Dev Cell* 2012;23:954–967.
- Ferguson SM, De Camilli P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:75–88.
- Morlot S, Roux A. Mechanics of dynamin-mediated membrane fission. *Annu Rev Biophys* 2013;42:629–649.
- Schmid SL, Frolov VA. Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:79–105.
- Wright SD, Silverstein SC. Phagocytosing macrophages exclude proteins from the zones of contact with opsonized targets. *Nature* 1984;309:359–361.
- Tse SML, Furuya W, Gold ES, Schreiber AD, Sandvig K, Inman RD, Grinstein S. Differential role of actin, clathrin, and dynamin in Fc $\gamma$  receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *J Biol Chem* 2003;278:3331–3338.
- Braun V, Deschamps C, Raposo G, Benaroch P, Benmerah A, Chavrier P, Niedergang F. AP-1 and ARF1 control endosomal dynamics at sites of FcR mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* 2007;18:4921–4931.
- Gold ES, Underhill DM, Morrisette NS, Guo J, McNiven MA, Adorem A. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 1999;190:1849–1856.
- Hill TA, Mariana A, Gordon CP, Odell LR, Robertson MJ, McGeachie AB, Chau N, Daniel JA, Gorgani NN, Robinson PJ, McCluskey A. Iminochromene inhibitors of dynamins I and II GTPase activity and endocytosis. *J Med Chem* 2010;53:4094–4102.
- Oliveira CA, Kashman Y, Mantovani B. Effects of latrunculin A on immunological phagocytosis and macrophage spreading-associated changes in the F-actin/G-actin content of the cells. *Chem Biol Interact* 1996;100:141–153.
- Niedergang F, Colucci-Guyon E, Dubois T, Raposo G, Chavrier P. ADP-ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol* 2003;161:1143–1150.
- van Dam EM, Stoorvogel W. Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell* 2002;13:169–182.
- Di A, Nelson DJ, Bindokas V, Brown ME, Libunao F, Palfrey HC. Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages. *Mol Biol Cell* 2003;14:2016–2028.
- He B, Yu X, Margolis M, Liu X, Leng X, Etzion Y, Zheng F, Lu N, Qulocho FA, Danino D, Zhou Z. Live-cell imaging in *Caenorhabditis*

Role of Dynamin in Phagosome Formation and Closure

- C. elegans* reveals the distinct roles of dynamin self-assembly and guanosine triphosphate hydrolysis in the removal of apoptotic cells. *Mol Biol Cell* 2010;21:610–629.
20. Kinchen JM, Doukounetzidis K, Almendinger J, Stergiou L, Tosello-Tramont A, Sifri CD, Hengartner MO, Ravichandran KS. A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2008;10:556–566.
  21. Gopaldass N, Patel D, Kratzke R, Dieckmann R, Hausherr S, Hagedorn M, Monroy R, Kruger J, Neuhaus EM, Hoffmann E, Hille K, Kuznetsov SA, Soldati T. Dynamin A, Myosin IB and Abp1 couple phagosome maturation to F-actin binding. *Traffic* 2012;13:120–130.
  22. Araki N, Johnson MT, Swanson JA. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 1996;135:1249–1260.
  23. Reis CR, Chen PH, Srinivasan S, Aguet F, Mettlen M, Schmid SL. Crosstalk between Akt/GSK3beta signaling and dynamin-1 regulates clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* 2015;34:2132–2146.
  24. Merrifield CJ, Feldman ME, Wan L, Almers W. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* 2002;4:691–698.
  25. Grassart A, Cheng AT, Hong SH, Zhang F, Zenner N, Feng Y, Briner DM, Davis GD, Malkov D, Drubin DG. Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2014;205:721–735.
  26. Picco A, Mund M, Ries J, Nedelec F, Kaksonen M. Visualizing the functional architecture of the endocytic machinery. *Elife* 2015;4:1–29.
  27. Palmer SE, Smaczynska-de R II, Marklew CJ, Allwood EG, Mishra R, Johnson S, Goldberg MW, Ayscough KR. A dynamin-actin interaction is required for vesicle scission during endocytosis in yeast. *Curr Biol* 2015;25:868–878.
  28. Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, Osborn T, Reiser J, Pollak M, Hartwig J, Sever S. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J* 2010;29:3593–3606.
  29. Gu C, Chang J, Shchedrina VA, Pham VA, Hartwig JH, Suphamongmee W, Lehman W, Hyman BT, Backsai BJ, Sever S. Regulation of dynamin oligomerization in cells: the role of dynamin-actin interactions and its GTPase activity. *Traffic* 2014;15:819–838.
  30. Sever S, Altintas MM, Nankoe SR, Moller CC, Ko D, Wei C, Henderson J, del Re EC, Hsing L, Erickson A, Cohen CD, Kretzler M, Kerjaschki D, Rudensky A, Nikolic B, et al. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest* 2007;117:2095–2104.
  31. Orth JD, Krueger EW, Cao H, McNiven MA. The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:167–172.
  32. Krueger EW, Orth JD, Cao H, McNiven MA. A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol Biol Cell* 2003;14:1085–1096.
  33. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 2008;5:605–607.
  34. Verma SK, Leikina E, Melikov K, Chernomordik LV. Late stages of the synchronized macrophage fusion in osteoclast formation depend on dynamin. *Biochem J* 2014;464:293–300.
  35. Braun Y, Fraissier Y, Raposo G, Hurbain I, Sibarita JB, Chavrier P, Galli T, Niedergang C. TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J* 2004;23:4166–4176.

Supplemental Figure 7



**Supplemental Figure 7 : Actin is coimmunoprecipitated with Dynamin-2.** RAW264.7 transfected to express EGFP or Dyn2WT-GFP were allowed to phagocytose RBCs during 10 min then lysed. Lysates were incubated with anti-GFP antibodies and immunoprecipitated in presence or absence of bovine serum albumin (BSA). Proteins were analyzed by immunoblotting using anti-actin and anti-GFP antibodies

## 2ème partie : Mécanismes moléculaires en aval du CR3.

### 1. Introduction

L'activité du récepteur au complément CR3 implique différentes signalisations qui rendent complexe l'étude des acteurs moléculaires impliqués au cours de la phagocytose. En effet, l'existence d'une signalisation pré-activatrice « inside-out » puis d'une signalisation activatrice « outside-in » engage de nombreuses protéines qui doivent être régulées précisément dans l'espace et le temps. Comparée à la phagocytose induite par les FcγRs, de nombreuses observations mettent en évidence le caractère plus lent et moins efficace de la phagocytose induite par le CR3. De plus, la morphologie des coupes phagocytaires induites par ces deux types de récepteurs présente des différences révélées dès 1996 (Figure 22) (Allen and Aderem 1996). Bien qu'il soit un récepteur phagocytaire, le CR3 est une intégrine mécano-réceptrice capable de détecter des changements morphologiques ou chimiques de la matrice-extracellulaire, qui sont ensuite transduits en signaux intracellulaires aboutissant au remodelage du cytosquelette d'actine. Les protéines de liaison à l'actine telles que la taline, la vinculine ou encore la myosine impliquées dans la transmission du signal « outside-in », sont toutes requises au cours de la phagocytose CR3. En revanche, l'implication de la filamine au cours de ce processus n'a pas encore été mise en évidence.

Dans un premier temps, afin de comprendre d'où proviennent les différences morphologiques entre les coupes phagocytaires induites par les FcγRs et les CR3, nous avons initié l'analyse de l'organisation du cytosquelette d'actine-F et des protéines telles que la taline, la myosine II et VAMP3 au cours de la formation des coupes phagocytaires induites par le CR3 dans le modèle de phagocytose frustrée visualisée par microscopie à ondes évanescentes.

Dans un second temps, pour déterminer la fonction de la filamine au cours de la phagocytose, nous avons analysé l'effet de son absence dans les macrophages sur la phagocytose induite par le CR3. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'ARN interférence ciblant la filamine (FLN), mais aussi la surexpression d'une protéine E3 ubiquitine ligase ASB2 ( « Ankyrin Repeat and SOCS box Containing 2 ») qui a pour cible la filamine. Celle-ci est alors dirigée vers la voie de dégradation par le protéasome (Heuze,

Lamsoul et al. 2008, Razinia, Baldassarre et al. 2011, Razinia, Baldassarre et al. 2013). Notre hypothèse de travail est que la filamine pourrait avoir un rôle négatif sur l'activité des intégrines notamment du CR3 et que son inhibition pourrait donc augmenter les efficacités d'adhésion et/ou d'internalisation en particulier en aval des récepteurs phagocytaires intégrines.

## 2. Matériels et méthodes

- *Anticorps, plasmides et séquences de siRNA*

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : IgG de lapin anti-GR de mouton (ICN), IgM de lapin anti-GR de mouton (Accurate), IgG de lapin anti-filamine A de souris et IgG de lapin anti-filamine B de souris (tous les deux de Abcam), IgG de souris anti-filamine A d'homme (clone PM6/317 Merck Millipore), IgG de souris anti-tubuline (Clone DM1A de chez Sigma).

Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés F(ab)<sub>2</sub>' anti-IgG de lapin couplé à l'AMCA, F(ab)<sub>2</sub>' anti-IgG de lapin couplé à la Cyanine 3, F(ab)<sub>2</sub>' anti-IgG de souris couplé à la F(ab)<sub>2</sub>' anti-IgG de lapin couplé à la HRP, F(ab)<sub>2</sub>' anti-IgG de souris couplé à la HRP (tous de Jackson Immunoresearch).

Les plasmides utilisés sont : pEGFP hASB2 $\alpha$  WT donné par Pierre Lutz (IPBS, Toulouse), pEGFP-C1 donné par Anne BreLOT (Institut Cochin, Paris), pEGFPC-taline donné par Christoph Ballestrem (Université de Manchester) et pEGFP-N3NN-MH-SF9 codant pour un anticorps recombinant ciblant la myosine II donné par Franck Perez (Institut Curie, Paris)

Les duplex d'ARN interférents suivants ont été utilisés :

siGFP : GAACGGCAUCAAGGUGAACTT ; siAP1 : AGCUAUGAAUGAUUAUUA55 ; siFLN : CCAGCAAGGUGAAGGCGUU55 .

- *Cellules et transfections*

*Les macrophages murins RAW264.7 (ATCC<sup>®</sup> TIB-71<sup>™</sup>)* sont cultivés en milieu complet (RPMI 1640-Glutamax, HEPES 10 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 50  $\mu$ M, pyruvate de sodium 1 mM, L-glutamine 2 mM, sérum de veau fœtal 10% (SVF). Ces cellules sont transfectées par électroporation avec le kit Optimix (Cell Project) dans des cuvettes 0,4cm à 250V, 950  $\mu$ F dans un appareil Gene Pulser II (Biorad). Habituellement une boîte de culture de 100 mm

contenant des cellules subconfluentes et 20 µg de plasmides sont utilisés pour chaque transfection. Les cellules sont remises en culture en milieu complet durant 18-20h à 37°C 5% CO<sub>2</sub> dans des boîtes de culture 100 mm avec ou sans lamelles de verre.

*Les macrophages primaires humains dérivés de monocytes (hMDMs) sanguins* sont isolés par gradient de densité de Ficoll (GE Healthcare) à partir du sang de donneurs sains récupéré à l'Établissement Français du Sang (EFS), suivi de 2h d'adhésion sur plastique. Les cellules sont alors cultivées en milieu complet (RPMI 1640-Glutamax complété de 10% de sérum de veau foetal, 100 µg/ml streptomycine/penicilline et 2mM L-glutamine(Invitrogen/Gibco), rhM-CSF (R&D systems)) dans lequel elles vont se différencier. Les hMDMs sont nucléofectées à 5 jours de différenciation ( $5 \cdot 10^5$  cellules/cuvette) avec 5 µg de plasmides, en utilisant l'appareil Nucleofector II device (Amaxa GmbH Europe/World) et le kit Ingenio (Mirus).

Le traitement par siRNA durant 48-72h est réalisé avec les réactifs RNAiMAX (Invitrogen).

- *Opsonisation des globules rouges.*

- *IgG*

Les globules rouges (GR) dont le nombre utilisé varie en fonction de l'expérience de phagocytose réalisée, sont lavés deux fois dans 100 µl de PBS1X/BSA 0,1% à 600 g durant 4min. Le culot est resuspendu dans une solution de PBS1X/BSA 0,1% additionnée de l'IgG de lapin anti-GR à une concentration subagglutinante au préalable déterminée par test d'hémagglutination. Les GR sont alors incubés 30 min à température ambiante en rotation lente. Ils sont ensuite centrifugés (600 g, 4 min) et lavés deux fois en PBS1X/BSA 0,1%. Le culot est resuspendu dans un milieu dit de « phagocytose » dépourvu de sérum de veau foetal (SVF) (RPMI 1640 Glutamax, HEPES 10 mM, β-mercaptoéthanol 50 µM, L-glutamine 2 mM, pyruvate de sodium 1 mM) et préchauffé à 37°C.

- *IgM et fragment C3bi du complément*

Les globules rouges (GR) dont le nombre utilisé varie en fonction de l'expérience de phagocytose réalisée, sont lavés deux fois dans 100 µl de PBS1X/BSA 0,1% à 600 g durant

4min. Le culot est resuspendu dans une solution de PBS1X/BSA 0,1% additionnée de l'IgM de lapin anti-GR à une concentration subagglutinante au préalable déterminée par test d'hémagglutination. Les GR sont alors incubés 30 min à température ambiante en rotation lente. Ils sont ensuite centrifugés (600 g, 4 min) et lavés deux fois en PBS1X/BSA 0,1%. Le culot est resuspendu dans un milieu dit de « phagocytose » dépourvu de sérum de veau foetal (SVF) (RPMI 1640 Glutamax, HEPES 10 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 50  $\mu$ M, L-glutamine 2 mM, pyruvate de sodium 1 mM) additionné de C3bi du complément (1/200) et préchauffé à 37°C. L'ensemble est incubé durant 20 min à 37°C. Au bout des 20 min d'incubation, la suspension est centrifugée (600 g, 4 min). Le culot de GR est remis en suspension dans du milieu phagocytose (RPMI 1640 Glutamax, HEPES 10 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 50  $\mu$ M, L-glutamine 2 mM, pyruvate de sodium 1 mM) préchauffé à 37°C.

- *Phagocytose classique et Immunofluorescence*

Dans le cas de la phagocytose induite par le CR3, les cellules sont pré-traitées 15 min à 37°C avec du PMA (Phorbol myristate acétate) 150 ng/ml. Les GR opsonisés ( $3 \cdot 10^6$  GR/puit de 1,9 cm<sup>2</sup>) avec des IgG/ IgM et C3bi sont mis au contact, durant différents temps (2 min, 5 min, 60 min), avec des macrophages murins RAW 264.7 ( $3 \cdot 10^5$  cellules/lamelle) adhérents sur des lamelles de verre ( $\emptyset$ 12 mm). Après internalisation des GR, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4%/sucrose durant 45 min à 4°C. Le PFA est neutralisée avec du NH<sub>4</sub>CL (50 mM) en PBS1X durant 7min. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec du PBS1X/SVF 2% / saponine 0,05% afin de marquer l'actine-F (phalloïdine-Alexa 546), et les globules rouges ( F(ab)<sub>2</sub> anti-IgG de lapin couplé à l'AMCA). Les lamelles sont montées sur lame en milieu de montage Fluoromount G.

Le nombre de GR internalisés est compté sur cinquante cellules observées par microscopie à épifluorescence (Microscope LEICA DMI6000 inversé, objectif 100x (1,4 NA), caméra MicroMAX (Princeton Instruments)). Les images acquises ont été traitées avec le logiciel ImageJ.

- *Phagocytose frustrée*

Les cellules transfectées sont déposées sur une lamelle de verre ( $\emptyset$  35 mm) intégrée au fond des boîtes (MatTek). Ces lamelles ont préalablement été lavées trois fois avec du PBS1X, puis

incubée toute la nuit à 4°C avec une goutte d'anticorps IgM anti-GR de mouton dilué (1/50) en PBS1X. Le lendemain, l'anticorps IgM anti-GR est éliminé et remplacé par le complément C3bi dilué en PBS1X (1/10) durant 30 min à température ambiante. Au bout des 30 min d'incubation, la goutte est retirée et remplacée par du milieu phagocytose sans rouge de phénol. L'adhésion des cellules à la surface opsonisée est suivie par microscopie à ondes évanescentes (iMIC, TILL Photonics). Le microscope est équipé d'une caméra CCD refroidie (iXonEM, Andor Technology), d'une chambre thermostatée à 37°C CO<sub>2</sub> et du logiciel de contrôle « Live Acquisition ». Les vidéos sont traitées avec le logiciel ImageJ.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

La phagocytose est un mécanisme cellulaire indispensable au bon fonctionnement de nombreux organismes. Chez les mammifères, ce processus d'internalisation et d'élimination de particules de grandes tailles ( $>0,5 \mu\text{m}$ ) sert à la fois au système immunitaire et l'homéostasie tissulaire. Les phagocytoses induites par les récepteurs aux opsonines, Fc $\gamma$ Rs et CR3, dépendent toutes deux de la dynamique du cytosquelette d'actine et du remodelage membranaire. De nombreuses études ont permis un enrichissement de la compréhension des voies de signalisation impliquées durant la phase de formation et d'extension des pseudopodes autour de la particule opsonisée. Cependant, peu d'études renseignent sur le mécanisme de fermeture et relargage des phagosomes dans le milieu intracellulaire.

Parallèlement, la phagocytose induite par le CR3 impliquant une signalisation plus complexe reste beaucoup moins étudiée que la phagocytose dépendante des Fc $\gamma$ Rs. Les acteurs et mécanismes moléculaires à l'origine des différences morphologiques observées entre les coupes phagocytaires générées par ces deux types de récepteurs ne sont pas connus. De même, la fonction de certaines protéines connues dans la signalisation « inside-out » ou « outside in » liée aux intégrines n'a pas été démontrée dans le cadre de la phagocytose dépendante du CR3. Au cours de ma thèse, j'ai étudié ces deux aspects de la phagocytose que je discute en deux parties ci-après.

### **1. La régulation croisée entre la dynamine-2 et l'actine-F au cours de la formation et de la fermeture des phagosomes**

Mon travail m'a permis d'identifier la dynamine-2 en tant que protéine responsable de la scission des phagosomes suite à l'activation des récepteurs Fc $\gamma$ s. J'ai également pu mettre en évidence une régulation croisée entre la dynamine-2 et le réseau d'actine-F dans les macrophages. L'utilisation de la microscopie à ondes évanescentes, dans des systèmes

expérimentaux astucieux sur des cellules vivantes, ont permis d'observer la formation et plus spécifiquement la fermeture des phagosomes pour la toute première fois.

- *Co-localisation entre la dynamine-2 et l'actine-F à la coupe phagocytaire*

Il y a 17 ans, le groupe d'Alan Aderem a démontré le recrutement de la dynamine-2 aux coupes phagocytaires 5 min après l'activation des récepteurs Fcγ<sub>3</sub>, CR3 et des récepteurs zymosan dans des macrophages péritonéaux murins ou des lignées de macrophages murins. En suivant la formation des phagosomes, en temps réel, dans notre système de phagocytose 3D ou par phagocytose frustrée, j'ai précisé l'organisation spatio-temporelle de la dynamine-2 à la coupe phagocytaire suite à l'engagement des récepteurs Fcγ<sub>3</sub>. Le recrutement simultané de la dynamine-2 et l'actine-F se fait tout au long du processus d'internalisation : de l'initiation de la coupe phagocytaire en passant par l'extension des pseudopodes jusqu'à la fermeture des phagosomes. Ces protéines co-localisent et forment un anneau caractéristique de l'activation séquentielle des récepteurs selon un système de « fermeture éclair », et de l'extension des pseudopodes dans un système de phagocytose frustrée. Ce résultat suggère une fonction de la dynamine-2 dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Cette nouvelle fonction de la dynamine a déjà été énoncée. En effet, la dynamine, via son domaine PRD, interagit avec des protéines telles que la profiline, la cortactine, ou encore Abp1, capables de lier l'actine-F ou de stimuler sa dynamique (Orth and McNiven 2003, Menon and Schafer 2013). Une co-localisation entre la dynamine-2 et l'actine-F a été observée au niveau de structures telles que les lamellipodes, les podosomes et invadopodes. Cependant, aucune étude, dans les macrophages, ne rapporte le recrutement de la protéine HS1, homologue de la cortactine au site de la phagocytose. Celle-ci pourrait faire le lien entre la dynamine-2 et le complexe Arp2/3.

Comme dans l'endocytose, le recrutement de la dynamine-2 au site de la phagocytose a été décrit comme étant dépendant de l'interaction de son domaine PRD avec le domaine SH3 de la protéine amphiphysine II dans les macrophages (Gold, Morrissette et al. 2000). Celle-ci agit en aval de la PI3K. L'expression dans des macrophages d'un mutant dominant négatif de l'amphiphysine, dépourvue de son domaine SH3, conduit à une

inhibition de la phagocytose de 75%, suggérant que l'interaction entre la dynamine et l'amphiphysine est cruciale pour une phagocytose efficace. Cependant, de façon surprenante, la surexpression d'un mutant dominant négatif Dyn $\Delta$ PRD dans les macrophages RAW264.7 mis au contact de globules rouges opsonisés avec des IgG, entre mes mains, n'induit qu'une faible inhibition de l'internalisation (25%) (résultats non présentés). Ce résultat contradictoire suggère que l'amphiphysine pourrait recruter d'autres acteurs de la phagocytose et que le recrutement de la dynamine-2 pourrait être régulé par d'autres mécanismes tels que son interaction directe avec le PI(4,5)P<sub>2</sub> par le biais de son domaine PH, ou encore avec l'actine. Une étude du laboratoire de Sanja Sever a mis en évidence l'existence d'un domaine de liaison à l'actine (ABD) dans la séquence des dynamines 1 et 2 (Gu, Yaddanapudi et al. 2010). *In vitro*, les filaments courts d'actine-F stimulent l'oligomérisation de la dynamine-1 en anneau dépendamment de la présence de GTP. De plus, comme il a été décrit dans l'endocytose indépendante de la clathrine (Sauvonnet, Dujeancourt et al. 2005, Grassart, Meas-Yedid et al. 2010), le recrutement de la dynamine-2 au site de la phagocytose pourrait également se faire par le biais de la protéine HS1 homologue de la cortactine. A ce jour, aucune étude ne rapporte l'implication de cette protéine au cours de la phagocytose. Il serait donc intéressant d'analyser sa contribution au cours de ce processus.

- *Activité GTPase de la dynamine et efficacité de phagocytose*

L'inhibition de l'activité GTPase de la dynamine-2 par surexpression d'un mutant dominant négatif DynK44A, par ARN interférence ou par traitement avec une drogue inhibitrice induit un défaut d'internalisation des particules opsonisées. Ceci confirme les observations faites dans les macrophages primaires murins ou différentes lignées cellulaires de macrophages mis au contact de particules ciblant les Fc $\gamma$ s, le CR3 ou les récepteurs au zymosan (Gold, Underhill et al. 1999). Initialement, le défaut de phagocytose observé fut lié au rôle de la dynamine-2 dans la scission des vésicules d'endocytose ou des vésicules bourgeonnant à la surface du *trans*-Golgi nécessaire à l'exocytose focalisée ou des phénomènes compensatoires d'endocytose. En effet, une étude basée sur la mesure de

capacitance de la membrane plasmique qui permet d'apprécier les cycles d'endocytose-exocytose révèle que le défaut d'activité GTPase de la dynamine-2 conduit à une inhibition de l'augmentation de la capacitance membranaire caractéristique de la phagocytose en condition physiologique (Di 2003). En revanche, le rôle de la dynamine-2 dans des phénomènes compensatoires d'endocytose au site de formation du phagosome n'a pas été démontré. Sa présence au site de la phagocytose n'est pas liée à des puits d'endocytose couverts de clathrine. En effet, nous n'avons détecté aucun signal associé à la clathrine au niveau des coupes phagocytaires visualisées par TIRFM ou par microscopie à épifluorescence (Braun, Deschamps et al. 2007, Marie-Anais, Mazzolini et al. 2016). Bien qu'une étude ait montré un recrutement de la clathrine au niveau de certaines coupes phagocytaires, l'extinction de son expression ou la surexpression de mutants d'EPS15 qui inhibent l'endocytose n'affecte pas l'efficacité de phagocytose via confirmant que l'endocytose clathrine dépendante n'influence pas l'étape d'internalisation (Niedergang, Colucci-Guyon et al. 2003, Tse, Furuya et al. 2003). Cependant, le rôle de la dynamine-2 dans d'autres formes d'endocytose notamment indépendantes de la clathrine, ne peut être exclu à ce stade. Ainsi vérifier la présence de structure telles que les caveoles au site de la phagocytose pourrait compléter cette étude.

- *La dynamine et l'actine au cours de la phagocytose*

L'organisation en anneau de la dynamine-2-GFP lors de la formation de la coupe phagocytaire est différente de l'accumulation sous forme de « spots » caractéristiques des puits d'endocytose. Sa co-localisation avec l'actine-F suggère davantage un rôle dans le remodelage du cytosquelette. L'observation des coupes phagocytaires abortives par microscopie électronique à balayage dans les cellules exprimant le mutant dominant négatif DynK44A montre un phénotype dans lequel l'extension des pseudopodes est arrêtée dans la région équatoriale de la particule. Ce phénotype est comparable à celui obtenu suite à l'inhibition de la PI3K ou encore l'inhibition de l'exocytose focalisée régulée par AP-1 et Arf6 (Araki, Johnson et al. 1996, Niedergang, Colucci-Guyon et al. 2003, Braun, Deschamps et al. 2007). Néanmoins, l'impact de ces inhibitions sur le remodelage de l'actine-F n'est pas le même. En effet, l'étude d'E. Gold révèle que les cellules exprimant le mutant DynK44A, sont

capables de lier les particules et de polymériser l'actine-F au site de contact, aucune analyse quantitative n'a été effectuée. J'ai donc quantifié le signal d'actine-F généré par la phalloïdine couplée à l'Alexa 546 à la base des coupes phagocytaires dans les macrophages surexprimant la dynamine-2 sauvage ou mutée et traités ou non avec le dynasore, une drogue inhibitrice de l'activité GTPase. L'absence de l'activité GTPase de la dynamine-2 conduit à un défaut d'enrichissement de l'actine-F au site de la phagocytose observé par microscopie à épifluorescence sur des cellules fixées. Lors de l'inhibition des protéines PI3K, AP-1 et Arf6, l'enrichissement initial en actine-F à la coupe phagocytaire n'est pas perturbé. L'ensemble de ces résultats suggère que la dynamine joue un rôle précoce dans le remodelage de l'actine-F.

Nous n'avons pas regardé de façon précise l'implication de la dynamine dans la scission des vésicules à partir des compartiments intracellulaires. Bien que son inhibition induit un défaut de l'augmentation de la capacitance membranaire au cours de la phagocytose (Di, Nelson et al. 2003), aucune étude ne prouve son implication directe sur la scission des vésicules requises à la coupe phagocytaire. De plus l'inhibition de la dynamine peut induire un défaut d'endocytose qui déséquilibrerait la balance endocytose/exocytose de la cellule et modifierait la capacitance membranaire.

L'ajout de dynasore au cours de la « phagocytose 3D » permettant de suivre la formation des phagosomes et de visualiser l'extrémité des pseudopodes en temps réel par microscopie à ondes évanescentes, a permis de mettre en évidence le rôle de la dynamine-2 à deux étapes distinctes de l'internalisation : extension des pseudopodes et fermeture des phagosomes.

Premièrement, l'activité GTPase de la dynamine-2 est requise pour la polymérisation d'actine-F au cours de l'étape d'extension des pseudopodes. En effet, une inhibition précoce de l'activité GTPase de la dynamine-2 suite à l'initiation de la polymérisation d'actine-F conduit à un arrêt de la polymérisation d'actine-F et de l'extension des pseudopodes. Des expériences d'immunoprécipitation avec des cellules transfectées pour exprimer la dynamine-2-GFP ou la GFP seule comme témoin, et soumises à une cinétique de phagocytose, ont mis en évidence une interaction entre la dynamine-2 et l'actine. Cette

interaction suggère qu'ensemble, la dynamine et l'actine régulent la phagocytose. Ces dernières années de nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence une régulation croisée entre la dynamine-1 et l'actine-F. Des études du groupe de Sanja Sever ont révélé que l'activité GTPase de la dynamine-1 est nécessaire à la polymérisation des courts filaments d'actine coiffés de la gelsoline. *In vitro*, cette dernière est déplacée par la dynamine, ce qui par la suite permet la polymérisation d'actine (Gu, Yaddanapudi et al. 2010). L'exact mécanisme moléculaire n'est pas encore élucidé. De façon surprenante, la liaison de la dynamine-1 à l'actine-F va stimuler l'oligomérisation de la dynamine en hélice ou en anneau *in vitro*, mais aussi au niveau de la zone de transition entre l'actine corticale et les fibres de stress dans les podocytes et une lignée fibroblastique Cos-7 (Gu, Chang et al. 2014). Bien que très similaires, les fonctions de la dynamine-1 et de la dynamine-2 ne sont pas totalement redondantes. La dynamine-1 est principalement exprimée dans le cerveau et est retrouvée dans certaines lignées cellulaires (Reis, Chen et al. 2015). Cependant, je n'ai pas détecté sa présence dans les macrophages murins RAW264.7 lors d'expériences de qTR-PCR (résultat non montré). En revanche, j'ai pu mettre en évidence une régulation croisée entre la dynamine-2 et l'actine-F dans les macrophages au cours de la phagocytose. J'ai montré que l'inhibition en temps réel de la polymérisation d'actine-F par l'utilisation de la cytochalasine D, qui coiffe l'extrémité barbue des filaments d'actine, empêche le recrutement de la dynamine-2 au site de la phagocytose. L'utilisation de la latrunculine A au cours de la fermeture du phagosome arrête le processus avec une accumulation transitoire de la dynamine-2. Ainsi l'intégrité de la dynamique du cytosquelette d'actine-F est nécessaire au maintien et à la fonction de la dynamine-2 à la coupe phagocytaire. A l'avenir, analyser l'architecture des filaments dans les pseudopodes, vérifier la présence de la gelsoline et son interaction avec la dynamine-2 et l'actine-F au cours de la formation des phagosomes dans les macrophages permettraient de disséquer davantage le mécanisme moléculaire impliqué dans la régulation croisée. De plus, ces observations sont cohérentes avec des données issues d'études récentes mettant en lumière l'implication de l'actine-F durant l'endocytose (Merrifield, Feldman et al. 2002, Merrifield, Perrais et al. 2005, Grassart, Cheng et al. 2014, Picco, Mund et al. 2015). La polymérisation d'actine-F précède l'accumulation de la dynamine aux CCPs et est nécessaire à la formation des vésicules couvertes de clathrine.

Deuxièmement, la dynamine-2 est requise pour la scission du phagosome. J'ai mis en évidence pour la première fois le recrutement et l'accumulation de la dynamine-2 à l'extrémité des pseudopodes au moment de la scission du phagosome. L'inhibition de son activité GTPase en temps réel sur des macrophages vivants, induit un blocage de l'internalisation avec un phagosome accolé à la membrane plasmique. Parallèlement, l'inhibition de la polymérisation d'actine, dans ce même système, peu de temps avant la fermeture du phagosome, bloque aussi l'internalisation du GR. En revanche, le défaut d'activité du complexe Arp2/3, au moment où la fermeture du phagosome est bien engagée, ne bloque pas le processus. Ces résultats suggèrent qu'à l'étape de fermeture des phagosomes, la dynamine-2 est responsable de la scission du phagosome et que l'actine-F pourrait contrôler la tension membranaire afin de compléter la constriction exercée par l'hélice de dynamine-2 juste avant la scission du phagosome comme décrit par le groupe d'Aurélien Roux (Morlot and Roux 2013).

Suite à une étude du groupe de Pietro De Camilli, l'utilisation du dynasore comme drogue inhibitrice pourrait être remise en question (Park, Shen et al. 2013). En effet, malgré l'absence de ses trois protéines cibles, le dynasore inhibe la pinocytose et diminue le signal d'actine-F au niveau des lamellipodes. Toutefois, il est possible qu'en absence de sa principale cible, le dynasore s'oriente sur des cibles de moindre affinité qui normalement ne seraient pas touchées en présence de la dynamine.

En conclusion, suivre la localisation de la dynamine-2 dans les macrophages vivants m'a permis de révéler le rôle de la dynamine-2 dans la scission du phagosome. Le système de « phagocytose 3D » permettra dans l'avenir de disséquer avec une meilleure définition les machineries impliquées au cours de la formation et de la fermeture des phagosomes.

## **2. Les mécanismes moléculaires en aval du CR3.**

- *Organisation spatio-temporelle des coupes phagocytaires en aval du CR3*

Contrairement à la phagocytose FcγR, les études des événements cellulaires se déroulant au cours de la phagocytose dépendante du CR3 sont moins bien avancées. L'organisation

spatio-temporelle des coupes phagocytaires est méconnue et les différences morphologiques entre les coupes phagocytaires Fc $\gamma$ Rs et CR3 ne sont pas totalement élucidées.

J'ai donc initié l'étude de l'organisation spatio-temporelle des coupes phagocytaires dépendantes du CR3, en utilisant le système de phagocytose frustrée visualisée par microscopie à ondes évanescentes. Le suivi de l'actine-F ne révèle pas la formation d'un anneau typique d'une coupe phagocytaire induite par les Fc $\gamma$ Rs (Marion, Mazzolini et al. 2012). Au contraire l'actine-F apparaît sous forme de foci qui se polymérisent et dépolymérisent tout en élargissant progressivement la région d'adhérence. Ceci est cohérent avec l'organisation observée sur les cellules fixées (Allen and Aderem 1996) (Figure 22) Parallèlement la taline co-localise avec l'actine-F et la myosine II est recrutée en arrière plan. Cette organisation fait penser aux complexes formés suite à l'interaction entre les intégrines et la matrice extracellulaire appelées adhésions naissantes (Nobes and Hall 1995, Zaidel-Bar, Ballestrem et al. 2003). Ces structures ont été associées aux intégrines  $\beta$ 3 et murent en points focaux d'adhésion suite à l'activation de la Rho-GTPase RhoA (Rottner, Hall et al. 1999, Ballestrem, Hinz et al. 2001). Comme dans la phagocytose, la taline est recrutée très tôt au cours de la formation des adhésions naissantes qui s'enrichissent par la suite d' $\alpha$ -actinine, de vinculine et de paxiline. De plus il a été démontré que l'activité contractile de la myosine II agit comme un interrupteur majeur qui favorise l'accumulation des facteurs de maturation ou de dissociation impliqués dans les protrusions (Kuo, Han et al. 2011). Par analyse protéomique, cette étude a identifié 459 protéines dont l'abondance est modifiée aux point focaux d'adhésion suite à l'inhibition de la myosine II. Au cours de la phagocytose via le CR3 et non via le Fc $\gamma$ R, la myosine II joue un rôle en aval de ROCK et en amont des nucléateurs d'actine. Son inhibition par une drogue inhibitrice ML-7 induit inhibe l'internalisation de 40% avec un défaut d'enrichissement en actine-F à la coupe phagocytaire (Olazabal, Caron et al. 2002). Sa présence est donc requise pour le remodelage de l'actine-F comme au point focaux d'adhésion.

Tout comme dans la phagocytose induite par le CR3, la formation des points focaux est régulée par les formines mDia1 et mDia2 ou encore par la kinase effectrice de Rho-A, ROCK (Watanabe, Kato et al. 1999, Gupton, Eisenmann et al. 2007).

Ainsi les protéines impliquées dans le remodelage de l'actine en aval des récepteurs au complément CR3, à savoir Rho-A, ROCK, mDia1, myosine II, la taline, la vinculine sont impliquées dans l'adhésion cellulaire. La phagocytose et l'adhésion cellulaire présentent donc de nombreuses similitudes (Cougoule, Wiedemann et al. 2004). En 1970 North a énoncé que l'adhésion cellulaire à un substrat pouvait être assimilée à une forme de phagocytose frustrée d'une particule de taille infinie (North 1970). A l'avenir, il serait intéressant d'analyser au cours de la phagocytose, l'organisation spatio-temporelle et le rôle précis (par expression de mutants) des protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette lors de l'adhésion cellulaire, telles que la vinculine, l' $\alpha$ -actinine, mais aussi des protéines RIAM, et VASP.

J'ai également montré qu'il existe un apport d'endomembranes par des vésicules de recyclage VAMP3 positives au site de la phagocytose CR3 dépendante. En effet l'exocytose focalisée de vésicules de recyclages VAMP3 positives fut uniquement démontré dans le cas de la phagocytose induite par les Fc $\gamma$ R (Bajno, Peng et al. 2000). Cependant le recrutement de ces vésicules semblent être moins dense suite à l'activation du CR3 que dans le cas de la phagocytose dépendante des Fc $\gamma$ R comme démontré dans (Marion, Mazzolini et al. 2012). L'apport de ces vésicules permettant l'extension membranaire au site de la phagocytose devrait être une caractéristique de toutes les phagocytose quel que soit le récepteur engagé. Il a été démontré que ces vésicules permettent le transport d'éléments de signalisation qui régule le cytosquelette et les phosphoinositides à la coupe phagocytaire (Marion, Mazzolini et al. 2012). Par conséquent, leur abondance au site de la phagocytose pourrait être à l'origine des différences morphologiques observées entre les coupes phagocytaires induite par le Fc $\gamma$ R et les coupes phagocytaires induites par le CR3.

Ces observations très préliminaires doivent être répétées et confirmées par une quantification des vésicules de recyclages dans la région d'adhésion à la surface opsonisée par des méthodes de suivi (« tracking ») d'objets par vidéomicroscopie.

- *La filamine, lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine-F*

En outre des nombreuses similitudes entre l'adhésion cellulaire et la phagocytose, il existe vraisemblablement des différences dans les machineries moléculaires impliquées dans la détection des propriétés mécaniques entre une surface d'adhésion et une particule à ingérer. Il existe aussi potentiellement des différences dans l'activité contractile exercée par le cytosquelette d'actine et ses protéines partenaires au cours des deux processus.

Ces dernières années des études ont mis en lumière le rôle activateur de la taline-1 et inhibiteur de la filamine en réponse à des stimuli chimiques ou mécaniques sur l'activité des intégrines (Bouvard, Pouwels et al. 2013, Calderwood, Campbell et al. 2013, Truong, Shams et al. 2015). En effet, il a été montré que la taline-1 qui lie la chaîne  $\beta$  des intégrines forme un complexe avec la vinculine suite à l'application de signaux mécaniques issus de la MEC. Ce complexe transmet le signal au réseau d'acto-myosine pour permettre le recrutement des protéines qui participent à la formation des points focaux d'adhésion (Carisey, Tsang et al. 2013, Ciobanasi, Faivre et al. 2014). De même, la filamine A, qui possède une inhibition intra-moléculaire masquant son site d'interaction avec la chaîne  $\beta$  des intégrines, lie la chaîne  $\beta 7$  suite à l'application de forces mécaniques (Ehrlicher, Nakamura et al. 2011). La filamine et la taline possèdent le même site d'interaction sur la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  des intégrines. Cependant, la raison pour laquelle ces deux protéines ont des effets opposés sur l'activation des intégrines reste encore obscure.

Etudier l'effet régulateur de ces protéines dans un processus biologique tel que la phagocytose pourrait permettre d'éclaircir ces fonctions opposées. J'ai donc initié l'étude du rôle de la filamine dans les macrophages au cours de la phagocytose induite par le CR3. Pour ce faire j'ai atténué l'expression des filamines A et B dans les macrophages murins RAW264.7 par ARN interférence ou par surexpression de la protéine E3-ubiquitine ligase ASB2 $\alpha$  qui stimule la dégradation de toutes les isoformes de la filamine. Puis ces macrophages ont été mis au contact de particules opsonisées afin de cibler les récepteurs Fc $\gamma$ Rs ou CR3. D'après les résultats obtenus, la filamine ne joue pas un rôle direct sur l'activation des récepteurs comme il aurait été attendu. En effet, en absence de la filamine, l'association des particules aux macrophages n'est pas modifiée que ce soit dans le cadre de

la phagocytose FcγRs ou CR3. Par conséquent la filamine se semble pas impliquée dans la signalisation « inside-out » des intégrines CR3. Ce résultat pourrait s'expliquer par des mécanismes compensatoires mis en place au sein des cellules déplétées. En effet, la filamine n'est pas la seule protéine inhibitrice de l'activité des intégrines. La présence de motifs NPXY dans la queue cytoplasmique des chaînes β favorise le recrutement de protéines contenant des domaines de liaison aux phosphotyrosines (domaine PTB). Ainsi, *in vitro*, la protéine DOK-1 (« docking protein 1 »), qui possède un domaine PTB, lie la chaîne β2 sur la même région que la taline et la filamine, et inhibe l'activation des intégrines (Calderwood, Fujioka et al. 2003, Wegener, Partridge et al. 2007). Son rôle de régulateur négatif de l'activité des intégrines α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> fut démontré récemment dans les plaquettes, et l'activité de DOK-1 dans les macrophages reste à déterminer (Niki, Nayak et al. 2016). Bien qu'il soit admis que les isoformes A et B sont ubiquitaires tandis que la filamine C est restreinte aux muscles squelettiques et cardiaques, une étude analysant la fonction de la filamine dans la migration cellulaire a mis en évidence que dans une lignée de fibroblastes humains HT1080, suite à la déplétion des isoformes A et B, l'expression de la filamine C était augmentée (Baldassarre, Razinia et al. 2009). Il n'est donc pas à exclure que la filamine C pourrait compenser l'activité des isoformes A et B dans le cadre de nos expériences d'ARN interférence. Cependant, il est à noter que la protéine E3 ubiquitine ligase a été décrite pour stimuler la dégradation des trois isoformes de la filamine (Baldassarre, Razinia et al. 2009). Par conséquent, la non modification du pourcentage de particules opsonisées associées aux macrophages dans les cellules surexprimant la protéine ASB2α-GFP laisse à penser qu'aucune des isoformes de la filamine n'est impliquée dans la régulation de l'activité des récepteurs FcγR et CR3. A l'avenir, il serait judicieux de mieux investiguer l'expression des différentes isoformes de la filamine dans les macrophages RAW264.7 à l'état de repos ou surexprimant ASB2α par analyse quantitative des ARNs messagers par qRT-PCR et aussi des niveaux protéiques par western-blot.

Le pourcentage de particules internalisées donne des résultats opposés suite aux approches d'ARN interférence ou de surexpression de la protéine ASB2α-GFP. Il est à noter que le comptage du nombre de particules associées ou internalisées dans les macrophages

est fait à l'aveugle dans les expériences d'ARN interférence du fait de l'incompatibilité de certains immunomarquages, contrairement au comptage effectué dans les expériences de surexpression où les cellules analysées présentent à la fois un signal GFP positif et un faible signal en filamine A. Ceci peut être à l'origine d'un biais. Cependant nous pouvons tout de même en tirer quelques informations. Dans le cas de la phagocytose induite par les Fc $\gamma$ Rs, la filamine est présente à la fois à la coupe phagocytaire, où elle joue certainement un rôle dans l'organisation architecturale du réseau d'actine-F, et aux extrémités des macrophages primaires humains (Figure 40). De nombreux arguments sont en faveur de l'activité synergique du complexe Arp2/3 et de la filamine A. En effet le nucléateur majeur d'actine qui a été mis en évidence dans le remodelage d'actine suite à l'activation de ces récepteurs phagocytaires est le complexe Arp2/3. Celui-ci permet la formation d'un réseau de filaments actine branchés à 70° (Higgs and Pollard 2001). La filamine quant à elle, permet la formation et le maintien des filaments d'actine en un réseau orthogonal beaucoup plus solide qu'un réseau d'actine-F pur *in vitro*. Il a été démontré dans des cellules de mélanome humain que la filamine A stabilise le réseau d'actine-F formé par le complexe Arp2/3 et met en place le réseau orthogonal nécessaire à la locomotion cellulaire. Le complexe Arp2/3 seul génère un réseau d'actine-F peu stable qui est insuffisant à maintenir la stabilité mécanique nécessaire à la locomotion (Flanagan, Chou et al. 2001, Stossel, Condeelis et al. 2001). On peut alors supposer que la filamine à la coupe phagocytaire participe au maintien de l'architecture de l'actine pour une internalisation plus efficace mais n'est pas absolument nécessaire. Il serait intéressant, par vidéomicroscopie, de mesurer les vitesses d'internalisation des particules dans des macrophages témoins d'une part et dépourvus de filamine d'autre part afin d'analyser le rôle de la filamine sur les cinétiques d'internalisation.

Dans le cas de la phagocytose induite par le CR3, la présence de la filamine à la coupe phagocytaire semble être associée à la signalisation « outside-in ». En effet, suite à l'inhibition d'expression par ARN interférence de la filamine, le pourcentage de phagocytose n'est pas modifié comparé à celui des cellules témoins. Ceci peut s'expliquer par l'expression de la filamine C qui compenserait l'absence des isoformes A et B. En revanche la dégradation des trois isoformes de la filamine par ASB2 $\alpha$ -GFP induit une inhibition de l'efficacité de

phagocytose, ce qui suggère un rôle régulateur de la filamine dans le processus. En plus du complexe Arp2/3, la formine mDia1 responsable de la polymérisation de l'actine-F en filament droit est nécessaire à la formation des coupes phagocytaires conduisant à une architecture différente du réseau d'actine décrit en aval des FcγRs. Donc la filamine pourrait également exercer un rôle dans l'organisation orthogonal du réseau d'actine.

Les résultats présentés ont été obtenus à partir d'une lignée cellulaire de macrophages murins et sont peu informatifs sur la fonction de la filamine A aux coupes phagocytaires. Il serait approprié de réaliser des expériences de déplétion des trois isoformes de la filamine dans les macrophages primaires humains et de vérifier le niveau d'expression des récepteurs phagocytaires FcγRs et CR3. Par la suite, en utilisant des anticorps capables (mPAC) de reconnaître la forme pré-activée des récepteurs CR3, il serait intéressant de vérifier leur état d'activation dans les macrophages en présence ou en absence de la filamine. Des cinétiques de phagocytose pourraient ensuite être réalisées. Parallèlement, l'analyse des coupes phagocytaires en formation dans notre système de phagocytose 3D pourrait apporter des informations quant à la cinétique de recrutement de la filamine et de la taline au cours de la phagocytose.

### **3. Conclusion générale**

La phagocytose est un processus biologique complexe qui fait intervenir un grand nombre de machineries cellulaires. Ceci en fait un sujet riche en problématiques diverses. Ainsi la phagocytose a permis l'étude de différentes régulations croisées comme notamment, entre le cytosquelette d'actine-F et les microtubules ou encore le cytosquelette et le trafic vésiculaire ; mes travaux viennent donc enrichir ces connaissances et mettent en évidence une interdépendance entre l'actine-F et la dynamine-2. Grâce à des systèmes expérimentaux originaux nous avons aussi montré le recrutement et l'activité de scission de la dynamine-2 pour la toute première fois au site de fermeture des phagosomes. Nous avons également initié l'étude du rôle de la filamine dans la régulation de la phagocytose. Cependant ces résultats préliminaires doivent être complétés avant de conclure quant à la fonction de la filamine au cours de la phagocytose.

Ces systèmes expérimentaux ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes de biologie cellulaire associés à la formation des coupes phagocytaires. La microscopie à ondes évanescentes adaptée aux systèmes de phagocytose frustrée ou en trois dimensions permet l'analyse avec une haute résolution des événements moléculaires au cours du processus. Ils peuvent être adaptés à différentes particules cibles telles que les bactéries, et différents types cellulaires tels que les neutrophiles ou les cellules dendritiques. Ainsi nous avons montré en partie l'organisation spatio-temporelle du cytosquelette d'actine-F et de quelques partenaires en aval de l'activation des récepteurs au complément dans les macrophages. Des similitudes avec les mécanismes d'adhésion sont à noter. Ainsi la phagocytose via le CR3 peut être proposée comme un bon modèle pour étudier la régulation des intégrines, également impliquées au cours de la migration et de l'adhésion cellulaire.

De plus, la question du mécanisme par lequel les cellules s'adaptent aux forces intra- et extracellulaires pourrait être posée dans le cadre de la phagocytose via le CR3. En effet, ces dernières années un nombre croissant d'études *in vitro* démontre que les protéines de liaison à l'actine telles que la taline et la filamine sont impliquées dans les signaux de mécanotransduction (Rognoni, Stigler et al. 2012, Ciobanasu, Faivre et al. 2014, Ciobanasu, Faivre et al. 2015). Par conséquent l'étude de ces protéines dans le cadre de la phagocytose induite par le CR3 apporterait des données non négligeables à l'amélioration de la compréhension de ces mécanismes au sein de la cellule.

Au delà d'être une intégrine, le CR3 est un récepteur aux microbes opsonisés avec du complément (Roozendaal and Carroll 2006). Il est donc crucial pour la réponse immunitaire immédiate face à des bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Salmonella Typhimurium*. Comprendre son mécanisme d'action est donc d'un intérêt général.

## Références Bibliographiques

---

- Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe and P. Cresswell (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**(22): 12889-12894.
- Aghamohammadzadeh, S. and K. R. Ayscough (2009). "Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis." *Nat Cell Biol* **11**(8): 1039-1042.
- Allen, L. A. and A. Aderem (1996). "Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages." *J Exp Med* **184**(2): 627-637.
- Allen, L. A., C. Yang and J. E. Pessin (2002). "Rate and extent of phagocytosis in macrophages lacking vamp3." *J Leukoc Biol* **72**(1): 217-221.
- Araki, N., T. Hatae, A. Furukawa and J. A. Swanson (2003). "Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fc $\gamma$ -receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages." *J Cell Sci* **116**(Pt 2): 247-257.
- Araki, N., M. T. Johnson and J. A. Swanson (1996). "A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages." *J Cell Biol* **135**(5): 1249-1260.
- Bajno, L., X. R. Peng, A. D. Schreiber, H. P. Moore, W. S. Trimble and S. Grinstein (2000). "Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation." *J Cell Biol* **149**(3): 697-706.
- Baldassarre, M., A. Pompeo, G. Beznoussenko, C. Castaldi, S. Cortellino, M. A. McNiven, A. Luini and R. Buccione (2003). "Dynamins participate in focal extracellular matrix degradation by invasive cells." *Mol Biol Cell* **14**(3): 1074-1084.
- Baldassarre, M., Z. Razinia, C. F. Burande, I. Lamsoul, P. G. Lutz and D. A. Calderwood (2009). "Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration." *PLoS One* **4**(11): e7830.
- Ballestrem, C., B. Hinz, B. A. Imhof and B. Wehrle-Haller (2001). "Marching at the front and dragging behind: differential  $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior." *J Cell Biol* **155**(7): 1319-1332.
- Basquin, C., V. Malarde, P. Mellor, D. H. Anderson, V. Meas-Yedid, J. C. Olivo-Marin, A. Dautry-Varsat and N. Sauvonnet (2013). "The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors." *J Cell Sci* **126**(Pt 5): 1099-1108.
- Basquin, C. and N. Sauvonnet (2013). "Phosphoinositide 3-kinase at the crossroad between endocytosis and signaling of cytokine receptors." *Commun Integr Biol* **6**(4): e24243.

- Basquin, C., M. Trichet, H. Vihinen, V. Malarde, T. Lagache, L. Ripoll, E. Jokitalo, J. C. Olivo-Marin, A. Gautreau and N. Sauvonnet (2015). "Membrane protrusion powers clathrin-independent endocytosis of interleukin-2 receptor." *EMBO J* **34**(16): 2147-2161.
- Baum, B. and P. Kunda (2005). "Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own." *Curr Biol* **15**(8): R305-308.
- Becker, T., A. Volchuk and J. E. Rothman (2005). "Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(11): 4022-4026.
- Beemiller, P., A. D. Hoppe and J. A. Swanson (2006). "A phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signal transition regulates ARF1 and ARF6 during Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis." *PLoS Biol* **4**(6): e162.
- Bello, N. F., I. Lamsoul, M. L. Heuze, A. Metais, G. Moreaux, D. A. Calderwood, D. Duprez, C. Moog-Lutz and P. G. Lutz (2009). "The E3 ubiquitin ligase specificity subunit ASB2 $\beta$  is a novel regulator of muscle differentiation that targets filamin B to proteasomal degradation." *Cell Death Differ* **16**(6): 921-932.
- Beutler, B. (2004). "Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin?" *Nat Rev Immunol* **4**(7): 498.
- Binker, M. G., L. I. Cosen-Binker, M. R. Terebiznik, G. V. Mallo, S. E. McCaw, E. L. Eskelinen, M. Willenborg, J. H. Brumell, P. Saftig, S. Grinstein and S. D. Gray-Owen (2007). "Arrested maturation of Neisseria-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2." *Cell Microbiol* **9**(9): 2153-2166.
- Blander, J. M. (2007). "Coupling Toll-like receptor signaling with phagocytosis: potentiation of antigen presentation." *Trends Immunol* **28**(1): 19-25.
- Bohdanowicz, M., D. M. Balkin, P. De Camilli and S. Grinstein (2012). "Recruitment of OCRL and Inpp5B to phagosomes by Rab5 and APPL1 depletes phosphoinositides and attenuates Akt signaling." *Mol Biol Cell* **23**(1): 176-187.
- Booth, J. W., W. S. Trimble and S. Grinstein (2001). "Membrane dynamics in phagocytosis." *Semin Immunol* **13**(6): 357-364.
- Botelho, R. J., M. Teruel, R. Dierckman, R. Anderson, A. Wells, J. D. York, T. Meyer and S. Grinstein (2000). "Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis." *J Cell Biol* **151**(7): 1353-1368.
- Boucrot, E., A. P. Ferreira, L. Almeida-Souza, S. Debard, Y. Vallis, G. Howard, L. Bertot, N. Sauvonnet and H. T. McMahon (2015). "Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway." *Nature* **517**(7535): 460-465.
- Boulant, S., C. Kural, J. C. Zeeh, F. Ubelmann and T. Kirchhausen (2011). "Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis." *Nat Cell Biol* **13**(9): 1124-1131.
- Bouvard, D., J. Pouwels, N. De Franceschi and J. Ivaska (2013). "Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(7): 430-442.

- Braun, V., C. Deschamps, G. Raposo, P. Benaroch, A. Benmerah, P. Chavrier and F. Niedergang (2007). "AP-1 and ARF1 control endosomal dynamics at sites of FcR mediated phagocytosis." *Molecular Biology of the Cell* **18**(12): 4921-4931.
- Braun, V., V. Fraisier, G. Raposo, I. Hurbain, J.-B. Sibarita, P. Chavrier, T. Galli and F. Niedergang (2004). "TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages." *The EMBO journal* **23**(21): 4166-4176.
- Braun, V. and F. Niedergang (2006). "Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis." *Biol Cell* **98**(3): 195-201.
- Bruhns, P. and F. Jonsson (2015). "Mouse and human FcR effector functions." *Immunol Rev* **268**(1): 25-51.
- Byeon, S. E., Y. S. Yi, J. Oh, B. C. Yoo, S. Hong and J. Y. Cho (2012). "The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses." *Mediators Inflamm* **2012**: 512926.
- Calderwood, D. A., I. D. Campbell and D. R. Critchley (2013). "Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(8): 503-517.
- Calderwood, D. A., Y. Fujioka, J. M. de Pereda, B. Garcia-Alvarez, T. Nakamoto, B. Margolis, C. J. McGlade, R. C. Liddington and M. H. Ginsberg (2003). "Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2272-2277.
- Calderwood, D. A., A. Huttenlocher, W. B. Kiosses, D. M. Rose, D. G. Woodside, M. A. Schwartz and M. H. Ginsberg (2001). "Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration." *Nat Cell Biol* **3**(12): 1060-1068.
- Calderwood, D. A., R. Zent, R. Grant, D. J. Rees, R. O. Hynes and M. H. Ginsberg (1999). "The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation." *J Biol Chem* **274**(40): 28071-28074.
- Canton, J., D. Neculai and S. Grinstein (2013). "Scavenger receptors in homeostasis and immunity." *Nat Rev Immunol* **13**(9): 621-634.
- Cao, H., F. Garcia and M. A. McNiven (1998). "Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells." *Mol Biol Cell* **9**(9): 2595-2609.
- Carisey, A., R. Tsang, A. M. Greiner, N. Nijenhuis, N. Heath, A. Nazgiewicz, R. Kemkemer, B. Derby, J. Spatz and C. Ballestrem (2013). "Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner." *Curr Biol* **23**(4): 271-281.
- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." *Science* **282**(5394): 1717-1721.
- Caron, E., A. J. Self and A. Hall (2000). "The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators." *Curr Biol* **10**(16): 974-978.
- Carreno, S., E. Caron, C. Cougoule, L. J. Emorine and I. Maridonneau-Parini (2002). "p59Hck isoform induces F-actin reorganization to form protrusions of the plasma membrane in a Cdc42- and Rac-dependent manner." *J Biol Chem* **277**(23): 21007-21016.

- Carreno, S., M. E. Gouze, S. Schaak, L. J. Emorine and I. Maridonneau-Parini (2000). "Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes." *J Biol Chem* **275**(46): 36223-36229.
- Castellino, F., G. Zhong and R. N. Germain (1997). "Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture." *Hum Immunol* **54**(2): 159-169.
- Cavaillon, J. M. (2011). "The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff." *J Leukoc Biol* **90**(3): 413-424.
- Cavnar, P. J., K. Mogen, E. Berthier, D. J. Beebe and A. Huttenlocher (2012). "The actin regulatory protein HS1 interacts with Arp2/3 and mediates efficient neutrophil chemotaxis." *J Biol Chem* **287**(30): 25466-25477.
- Chappie, J. S., S. Acharya, M. Leonard, S. L. Schmid and F. Dyda (2010). "G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity." *Nature* **465**(7297): 435-440.
- Chappie, J. S., J. A. Mears, S. Fang, M. Leonard, S. L. Schmid, R. A. Milligan, J. E. Hinshaw and F. Dyda (2011). "A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke." *Cell* **147**(1): 209-222.
- Chavrier, P. and B. Goud (1999). "The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 466-475.
- Chen, M. S., R. A. Obar, C. C. Schroeder, T. W. Austin, C. A. Poodry, S. C. Wadsworth and R. B. Vallee (1991). "Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis." *Nature* **351**(6327): 583-586.
- Chen, Y. A. and R. H. Scheller (2001). "SNARE-mediated membrane fusion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 98-106.
- Chen, Y. J., P. Zhang, E. H. Egelman and J. E. Hinshaw (2004). "The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes." *Nat Struct Mol Biol* **11**(6): 574-575.
- Chernyak, L. and A. I. Tauber (1988). "The birth of immunology: Metchnikoff, the embryologist." *Cell Immunol* **117**(1): 218-233.
- Ciobanasu, C., B. Faivre and C. Le Clainche (2013). "Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions." *Eur J Cell Biol* **92**(10-11): 339-348.
- Ciobanasu, C., B. Faivre and C. Le Clainche (2014). "Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring." *Nat Commun* **5**: 3095.
- Ciobanasu, C., B. Faivre and C. Le Clainche (2015). "Reconstituting actomyosin-dependent mechanosensitive protein complexes in vitro." *Nat Protoc* **10**(1): 75-89.
- Clark, E. S., A. S. Whigham, W. G. Yarbrough and A. M. Weaver (2007). "Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia." *Cancer Res* **67**(9): 4227-4235.
- Clatworthy, M. R. and K. G. Smith (2004). "FcγRIIb balances efficient pathogen clearance and the cytokine-mediated consequences of sepsis." *J Exp Med* **199**(5): 717-723.

- Cocucci, E., F. Aguet, S. Boulant and T. Kirchhausen (2012). "The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit." *Cell* **150**(3): 495-507.
- Colucci-Guyon, E., F. Niedergang, B. J. Wallar, J. Peng, A. S. Alberts and P. Chavrier (2005). "A role for mammalian diaphanous-related formins in complement receptor (CR3)-mediated phagocytosis in macrophages." *Current biology: CB* **15**(22): 2007-2012.
- Cook, T. A., R. Urrutia and M. A. McNiven (1994). "Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**(2): 644-648.
- Coppolino, M. G., M. Krause, P. Hagendorff, D. A. Monner, W. Trimble, S. Grinstein, J. Wehland and A. S. Sechi (2001). "Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fc $\gamma$  receptor signalling during phagocytosis." *J Cell Sci* **114**(Pt 23): 4307-4318.
- Cougoule, C., A. Wiedemann, J. Lim and E. Caron (2004). "Phagocytosis, an alternative model system for the study of cell adhesion." *Semin Cell Dev Biol* **15**(6): 679-689.
- Cox, D., J. S. Berg, M. Cammer, J. O. Chingwundoh, B. M. Dale, R. E. Cheney and S. Greenberg (2002). "Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis." *Nat Cell Biol* **4**(7): 469-477.
- Cox, D., P. Chang, T. Kurosaki and S. Greenberg (1996). "Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly." *J Biol Chem* **271**(28): 16597-16602.
- Cox, D., P. Chang, Q. Zhang, P. G. Reddy, G. M. Bokoch and S. Greenberg (1997). "Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes." *J Exp Med* **186**(9): 1487-1494.
- Cox, D., D. J. Lee, B. M. Dale, J. Calafat and S. Greenberg (2000). "A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 680-685.
- Cox, D., C. C. Tseng, G. Bjekic and S. Greenberg (1999). "A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension." *J Biol Chem* **274**(3): 1240-1247.
- Critchley, D. R. (2009). "Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin." *Annu Rev Biophys* **38**: 235-254.
- Crowley, M. T., P. S. Costello, C. J. Fitzer-Attas, M. Turner, F. Meng, C. Lowell, V. L. Tybulewicz and A. L. DeFranco (1997). "A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc $\gamma$  receptors on macrophages." *J Exp Med* **186**(7): 1027-1039.
- Czibener, C., N. M. Sherer, S. M. Becker, M. Pypaert, E. Hui, E. R. Chapman, W. Mothes and N. W. Andrews (2006). "Ca<sup>2+</sup> and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes." *J Cell Biol* **174**(7): 997-1007.
- Damke, H., T. Baba, D. E. Warnock and S. L. Schmid (1994). "Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation." *J Cell Biol* **127**(4): 915-934.

- Dart, A. E., S. K. Donnelly, D. W. Holden, M. Way and E. Caron (2012). "Nck and Cdc42 cooperate to recruit N-WASP to promote FcγR-mediated phagocytosis." *J Cell Sci* **125**(Pt 12): 2825-2830.
- Dart, A. E., S. Tollis, M. D. Bright, G. Frankel and R. G. Endres (2012). "The motor protein myosin 1G functions in FcγR-mediated phagocytosis." *J Cell Sci* **125**(Pt 24): 6020-6029.
- Das, M., S. S. Ithychanda, J. Qin and E. F. Plow (2011). "Migfilin and filamin as regulators of integrin activation in endothelial cells and neutrophils." *PLoS One* **6**(10): e26355.
- Das, M., E. Scappini, N. P. Martin, K. A. Wong, S. Dunn, Y. J. Chen, S. L. Miller, J. Domin and J. P. O'Bryan (2007). "Regulation of neuron survival through an intersectin-phosphoinositide 3'-kinase C2beta-AKT pathway." *Mol Cell Biol* **27**(22): 7906-7917.
- Das, M., S. Subbayya Ithychanda, J. Qin and E. F. Plow (2014). "Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk." *Biochim Biophys Acta* **1838**(2): 579-588.
- David, C., P. S. McPherson, O. Mundigl and P. de Camilli (1996). "A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 331-335.
- Deschamps, C., A. Echard and F. Niedergang (2013). "[Phagocytosis and cytokinesis: highlights on common themes and differences]." *Médecine Sciences: M/S* **29**(11): 1004-1009.
- Desjardins, M. (2003). "ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions." *Nat Rev Immunol* **3**(4): 280-291.
- Di, A. (2003). "Dynamin Regulates Focal Exocytosis in Phagocytosing Macrophages." *Molecular Biology of the Cell* **14**: 2016–2028.
- Di, A., D. J. Nelson, V. Bindokas, M. E. Brown, F. Libunao and H. C. Palfrey (2003). "Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages." *Molecular Biology of the Cell* **14**(5): 2016-2028.
- Diakonova, M., G. Bokoch and J. A. Swanson (2002). "Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages." *Mol Biol Cell* **13**(2): 402-411.
- Dieckmann, R., Y. von Heyden, C. Kistler, N. Gopaldass, S. Hausherr, S. W. Crawley, E. C. Schwarz, R. P. Diensthuber, G. P. Cote, G. Tsiavaliaris and T. Soldati (2010). "A myosin II-Abp1-PakB circuit acts as a switch to regulate phagocytosis efficiency." *Mol Biol Cell* **21**(9): 1505-1518.
- Donaldson, J. G. and C. L. Jackson (2011). "ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(6): 362-375.
- Dumas, A., G. Le-Bury, F. Marie-Anais, F. Herit, J. Mazzolini, T. Guilbert, P. Bourdoncle, D. G. Russell, S. Benichou, A. Zahraoui and F. Niedergang (2015). "The HIV-1 protein Vpr impairs phagosome maturation by controlling microtubule-dependent trafficking." *J Cell Biol* **211**(2): 359-372.
- Ehrlicher, A. J., F. Nakamura, J. H. Hartwig, D. A. Weitz and T. P. Stossel (2011). "Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A." *Nature* **478**(7368): 260-263.

- Faelber, K., S. Gao, M. Held, Y. Posor, V. Haucke, F. Noe and O. Daumke (2013). "Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease." Prog Mol Biol Transl Sci **117**: 411-443.
- Faelber, K., Y. Posor, S. Gao, M. Held, Y. Roske, D. Schulze, V. Haucke, F. Noe and O. Daumke (2011). "Crystal structure of nucleotide-free dynamin." Nature **477**(7366): 556-560.
- Fairn, G. D., K. Ogata, R. J. Botelho, P. D. Stahl, R. A. Anderson, P. De Camilli, T. Meyer, S. Wodak and S. Grinstein (2009). "An electrostatic switch displaces phosphatidylinositol phosphate kinases from the membrane during phagocytosis." J Cell Biol **187**(5): 701-714.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, A. T. Brunger and R. Jahn (1998). "Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15781-15786.
- Ferguson, S. M. and P. De Camilli (2012). "Dynamin, a membrane-remodelling GTPase." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 75-88.
- Ferguson, S. M., A. Raimondi, S. Paradise, H. Shen, K. Mesaki, A. Ferguson, O. Destaing, G. Ko, J. Takasaki, O. Cremona, O. T. E and P. De Camilli (2009). "Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits." Dev Cell **17**(6): 811-822.
- Fitzer-Attas, C. J., M. Lowry, M. T. Crowley, A. J. Finn, F. Meng, A. L. DeFranco and C. A. Lowell (2000). "Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn." J Exp Med **191**(4): 669-682.
- Flanagan, L. A., J. Chou, H. Falet, R. Neujahr, J. H. Hartwig and T. P. Stossel (2001). "Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells." J Cell Biol **155**(4): 511-517.
- Flannagan, R. S., V. Jaumouillé and S. Grinstein (2012). "The Cell Biology of Phagocytosis." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **7**(1): 61-98.
- Ford, M. G., S. Jenni and J. Nunnari (2011). "The crystal structure of dynamin." Nature **477**(7366): 561-566.
- Freeman, S. A., J. Goyette, W. Furuya, E. C. Woods, C. R. Bertozzi, W. Bergmeier, B. Hinz, P. A. van der Merwe, R. Das and S. Grinstein (2016). "Integrins Form an Expanding Diffusional Barrier that Coordinates Phagocytosis." Cell **164**(1-2): 128-140.
- Freeman, S. A. and S. Grinstein (2014). "Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton." Immunol Rev **262**(1): 193-215.
- Gagnon, E., S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P. H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J. J. Bergeron and M. Desjardins (2002). "Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages." Cell **110**(1): 119-131.
- Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell **76**(2): 287-299.
- Ginsberg, M. H. (2014). "Integrin activation." BMB Rep **47**(12): 655-659.
- Gloerich, M. and J. L. Bos (2011). "Regulating Rap small G-proteins in time and space." Trends Cell Biol **21**(10): 615-623.

- Gold, E. S., N. S. Morrisette, D. M. Underhill, J. Guo, M. Bassetti and A. Aderem (2000). "Amphiphysin II $\alpha$ , a Novel Amphiphysin II Isoform, Is Required for Macrophage Phagocytosis." *Immunity* **12**(3): 285-292.
- Gold, E. S., D. M. Underhill, N. S. Morrisette, J. Guo, M. A. McNiven and A. Aderem (1999). "Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages." *J Exp Med* **190**(12): 1849-1856.
- Gomez, T. S., S. D. McCarney, E. Carrizosa, C. M. Labno, E. O. Comiskey, J. C. Nolz, P. Zhu, B. D. Freedman, M. R. Clark, D. J. Rawlings, D. D. Billadeau and J. K. Burkhardt (2006). "HS1 functions as an essential actin-regulatory adaptor protein at the immune synapse." *Immunity* **24**(6): 741-752.
- Gopaldass, N., D. Patel, R. Kratzke, R. Dieckmann, S. Hausherr, M. Hagedorn, R. Monroy, J. Krüger, E. M. Neuhaus, E. Hoffmann, K. Hille, S. A. Kuznetsov and T. Soldati (2012). "Dynamin A, Myosin IB and Abp1 couple phagosome maturation to F-actin binding." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **13**(1): 120-130.
- Grassart, A., A. T. Cheng, S. H. Hong, F. Zhang, N. Zenzer, Y. Feng, D. M. Briner, G. D. Davis, D. Malkov and D. G. Drubin (2014). "Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis." *The Journal of Cell Biology* **205**(5): 721-735.
- Grassart, A., A. Dujeancourt, P. B. Lazarow, A. Dautry-Varsat and N. Sauvonnnet (2008). "Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2." *EMBO Rep* **9**(4): 356-362.
- Grassart, A., V. Meas-Yedid, A. Dufour, J. C. Olivo-Marin, A. Dautry-Varsat and N. Sauvonnnet (2010). "Pak1 phosphorylation enhances cortactin-N-WASP interaction in clathrin-caveolin-independent endocytosis." *Traffic* **11**(8): 1079-1091.
- Gu, C., J. Chang, V. A. Shchedrina, V. A. Pham, J. H. Hartwig, W. Suphamungmee, W. Lehman, B. T. Hyman, B. J. Bacskai and S. Sever (2014). "Regulation of Dynamin Oligomerization in Cells: The Role of Dynamin-Actin Interactions and Its GTPase Activity." *Traffic* **15**(8): 819-838.
- Gu, C., S. Yaddanapudi, A. Weins, T. Osborn, J. Reiser, M. Pollak, J. Hartwig and S. Sever (2010). "Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton." *The EMBO Journal* **29**(21): 3593-3606.
- Gu, H., R. J. Botelho, M. Yu, S. Grinstein and B. G. Neel (2003). "Critical role for scaffolding adapter Gab2 in Fc gamma R-mediated phagocytosis." *J Cell Biol* **161**(6): 1151-1161.
- Gueho, A., C. Bosmani, N. Gopaldass, V. Molle, T. Soldati and F. Letourneur (2016). "Dictyostelium EHD associates with Dynamin and participates in phagosome maturation." *J Cell Sci* **129**(12): 2354-2367.
- Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert and S. Amigorena (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." *Nature* **425**(6956): 397-402.
- Gupton, S. L., K. Eisenmann, A. S. Alberts and C. M. Waterman-Storer (2007). "mDia2 regulates actin and focal adhesion dynamics and organization in the lamella for efficient epithelial cell migration." *J Cell Sci* **120**(Pt 19): 3475-3487.

- Hackam, D. J., O. D. Rotstein, C. Sjolín, A. D. Schreiber, W. S. Trimble and S. Grinstein (1998). "v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11691-11696.
- Hall, A. B., M. A. Gakidis, M. Glogauer, J. L. Wilsbacher, S. Gao, W. Swat and J. S. Brugge (2006). "Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in Fcγ<sub>3</sub> and complement-mediated phagocytosis." *Immunity* **24**(3): 305-316.
- Hamao, K., M. Morita and H. Hosoya (2009). "New function of the proline rich domain in dynamin-2 to negatively regulate its interaction with microtubules in mammalian cells." *Exp Cell Res* **315**(7): 1336-1345.
- Harburger, D. S., M. Bouaouina and D. A. Calderwood (2009). "Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects." *J Biol Chem* **284**(17): 11485-11497.
- Harrison, R. E., C. Bucci, O. V. Vieira, T. A. Schroer and S. Grinstein (2003). "Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP." *Mol Cell Biol* **23**(18): 6494-6506.
- Hatsuzawa, K., T. Tamura, H. Hashimoto, H. Hashimoto, S. Yokoya, M. Miura, H. Nagaya and I. Wada (2006). "Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis." *Mol Biol Cell* **17**(9): 3964-3977.
- Henley, J. R., E. W. Krueger, B. J. Oswald and M. A. McNiven (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae." *J Cell Biol* **141**(1): 85-99.
- Henmi, Y., K. Tanabe and K. Takei (2011). "Disruption of microtubule network rescues aberrant actin comets in dynamin2-depleted cells." *PLoS One* **6**(12): e28603.
- Henne, W. M., E. Boucrot, M. Meinecke, E. Evergren, Y. Vallis, R. Mittal and H. T. McMahon (2010). "FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis." *Science* **328**(5983): 1281-1284.
- Henry, R. M., A. D. Hoppe, N. Joshi and J. A. Swanson (2004). "The uniformity of phagosome maturation in macrophages." *J Cell Biol* **164**(2): 185-194.
- Henty-Ridilla, J. L., A. Rankova, J. A. Eskin, K. Kenny and B. L. Goode (2016). "Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends." *Science* **352**(6288): 1004-1009.
- Herre, J., A. S. Marshall, E. Caron, A. D. Edwards, D. L. Williams, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, C. Reis e Sousa, S. Gordon and G. D. Brown (2004). "Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages." *Blood* **104**(13): 4038-4045.
- Heuze, M. L., I. Lamsoul, M. Baldassarre, Y. Lad, S. Leveque, Z. Razinia, C. Moog-Lutz, D. A. Calderwood and P. G. Lutz (2008). "ASB2 targets filamins A and B to proteasomal degradation." *Blood* **112**(13): 5130-5140.
- Higgs, H. N. and T. D. Pollard (2001). "Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins." *Annu Rev Biochem* **70**: 649-676.

- Hill, T. A., A. Mariana, C. P. Gordon, L. R. Odell, M. J. Robertson, A. B. McGeachie, N. Chau, J. A. Daniel, N. N. Gorgani, P. J. Robinson and A. McCluskey (2010). "Iminochromene inhibitors of dynamins I and II GTPase activity and endocytosis." *J Med Chem* **53**(10): 4094-4102.
- Hill, T. A., L. R. Odell, A. Quan, R. Abagyan, G. Ferguson, P. J. Robinson and A. McCluskey (2004). "Long chain amines and long chain ammonium salts as novel inhibitors of dynamin GTPase activity." *Bioorg Med Chem Lett* **14**(12): 3275-3278.
- Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid (1995). "Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding." *Nature* **374**(6518): 190-192.
- Holevinsky, K. O. and D. J. Nelson (1998). "Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages." *Biophys J* **75**(5): 2577-2586.
- Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M. F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks and M. Desjardins (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." *Nature* **425**(6956): 402-406.
- Hoving, J. C., G. J. Wilson and G. D. Brown (2014). "Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity." *Cell Microbiol* **16**(2): 185-194.
- Huang, Y., C. Biswas, D. A. Klos Dehring, U. Sriram, E. K. Williamson, S. Li, F. Clarke, S. Gallucci, Y. Argon and J. K. Burkhardt (2011). "The actin regulatory protein HS1 is required for antigen uptake and presentation by dendritic cells." *J Immunol* **187**(11): 5952-5963.
- Hughes, P. E., F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil and M. H. Ginsberg (1996). "Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling." *J Biol Chem* **271**(12): 6571-6574.
- Hussain, N. K., S. Jenna, M. Glogauer, C. C. Quinn, S. Wasiak, M. Guipponi, S. E. Antonarakis, B. K. Kay, T. P. Stossel, N. Lamarche-Vane and P. S. McPherson (2001). "Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP." *Nat Cell Biol* **3**(10): 927-932.
- Huynh, K. K., E. L. Eskelinen, C. C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig and S. Grinstein (2007). "LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes." *EMBO J* **26**(2): 313-324.
- Ioan-Facsinay, A., S. J. de Kimpe, S. M. Hellwig, P. L. van Lent, F. M. Hofhuis, H. H. van Ojik, C. Sedlik, S. A. da Silveira, J. Gerber, Y. F. de Jong, R. Roozendaal, L. A. Aarden, W. B. van den Berg, T. Saito, D. Mosser, S. Amigorena, S. Izui, G. J. van Ommen, M. van Vugt, J. G. van de Winkel and J. S. Verbeek (2002). "FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection." *Immunity* **16**(3): 391-402.
- Jahn, R. and R. H. Scheller (2006). "SNAREs--engines for membrane fusion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 631-643.
- Janzen, C., G. Kochs and O. Haller (2000). "A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity." *J Virol* **74**(17): 8202-8206.
- Jaumouille, V., Y. Farkash, K. Jaqaman, R. Das, C. A. Lowell and S. Grinstein (2014). "Actin cytoskeleton reorganization by Syk regulates Fcγ receptor responsiveness by increasing its lateral mobility and clustering." *Dev Cell* **29**(5): 534-546.

- Jayachandran, R., J. Gatfield, J. Massner, I. Albrecht, B. Zanolari and J. Pieters (2008). "RNA interference in J774 macrophages reveals a role for coronin 1 in mycobacterial trafficking but not in actin-dependent processes." *Mol Biol Cell* **19**(3): 1241-1251.
- Johansson, M., N. Rocha, W. Zwart, I. Jordens, L. Janssen, C. Kuijl, V. M. Olkkonen and J. Neefjes (2007). "Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin." *J Cell Biol* **176**(4): 459-471.
- Johnson, D. S., J. K. Jaiswal and S. Simon (2012). "Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy illuminator for improved imaging of cell surface events." *Curr Protoc Cytom* **Chapter 12**: Unit 12 29.
- Johnson, S. A., C. M. Pleiman, L. Pao, J. Schneringer, K. Hippen and J. C. Cambier (1995). "Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases." *J Immunol* **155**(10): 4596-4603.
- Jongstra-Bilen, J., R. Harrison and S. Grinstein (2003). "Fcgamma-receptors induce Mac-1 (CD11b/CD18) mobilization and accumulation in the phagocytic cup for optimal phagocytosis." *J Biol Chem* **278**(46): 45720-45729.
- Kaksonen, M., Y. Sun and D. G. Drubin (2003). "A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization." *Cell* **115**(4): 475-487.
- Kaplan, G. (1977). "Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages." *Scand J Immunol* **6**(8): 797-807.
- Kessels, M. M., A. E. Engqvist-Goldstein, D. G. Drubin and B. Qualmann (2001). "Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin." *J Cell Biol* **153**(2): 351-366.
- Kheir, W. A., J. C. Gevrey, H. Yamaguchi, B. Isaac and D. Cox (2005). "A WAVE2-Abi1 complex mediates CSF-1-induced F-actin-rich membrane protrusions and migration in macrophages." *J Cell Sci* **118**(Pt 22): 5369-5379.
- Kiefer, F., J. Brumell, N. Al-Alawi, S. Latour, A. Cheng, A. Veillette, S. Grinstein and T. Pawson (1998). "The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcgamma receptor signaling in macrophages and neutrophils." *Mol Cell Biol* **18**(7): 4209-4220.
- Kiema, T., Y. Lad, P. Jiang, C. L. Oxley, M. Baldassarre, K. L. Wegener, I. D. Campbell, J. Ylanne and D. A. Calderwood (2006). "The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin." *Mol Cell* **21**(3): 337-347.
- Kim, J. G., M. Y. Moon, H. J. Kim, Y. Li, D. K. Song, J. S. Kim, J. Y. Lee, J. Kim, S. C. Kim and J. B. Park (2012). "Ras-related GTPases Rap1 and RhoA collectively induce the phagocytosis of serum-opsonized zymosan particles in macrophages." *J Biol Chem* **287**(7): 5145-5155.
- Kinchen, J. M., K. Doukometzidis, J. Almendinger, L. Stergiou, A. Tosello-Tramont, C. D. Sifri, M. O. Hengartner and K. S. Ravichandran (2008). "A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells." *Nat Cell Biol* **10**(5): 556-566.
- Kinchen, J. M. and K. S. Ravichandran (2010). "Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells." *Nature* **464**(7289): 778-782.

- Kirchhausen, T., E. Macia and H. E. Pelish (2008). "Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis." *Methods Enzymol* **438**: 77-93.
- Klein, D. E., A. Lee, D. W. Frank, M. S. Marks and M. A. Lemmon (1998). "The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding." *J Biol Chem* **273**(42): 27725-27733.
- Knezevic, I., D. Predescu, C. Bardita, M. Wang, T. Sharma, B. Keith, R. Neamu, A. B. Malik and S. Predescu (2011). "Regulation of dynamin-2 assembly-disassembly and function through the SH3A domain of intersectin-1s." *J Cell Mol Med* **15**(11): 2364-2376.
- Kobayashi, N., P. Karisola, V. Pena-Cruz, D. M. Dorfman, M. Jinushi, S. E. Umetsu, M. J. Butte, H. Nagumo, I. Chernova, B. Zhu, A. H. Sharpe, S. Ito, G. Dranoff, G. G. Kaplan, J. M. Casasnovas, D. T. Umetsu, R. H. Dekruyff and G. J. Freeman (2007). "TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells." *Immunity* **27**(6): 927-940.
- Koh, T. W., P. Verstreken and H. J. Bellen (2004). "Dap160/intersectin acts as a stabilizing scaffold required for synaptic development and vesicle endocytosis." *Neuron* **43**(2): 193-205.
- Kosaka, T. and K. Ikeda (1983). "Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*." *J Neurobiol* **14**(3): 207-225.
- Krueger, E. W., J. D. Orth, H. Cao and M. A. McNiven (2003). "A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells." *Mol Biol Cell* **14**(3): 1085-1096.
- Kuo, J. C., X. Han, C. T. Hsiao, J. R. Yates, 3rd and C. M. Waterman (2011). "Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation." *Nat Cell Biol* **13**(4): 383-393.
- Lamaze, C., T. Baba, T. E. Redelmeier and S. L. Schmid (1993). "Recruitment of epidermal growth factor and transferrin receptors into coated pits in vitro: differing biochemical requirements." *Mol Biol Cell* **4**(7): 715-727.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C. G. Lo, A. Benmerah and A. Dautry-Varsat (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway." *Mol Cell* **7**(3): 661-671.
- Lee, W. L., G. Cosio, K. Ireton and S. Grinstein (2007). "Role of CrkII in Fcγ receptor-mediated phagocytosis." *J Biol Chem* **282**(15): 11135-11143.
- Lee, W. L., D. Mason, A. D. Schreiber and S. Grinstein (2007). "Quantitative analysis of membrane remodeling at the phagocytic cup." *Mol Biol Cell* **18**(8): 2883-2892.
- Lenz, M., S. Morlot and A. Roux (2009). "Mechanical requirements for membrane fission: common facts from various examples." *FEBS Lett* **583**(23): 3839-3846.
- Levin, R., S. Grinstein and D. Schlam (2015). "Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis." *Biochim Biophys Acta* **1851**(6): 805-823.
- Lim, J., A. G. Dupuy, D. R. Critchley and E. Caron (2010). "Rap1 controls activation of the α(M)β(2) integrin in a talin-dependent manner." *J Cell Biochem* **111**(4): 999-1009.

- Lim, J., J. Thompson, R. C. May, N. A. Hotchin and E. Caron (2013). "Regulator of G-Protein Signalling-14 (RGS14) Regulates the Activation of alphaMbeta2 Integrin during Phagocytosis." *PLoS One* **8**(6): e69163.
- Lim, J., A. Wiedemann, G. Tzircotis, S. J. Monkley, D. R. Critchley and E. Caron (2007). "An essential role for talin during alpha(M)beta(2)-mediated phagocytosis." *Mol Biol Cell* **18**(3): 976-985.
- Lin, J., S. Kurilova, B. L. Scott, E. Bosworth, B. E. Iverson, E. M. Bailey and A. D. Hoppe (2016). "TIRF imaging of Fc gamma receptor microclusters dynamics and signaling on macrophages during frustrated phagocytosis." *BMC Immunol* **17**: 5.
- Liu, J., M. Das, J. Yang, S. S. Ithychanda, V. P. Yakubenko, E. F. Plow and J. Qin (2015). "Structural mechanism of integrin inactivation by filamin." *Nat Struct Mol Biol* **22**(5): 383-389.
- Liu, Y. W., S. Neumann, R. Ramachandran, S. M. Ferguson, T. J. Pucadyil and S. L. Schmid (2011). "Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(26): E234-242.
- Liu, Y. W., M. C. Surka, T. Schroeter, V. Lukiyanchuk and S. L. Schmid (2008). "Isoform and splice-variant specific functions of dynamin-2 revealed by analysis of conditional knock-out cells." *Mol Biol Cell* **19**(12): 5347-5359.
- Loovers, H. M., A. Kortholt, H. de Groote, L. Whitty, R. L. Nussbaum and P. J. van Haastert (2007). "Regulation of phagocytosis in Dictyostelium by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog Dd5P4." *Traffic* **8**(5): 618-628.
- Lorenzi, R., P. M. Brickell, D. R. Katz, C. Kinnon and A. J. Thrasher (2000). "Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis." *Blood* **95**(9): 2943-2946.
- Lundmark, R. and S. R. Carlsson (2002). "The beta-appendages of the four adaptor-protein (AP) complexes: structure and binding properties, and identification of sorting nexin 9 as an accessory protein to AP-2." *Biochem J* **362**(Pt 3): 597-607.
- Lundmark, R. and S. R. Carlsson (2003). "Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components." *J Biol Chem* **278**(47): 46772-46781.
- Lundmark, R. and S. R. Carlsson (2004). "Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9." *J Biol Chem* **279**(41): 42694-42702.
- Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner and T. Kirchhausen (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." *Dev Cell* **10**(6): 839-850.
- Majeed, M., E. Cavegion, C. A. Lowell and G. Berton (2001). "Role of Src kinases and Syk in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion." *J Leukoc Biol* **70**(5): 801-811.
- Mantegazza, A. R., J. G. Magalhaes, S. Amigorena and M. S. Marks (2013). "Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II." *Traffic* **14**(2): 135-152.

- Mao, Y. and S. C. Finnemann (2015). "Regulation of phagocytosis by Rho GTPases." Small GTPases **6**(2): 89-99.
- Maravillas-Montero, J. L. and L. Santos-Argumedo (2012). "The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells." J Leukoc Biol **91**(1): 35-46.
- Marie-Anais, F., J. Mazzolini, P. Bourdoncle and F. Niedergang (2016). "'Phagosome closure assay' to visualize phagosome formation in three dimensions using Total Internal Reflection Fluorescent Microscopy (TIRFM)." J Vis Exp.
- Marie-Anais, F., J. Mazzolini, F. Herit and F. Niedergang (2016). "Dynamin-actin cross-talk contributes to phagosome formation and closure." Traffic.
- Marion, S., J. Mazzolini, F. Herit, P. Bourdoncle, N. Kambou-Pene, S. Hailfinger, M. Sachse, J. Ruland, A. Benmerah, A. Echard, M. Thome and F. Niedergang (2012). "The NF- $\kappa$ B signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles." Developmental Cell **23**(5): 954-967.
- Marshall, J. G., J. W. Booth, V. Stambolic, T. Mak, T. Balla, A. D. Schreiber, T. Meyer and S. Grinstein (2001). "Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis." J Cell Biol **153**(7): 1369-1380.
- Martin, N. P., R. P. Mohny, S. Dunn, M. Das, E. Scappini and J. P. O'Bryan (2006). "Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling." Mol Pharmacol **70**(5): 1643-1653.
- May, R. C., E. Caron, A. Hall and L. M. Machesky (2000). "Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by Fc $\gamma$ R or CR3." Nat Cell Biol **2**(4): 246-248.
- Mazzolini, J., F. Herit, J. Bouchet, A. Benmerah, S. Benichou and F. Niedergang (2010). "Inhibition of phagocytosis in HIV-1-infected macrophages relies on Nef-dependent alteration of focal delivery of recycling compartments." Blood **115**(21): 4226-4236.
- McCluskey, A., J. A. Daniel, G. Hadzic, N. Chau, E. L. Clayton, A. Mariana, A. Whiting, N. N. Gorgani, J. Lloyd, A. Quan, L. Moshkanbaryans, S. Krishnan, S. Perera, M. Chircop, L. von Kleist, A. B. McGeachie, M. T. Howes, R. G. Parton, M. Campbell, J. A. Sakoff, X. Wang, J. Y. Sun, M. J. Robertson, F. M. Deane, T. H. Nguyen, F. A. Meunier, M. A. Cousin and P. J. Robinson (2013). "Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis." Traffic **14**(12): 1272-1289.
- McNiven, M. A., L. Kim, E. W. Krueger, J. D. Orth, H. Cao and T. W. Wong (2000). "Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape." J Cell Biol **151**(1): 187-198.
- Mears, J. A., P. Ray and J. E. Hinshaw (2007). "A corkscrew model for dynamin constriction." Structure **15**(10): 1190-1202.
- Medrano-Fernandez, I., R. Reyes, I. Olazabal, E. Rodriguez, F. Sanchez-Madrid, V. A. Boussiotis, P. A. Reche, C. Cabanas and E. M. Lafuente (2013). "RIAM (Rap1-interacting adaptor molecule) regulates complement-dependent phagocytosis." Cell Mol Life Sci **70**(13): 2395-2410.

- Meinecke, M., E. Boucrot, G. Camdere, W. C. Hon, R. Mittal and H. T. McMahon (2013). "Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission." *J Biol Chem* **288**(9): 6651-6661.
- Menon, M. and D. A. Schafer (2013). Chapter Three - Dynamin: Expanding Its Scope to the Cytoskeleton. *International Review of Cell and Molecular Biology*. K. W. Jeon, Academic Press. **302**: 187-219.
- Merrifield, C. J. (2012). "Fishing for clathrin-coated pit nucleators." *Nat Cell Biol* **14**(5): 452-454.
- Merrifield, C. J., M. E. Feldman, L. Wan and W. Almers (2002). "Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits." *Nat Cell Biol* **4**(9): 691-698.
- Merrifield, C. J., D. Perrais and D. Zenisek (2005). "Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells." *Cell* **121**(4): 593-606.
- Merrifield, C. J., B. Qualmann, M. M. Kessels and W. Almers (2004). "Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts." *Eur J Cell Biol* **83**(1): 13-18.
- Metchnikoff (1901). "L'immunité dans les maladies infectieuses." *Masson (Paris)*.
- Moon, E. Y. and S. Pyo (2007). "Lipopolysaccharide stimulates Epac1-mediated Rap1/NF-kappaB pathway in Raw 264.7 murine macrophages." *Immunol Lett* **110**(2): 121-125.
- Mooren, O. L., T. I. Kotova, A. J. Moore and D. A. Schafer (2009). "Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments." *J Biol Chem* **284**(36): 23995-24005.
- Moretti, J. and J. M. Blander (2014). "Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes." *Curr Opin Immunol* **26**: 100-110.
- Morlot, S. and A. Roux (2013). "Mechanics of Dynamin-Mediated Membrane Fission." *Annual Review of Biophysics* **42**(1): 629-649.
- Moser, M., B. Nieswandt, S. Ussar, M. Pozgajova and R. Fassler (2008). "Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation." *Nat Med* **14**(3): 325-330.
- Nakanishi, A., T. Abe, M. Watanabe, K. Takei and H. Yamada (2008). "Dynamin 2 cooperates with amphiphysin 1 in phagocytosis in sertoli cells." *Acta Medica Okayama* **62**(6): 385-391.
- Neumann, S. and S. L. Schmid (2013). "Dual role of BAR domain-containing proteins in regulating vesicle release catalyzed by the GTPase, dynamin-2." *J Biol Chem* **288**(35): 25119-25128.
- Newman, S. L., L. K. Mikus and M. A. Tucci (1991). "Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis." *J Immunol* **146**(3): 967-974.
- Niedergang, F. (2016). Phagocytosis. *Encyclopedia of Cell Biology*. R. A. B. a. P. D. S. E. i. Chief), Waltham, MA: Academic Press. **2**: 751-757.

- Niedergang, F., E. Colucci-Guyon, T. Dubois, G. Raposo and P. Chavrier (2003). "ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages." *The Journal of Cell Biology* **161**(6): 1143-1150.
- Niedergang, F., V. Di Bartolo and A. Alcover (2016). "Comparative Anatomy of Phagocytic and Immunological Synapses." *Front Immunol* **7**: 18.
- Niki, M., M. K. Nayak, H. Jin, N. Bhasin, E. F. Plow, P. P. Pandolfi, P. B. Rothman, A. K. Chauhan and S. R. Lentz (2016). "Dok-1 negatively regulates platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 outside-in signalling and inhibits thrombosis in mice." *Thromb Haemost* **115**(5): 969-978.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2008). "Fc $\gamma$  receptors as regulators of immune responses." *Nat Rev Immunol* **8**(1): 34-47.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility." *Biochem Soc Trans* **23**(3): 456-459.
- Nordmann, M., M. Cabrera, A. Perz, C. Brocker, C. Ostrowicz, S. Engelbrecht-Vandre and C. Ungermann (2010). "The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7." *Curr Biol* **20**(18): 1654-1659.
- North, R. J. (1970). "Endocytosis." *Semin Hematol* **7**(2): 161-171.
- O'Bryan, J. P. (2010). "Intersecting pathways in cell biology." *Sci Signal* **3**(152): re10.
- Obar, R. A., H. S. Shpetner and R. B. Vallee (1991). "Dynammin: a microtubule-associated GTP-binding protein." *J Cell Sci Suppl* **14**: 143-145.
- Ochoa, G. C., V. I. Slepnev, L. Neff, N. Ringstad, K. Takei, L. Daniell, W. Kim, H. Cao, M. McNiven, R. Baron and P. De Camilli (2000). "A functional link between dynammin and the actin cytoskeleton at podosomes." *J Cell Biol* **150**(2): 377-389.
- Oh, P., D. P. McIntosh and J. E. Schnitzer (1998). "Dynammin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium." *J Cell Biol* **141**(1): 101-114.
- Olazabal, I. M., E. Caron, R. C. May, K. Schilling, D. A. Knecht and L. M. Machesky (2002). "Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not Fc $\gamma$  receptor, phagocytosis." *Curr Biol* **12**(16): 1413-1418.
- Orth, J. D. and M. A. McNiven (2003). "Dynammin at the actin-membrane interface." *Current Opinion in Cell Biology* **15**(1): 31-39.
- Oser, M., H. Yamaguchi, C. C. Mader, J. J. Bravo-Cordero, M. Arias, X. Chen, V. Desmarais, J. van Rheenen, A. J. Koleske and J. Condeelis (2009). "Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation." *J Cell Biol* **186**(4): 571-587.
- Otsuka, A., T. Abe, M. Watanabe, H. Yagisawa, K. Takei and H. Yamada (2009). "Dynammin 2 is required for actin assembly in phagocytosis in Sertoli cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **378**(3): 478-482.

- Park, D., A. C. Tosello-Tramont, M. R. Elliott, M. Lu, L. B. Haney, Z. Ma, A. L. Klibanov, J. W. Mandell and K. S. Ravichandran (2007). "BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module." *Nature* **450**(7168): 430-434.
- Park, R. J., H. Shen, L. Liu, X. Liu, S. M. Ferguson and P. De Camilli (2013). "Dynamain triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamain inhibitors." *J Cell Sci* **126**(Pt 22): 5305-5312.
- Park, S. Y., M. Y. Jung, H. J. Kim, S. J. Lee, S. Y. Kim, B. H. Lee, T. H. Kwon, R. W. Park and I. S. Kim (2008). "Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor." *Cell Death Differ* **15**(1): 192-201.
- Patel, P. C. and R. E. Harrison (2008). "Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages." *Mol Biol Cell* **19**(11): 4628-4639.
- Paul, A. S. and T. D. Pollard (2009). "Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins." *Cell Motil Cytoskeleton* **66**(8): 606-617.
- Pechstein, A., O. Shupliakov and V. Haucke (2010). "Intersectin 1: a versatile actor in the synaptic vesicle cycle." *Biochem Soc Trans* **38**(Pt 1): 181-186.
- Peiser, L., P. J. Gough, T. Kodama and S. Gordon (2000). "Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro." *Infect Immun* **68**(4): 1953-1963.
- Picco, A., M. Mund, J. Ries, F. Nedelec and M. Kaksonen (2015). "Visualizing the functional architecture of the endocytic machinery." *Elife* **4**.
- Pollard, T. D. (2016). "Actin and Actin-Binding Proteins." *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Poteryaev, D., S. Datta, K. Ackema, M. Zerial and A. Spang (2010). "Identification of the switch in early-to-late endosome transition." *Cell* **141**(3): 497-508.
- Prabhudas, M., D. Bowdish, K. Drickamer, M. Febbraio, J. Herz, L. Kobzik, M. Krieger, J. Loike, T. K. Means, S. K. Moestrup, S. Post, T. Sawamura, S. Silverstein, X. Y. Wang and J. El Khoury (2014). "Standardizing scavenger receptor nomenclature." *J Immunol* **192**(5): 1997-2006.
- Praefcke, G. J. and H. T. McMahon (2004). "The dynamain superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(2): 133-147.
- Predescu, S. A., D. N. Predescu, B. K. Timblin, R. V. Stan and A. B. Malik (2003). "Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells." *Mol Biol Cell* **14**(12): 4997-5010.
- Pucadyil, T. J. and S. L. Schmid (2008). "Real-time visualization of dynamain-catalyzed membrane fission and vesicle release." *Cell* **135**(7): 1263-1275.
- Quan, A., A. B. McGeachie, D. J. Keating, E. M. van Dam, J. Rusak, N. Chau, C. S. Malladi, C. Chen, A. McCluskey, M. A. Cousin and P. J. Robinson (2007). "Myristyl trimethyl ammonium bromide and octadecyl trimethyl ammonium bromide are surface-active small molecule dynamain inhibitors that block endocytosis mediated by dynamain I or dynamain II." *Mol Pharmacol* **72**(6): 1425-1439.

- Ramachandran, R., T. J. Pucadyil, Y. W. Liu, S. Acharya, M. Leonard, V. Lukiyanchuk and S. L. Schmid (2009). "Membrane insertion of the pleckstrin homology domain variable loop 1 is critical for dynamin-catalyzed vesicle scission." *Mol Biol Cell* **20**(22): 4630-4639.
- Razinia, Z., M. Baldassarre, M. Bouaouina, I. Lamsoul, P. G. Lutz and D. A. Calderwood (2011). "The E3 ubiquitin ligase specificity subunit ASB2alpha targets filamins for proteasomal degradation by interacting with the filamin actin-binding domain." *J Cell Sci* **124**(Pt 15): 2631-2641.
- Razinia, Z., M. Baldassarre, G. Cantelli and D. A. Calderwood (2013). "ASB2alpha, an E3 ubiquitin ligase specificity subunit, regulates cell spreading and triggers proteasomal degradation of filamins by targeting the filamin calponin homology 1 domain." *J Biol Chem* **288**(44): 32093-32105.
- Reider, A., S. L. Barker, S. K. Mishra, Y. J. Im, L. Maldonado-Baez, J. H. Hurley, L. M. Traub and B. Wendland (2009). "Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation." *EMBO J* **28**(20): 3103-3116.
- Reis, C. R., P. H. Chen, S. Srinivasan, F. Aguet, M. Mettlen and S. L. Schmid (2015). "Crosstalk between Akt/GSK3beta signaling and dynamin-1 regulates clathrin-mediated endocytosis." *EMBO J* **34**(16): 2132-2146.
- Riedl, J., A. H. Crevenna, K. Kessenbrock, J. H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T. A. Holak, Z. Werb, M. Sixt and R. Wedlich-Soldner (2008). "Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin." *Nat Methods* **5**(7): 605-607.
- Ringstad, N., H. Gad, P. Low, G. Di Paolo, L. Brodin, O. Shupliakov and P. De Camilli (1999). "Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis." *Neuron* **24**(1): 143-154.
- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis and M. Zerial (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." *Cell* **122**(5): 735-749.
- Robertson, M. J., G. Hadzic, J. Ambrus, D. Y. Pome, E. Hyde, A. Whiting, A. Mariana, L. von Kleist, N. Chau, V. Haucke, P. J. Robinson and A. McCluskey (2012). "The Rhodadyns, a New Class of Small Molecule Inhibitors of Dynamin GTPase Activity." *ACS Med Chem Lett* **3**(5): 352-356.
- Robinson, R. C., K. Turbedsky, D. A. Kaiser, J. B. Marchand, H. N. Higgs, S. Choe and T. D. Pollard (2001). "Crystal structure of Arp2/3 complex." *Science* **294**(5547): 1679-1684.
- Rognoni, E., R. Ruppert and R. Fassler (2016). "The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease." *J Cell Sci* **129**(1): 17-27.
- Rognoni, L., J. Stigler, B. Pelz, J. Ylanne and M. Rief (2012). "Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(48): 19679-19684.
- Rohatgi, R., H. Y. Ho and M. W. Kirschner (2000). "Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate." *J Cell Biol* **150**(6): 1299-1310.
- Romero, S., C. Le Clairche, D. Didry, C. Egile, D. Pantaloni and M. F. Carlier (2004). "Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis." *Cell* **119**(3): 419-429.

- Roosendaal, R. and M. C. Carroll (2006). "Emerging patterns in complement-mediated pathogen recognition." *Cell* **125**(1): 29-32.
- Rottner, K. (2016). "CELL BIOLOGY. Formin' filaments at a faster CLIP." *Science* **352**(6288): 894-895.
- Rottner, K., A. Hall and J. V. Small (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." *Curr Biol* **9**(12): 640-648.
- Roux, A., G. Koster, M. Lenz, B. Sorre, J. B. Manneville, P. Nassoy and P. Bassereau (2010). "Membrane curvature controls dynamin polymerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(9): 4141-4146.
- Ryter, A. and R. Hellio (1980). "Electron-microscope study of Dictyostelium discoideum plasma membrane and its modifications during and after phagocytosis." *J Cell Sci* **41**: 75-88.
- Samie, M., X. Wang, X. Zhang, A. Goschka, X. Li, X. Cheng, E. Gregg, M. Azar, Y. Zhuo, A. G. Garrity, Q. Gao, S. Slaugenhaupt, J. Pickel, S. N. Zolov, L. S. Weisman, G. M. Lenk, S. Titus, M. Bryant-Genevier, N. Southall, M. Juan, M. Ferrer and H. Xu (2013). "A TRP channel in the lysosome regulates large particle phagocytosis via focal exocytosis." *Dev Cell* **26**(5): 511-524.
- Sauvonnet, N., A. Dujeancourt and A. Dautry-Varsat (2005). "Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor." *J Cell Biol* **168**(1): 155-163.
- Savina, A. and S. Amigorena (2007). "Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells." *Immunol Rev* **219**: 143-156.
- Schlam, D., R. D. Bagshaw, S. A. Freeman, R. F. Collins, T. Pawson, G. D. Fairn and S. Grinstein (2015). "Phosphoinositide 3-kinase enables phagocytosis of large particles by terminating actin assembly through Rac/Cdc42 GTPase-activating proteins." *Nat Commun* **6**: 8623.
- Schmid, S. L. and V. A. Frolov (2011). "Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst." *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 79-105.
- Scott, C. C., W. Dobson, R. J. Botelho, N. Coady-Osberg, P. Chavrier, D. A. Knecht, C. Heath, P. Stahl and S. Grinstein (2005). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis." *J Cell Biol* **169**(1): 139-149.
- Sever, S., A. B. Muhlberg and S. L. Schmid (1999). "Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis." *Nature* **398**(6727): 481-486.
- Shpetner, H. S., J. S. Herskovits and R. B. Vallee (1996). "A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits." *J Biol Chem* **271**(1): 13-16.
- Shpetner, H. S. and R. B. Vallee (1989). "Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules." *Cell* **59**(3): 421-432.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." *Nature* **362**(6418): 318-324.
- Steer, C. J. and R. D. Klausner (1983). "Clathrin-coated pits and coated vesicles: functional and structural studies." *Hepatology* **3**(3): 437-454.

- Stimpson, H. E., C. P. Toret, A. T. Cheng, B. S. Pauly and D. G. Drubin (2009). "Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast." Mol Biol Cell **20**(22): 4640-4651.
- Stossel, T. P., J. Condeelis, L. Cooley, J. H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher and S. S. Shapiro (2001). "Filamins as integrators of cell mechanics and signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 138-145.
- Stowell, M. H., B. Marks, P. Wigge and H. T. McMahon (1999). "Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring." Nat Cell Biol **1**(1): 27-32.
- Sundborger, A., C. Soderblom, O. Vorontsova, E. Evergren, J. E. Hinshaw and O. Shupliakov (2011). "An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling." J Cell Sci **124**(Pt 1): 133-143.
- Sundborger, Anna C., S. Fang, Jürgen A. Heymann, P. Ray, Joshua S. Chappie and Jenny E. Hinshaw (2014). "A Dynamin Mutant Defines a Superconstricted Prefission State." Cell Reports **8**(3): 734-742.
- Sundborger, A. C. and J. E. Hinshaw (2014). "Regulating dynamin dynamics during endocytosis." F1000Prime Rep **6**: 85.
- Svensson, L., K. Howarth, A. McDowall, I. Patzak, R. Evans, S. Ussar, M. Moser, A. Metin, M. Fried, I. Tomlinson and N. Hogg (2009). "Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation." Nat Med **15**(3): 306-312.
- Swanson, J. A. and A. D. Hoppe (2004). "The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis." J Leukoc Biol **76**(6): 1093-1103.
- Swanson, J. A., M. T. Johnson, K. Beningo, P. Post, M. Mooseker and N. Araki (1999). "A contractile activity that closes phagosomes in macrophages." J Cell Sci **112** ( Pt 3): 307-316.
- Swanton, E., N. Bishop, J. Sheehan, S. High and P. Woodman (2000). "Disassembly of membrane-associated NSF 20S complexes is slow relative to vesicle fusion and is Ca(2+)-independent." J Cell Sci **113** ( Pt 10): 1783-1791.
- Sweitzer, S. M. and J. E. Hinshaw (1998). "Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation." Cell **93**(6): 1021-1029.
- Takei, K., P. S. McPherson, S. L. Schmid and P. De Camilli (1995). "Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals." Nature **374**(6518): 186-190.
- Takei, K., V. I. Slepnev, V. Haucke and P. De Camilli (1999). "Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis." Nat Cell Biol **1**(1): 33-39.
- Tanabe, K. and K. Takei (2009). "Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant." J Cell Biol **185**(6): 939-948.
- Taylor, M. J., M. Lampe and C. J. Merrifield (2012). "A feedback loop between dynamin and actin recruitment during clathrin-mediated endocytosis." PLoS Biol **10**(4): e1001302.

- Tehrani, S., N. Tomasevic, S. Weed, R. Sakowicz and J. A. Cooper (2007). "Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(29): 11933-11938.
- Thomas, S., B. Ritter, D. Verbich, C. Sanson, L. Bourbonniere, R. A. McKinney and P. S. McPherson (2009). "Intersectin regulates dendritic spine development and somatodendritic endocytosis but not synaptic vesicle recycling in hippocampal neurons." *J Biol Chem* **284**(18): 12410-12419.
- Thompson, H. M., H. Cao, J. Chen, U. Euteneuer and M. A. McNiven (2004). "Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion." *Nat Cell Biol* **6**(4): 335-342.
- Thompson, H. M., A. R. Skop, U. Euteneuer, B. J. Meyer and M. A. McNiven (2002). "The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis." *Curr Biol* **12**(24): 2111-2117.
- Truong, T., H. Shams and M. R. Mofrad (2015). "Mechanisms of integrin and filamin binding and their interplay with talin during early focal adhesion formation." *Integr Biol (Camb)* **7**(10): 1285-1296.
- Tse, S. M., W. Furuya, E. Gold, A. D. Schreiber, K. Sandvig, R. D. Inman and S. Grinstein (2003). "Differential role of actin, clathrin, and dynamin in Fc gamma receptor-mediated endocytosis and phagocytosis." *J Biol Chem* **278**(5): 3331-3338.
- Tsuboi, S. and J. Meerloo (2007). "Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages." *J Biol Chem* **282**(47): 34194-34203.
- Tu, Y., S. Wu, X. Shi, K. Chen and C. Wu (2003). "Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation." *Cell* **113**(1): 37-47.
- Turk, J. L. (1991). "Metchnikoff revisited." *J R Soc Med* **84**(10): 579-580.
- Tzircotis, G., V. M. Braga and E. Caron (2011). "RhoG is required for both Fc gamma R- and CR3-mediated phagocytosis." *J Cell Sci* **124**(Pt 17): 2897-2902.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." *Annu Rev Immunol* **20**: 825-852.
- van Dam, E. M. and W. Stoorvogel (2002). "Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles." *Mol Biol Cell* **13**(1): 169-182.
- van der Blik, A. M. and E. M. Meyerowitz (1991). "Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic." *Nature* **351**(6325): 411-414.
- van der Blik, A. M., T. E. Redelmeier, H. Damke, E. J. Tisdale, E. M. Meyerowitz and S. L. Schmid (1993). "Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation." *J Cell Biol* **122**(3): 553-563.
- van der Flier, A. and A. Sonnenberg (2001). "Structural and functional aspects of filamins." *Biochim Biophys Acta* **1538**(2-3): 99-117.
- van Lookeren Campagne, M., C. Wiesmann and E. J. Brown (2007). "Macrophage complement receptors and pathogen clearance." *Cell Microbiol* **9**(9): 2095-2102.

- van Zon, J. S., G. Tzircotis, E. Caron and M. Howard (2009). "A mechanical bottleneck explains the variation in cup growth during FcγR phagocytosis." *Mol Syst Biol* **5**: 298.
- Vieira, O. V., R. J. Botelho, L. Rameh, S. M. Brachmann, T. Matsuo, H. W. Davidson, A. Schreiber, J. M. Backer, L. C. Cantley and S. Grinstein (2001). "Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation." *J Cell Biol* **155**(1): 19-25.
- Vieira, O. V., C. Bucci, R. E. Harrison, W. S. Trimble, L. Lanzetti, J. Gruenberg, A. D. Schreiber, P. D. Stahl and S. Grinstein (2003). "Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase." *Mol Cell Biol* **23**(7): 2501-2514.
- Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow and J. Qin (2002). "A structural mechanism of integrin αIIbβ3 "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face." *Cell* **110**(5): 587-597.
- Wang, W. and B. H. Luo (2010). "Structural basis of integrin transmembrane activation." *J Cell Biochem* **109**(3): 447-452.
- Warnock, D. E., J. E. Hinshaw and S. L. Schmid (1996). "Dynammin self-assembly stimulates its GTPase activity." *J Biol Chem* **271**(37): 22310-22314.
- Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki and S. Narumiya (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." *Nat Cell Biol* **1**(3): 136-143.
- Wegener, K. L., A. W. Partridge, J. Han, A. R. Pickford, R. C. Liddington, M. H. Ginsberg and I. D. Campbell (2007). "Structural basis of integrin activation by talin." *Cell* **128**(1): 171-182.
- Wiedemann, A., J. C. Patel, J. Lim, A. Tsun, Y. van Kooyk and E. Caron (2006). "Two distinct cytoplasmic regions of the β2 integrin chain regulate RhoA function during phagocytosis." *J Cell Biol* **172**(7): 1069-1079.
- Wright, S. D. and F. M. Griffin, Jr. (1985). "Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis." *J Leukoc Biol* **38**(2): 327-339.
- Xue, Z. H., C. Feng, W. L. Liu and S. M. Tan (2013). "A role of kindlin-3 in integrin αMβ2 outside-in signaling and the Syk-Vav1-Rac1/Cdc42 signaling axis." *PLoS One* **8**(2): e56911.
- Yamabhai, M., N. G. Hoffman, N. L. Hardison, P. S. McPherson, L. Castagnoli, G. Cesareni and B. K. Kay (1998). "Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains." *J Biol Chem* **273**(47): 31401-31407.
- Yan, M., R. F. Collins, S. Grinstein and W. S. Trimble (2005). "Coronin-1 function is required for phagosome formation." *Mol Biol Cell* **16**(7): 3077-3087.
- Yu, X., S. Odera, C. H. Chuang, N. Lu and Z. Zhou (2006). "C. elegans Dynammin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells." *Dev Cell* **10**(6): 743-757.
- Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, Z. Kam and B. Geiger (2003). "Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells." *J Cell Sci* **116**(Pt 22): 4605-4613.

- Zani, I. A., S. L. Stephen, N. A. Mughal, D. Russell, S. Homer-Vanniasinkam, S. B. Wheatcroft and S. Ponnambalam (2015). "Scavenger receptor structure and function in health and disease." Cells **4**(2): 178-201.
- Zhu, J., B. H. Luo, T. Xiao, C. Zhang, N. Nishida and T. A. Springer (2008). "Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces." Mol Cell **32**(6): 849-861.
- Zhu, J., K. Zhou, J. J. Hao, J. Liu, N. Smith and X. Zhan (2005). "Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits." J Cell Sci **118**(Pt 4): 807-817.
- Zigmond, S. H., M. Evangelista, C. Boone, C. Yang, A. C. Dar, F. Sicheri, J. Forkey and M. Pring (2003). "Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins." Curr Biol **13**(20): 1820-1823.
- Zigmond, S. H. and J. G. Hirsch (1972). "Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis." Exp Cell Res **73**(2): 383-393.

## ANNEXE 1

---

Au cours de ma thèse, j'ai participé aux travaux de thèse d'Audrey Dumas, portant sur la perturbation des fonctions de clairance et d'activation des macrophages infectés par le Virus de l'immunodéficiência humaine de type 1 (VIH-1) et qui a fait l'objet d'une publication dans le journal « *The journal of cell biology* » en 2015. J'ai apporté mon aide sur les nombreuses expériences de phagocytose, d'immunofluorescence et de co-immunoprécipitation qui ont été nécessaires pour révéler le rôle inattendu de la protéine virale Vpr dans la modulation du trafic intracellulaire et de la dynamique des microtubules conduisant à un trouble profond de la maturation du phagosome.

Au laboratoire, des études précédentes ont démontré que l'étape d'internalisation de la phagocytose dans des macrophages humains infectés par le VIH-1 était inhibée de 50% (Mazzolini, Herit et al. 2010). L'analyse du devenir des phagosomes, malgré tout, formés a montré une inhibition de l'activité hydrolytique et de la production d'espèces réactives oxygénée (ROS) dans les phagosomes en cours de leur maturation. L'identification de la protéine Vpr comme facteur responsable de ces troubles a été possible grâce à l'infection des macrophages primaires humains avec des virus sauvages ou mutés et l'analyse de la maturation des phagosomes caractérisée par l'acquisition du marqueur LAMP-1, la vitesse de migration des phagosomes vers la région périnucléaire. En absence de Vpr un recrutement normal de LAMP-1 sur les phagosomes est observé. De plus la vitesse de migration des phagosomes est inférieure dans les macrophages infectés avec le VIH-1 sauvage comparé à ceux infectés par le VIH- $\Delta$ Vpr. La migration des phagosomes étant dépendante des microtubules, nous avons montré que Vpr délocalise d'une part EB-1, une protéine de liaison et de stabilisation de l'extrémité positive des microtubules, et d'autre part la protéine motrice dynéine requise pour le chargement de la protéine motrice dynéine responsable de la migration rétrograde des phagosomes. Des expériences de co-immunoprécipitations et des tests de ligation de proximité visualisés par immunofluorescence (PLA, « proximity ligation assay ») ont montré l'interaction de Vpr avec EB-1 et la dynéine. Il a également été montré que le VIH détourne la machinerie de tri endosomal nécessaire à la maturation des phagosomes (Dumas, Le-Bury et al. 2015).

# The HIV-1 protein Vpr impairs phagosome maturation by controlling microtubule-dependent trafficking

Audrey Dumas,<sup>1,2,3</sup> Gabrielle Lê-Bury,<sup>1,2,3</sup> Florence Marie-Anaïs,<sup>1,2,3</sup> Floriane Herit,<sup>1,2,3</sup> Julie Mazzolini,<sup>1,2,3</sup> Thomas Guilbert,<sup>1,2,3</sup> Pierre Bourdoncle,<sup>1,2,3</sup> David G. Russell,<sup>4</sup> Serge Benichou,<sup>1,2,3</sup> Ahmed Zahraoui,<sup>1,2,3</sup> and Florence Niedergang<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1016, Institut Cochin, Paris, France

<sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique UMR 8104, Paris, France

<sup>3</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France

<sup>4</sup>Department of Microbiology and Immunology, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY 14853

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) impairs major functions of macrophages but the molecular basis for this defect remains poorly characterized. Here, we show that macrophages infected with HIV-1 were unable to respond efficiently to phagocytic triggers and to clear bacteria. The maturation of phagosomes, defined by the presence of late endocytic markers, hydrolases, and reactive oxygen species, was perturbed in HIV-1-infected macrophages. We showed that maturation arrest occurred at the level of the EHD3/MICAL-L1 endosomal sorting machinery. Unexpectedly, we found that the regulatory viral protein (Vpr) was crucial to perturb phagosome maturation. Our data reveal that Vpr interacted with EB1, p150<sup>Glued</sup>, and dynein heavy chain and was sufficient to critically alter the microtubule plus end localization of EB1 and p150<sup>Glued</sup>, hence altering the centripetal movement of phagosomes and their maturation. Thus, we identify Vpr as a modulator of the microtubule-dependent endocytic trafficking in HIV-1-infected macrophages, leading to strong alterations in phagolysosome biogenesis.

## Introduction

Macrophages play crucial functions at the interface between innate and adaptive immunity and also represent niches for intracellular pathogens. They are professional phagocytes that take up pathogens and debris through various opsonic and nonopsonic receptors (e.g., Fc receptors [FcRs] for the Fc portion of immunoglobulins; Flannagan et al., 2012; Canton et al., 2013). Interactions between these receptors and their ligands induce signaling cascades, leading to strong and transient actin polymerization, plasma membrane remodeling, and pseudopod extension around the particulate material (Flannagan et al., 2012; Deschamps et al., 2013; Niedergang, 2016). The closed compartment that forms (the phagosome) loses its actin coat, undergoes fusion and fission with compartments of the endocytic machinery (Botelho and Grinstein, 2011; Fairn and Grinstein, 2012), and eventually fuses with lysosomes. This progressive maturation into a phagolysosomal compartment is accompanied by an acidification of the compartment and its enrichment in hydrolases and reactive oxygen species, forming a degradative

compartment. The molecular machineries required for fusion and fission are thought to be the same as for endosome maturation (Fairn and Grinstein, 2012; Scott et al., 2014). Concomitantly, there is a motor-based migration on microtubules toward the cell center to reach a perinuclear localization where lysosomes are located (Blocker et al., 1998; Harrison et al., 2003).

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infects and kills T cells, which profoundly damages the host-specific immune response but also integrates into memory T cells and long-lived macrophages, establishing a chronic infection (Carter and Ehrlich, 2008; Koppensteiner et al., 2012b). Because macrophages are thought to retain viruses in an infectious form, and to potentially release them in a delayed manner and in different locations, they are proposed to be important for virus dissemination and pathogenesis. HIV-1 infection impairs the functions of macrophages both in vivo and in vitro (Kedzierska and Crowe, 2002; Collman et al., 2003), which may contribute to the development of opportunistic diseases. Impaired phagocytosis was also reported in a population of small alveolar macrophages in HIV-infected patients (Jambo et al., 2014). We previously showed that HIV-1, via the viral negative factor (Nef), a major virulence factor that is highly expressed early during virus replication

Correspondence to Florence Niedergang: [florence.niedergang@inserm.fr](mailto:florence.niedergang@inserm.fr)

J. Mazzolini's present address is Centre for Neuroregeneration, University of Edinburgh, Edinburgh EH16 4SB, Scotland, UK.

Abbreviations used in this paper: DHC, dynein heavy chain; ERK1/2, extracellular signal regulated-kinase 1/2; FcR, Fc receptor; H<sub>2</sub>DCFDA, dichlorodihydrofluorescein diacetate; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; IB, Luria-Bertani; MDM, monocyte-derived macrophage; Nef, negative factor; RBC, red blood cell; SAPK, stress-activated protein kinase; SRBC, sheep red blood cell; +TIP, plus-end tracking protein; Vpr, regulatory viral protein; WT, wild type.

© 2015 Dumas et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-NonCommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:  
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2015/10/25/jcb.201503124.DC1.html>  
Original image data can be found at:  
<http://jcb-dataviewer.rupress.org/jcb/browse/10503>

(Witkowski and Verhasselt, 2013), indeed affects phagocytosis by inhibiting the membrane remodeling events that are required for efficient phagosome formation (Mazzolini et al., 2010). Another regulatory viral protein (Vpr) is specifically incorporated into virus particles. Vpr has several described activities, including cell cycle arrest, control of the reverse transcription process, and modulation of the HIV-1 mutation rate (Planelles and Benichou, 2009; Kogan and Rappaport, 2011; Guenzel et al., 2014).

Here, we show that the late steps of phagocytosis are impaired in HIV-infected primary human macrophages, leading to an alteration in cell activation, cytokine production, and bacterial clearance. Phagosome maturation was inhibited, as the endocytic sorting elements based on EHD3/MICAL-L1 were hijacked by the viral activity. Using mutant strains of HIV-1, we demonstrate that Vpr is unexpectedly involved in the perturbation of phagosome maturation. We further show that Vpr interacts with EB1, p150<sup>Glaed</sup>, and the dynein heavy chain (DHC). During HIV infection, Vpr is crucial to perturb the localization at the plus ends of microtubules of EB1 and p150<sup>Glaed</sup>. This affects the centripetal movement of phagosomes on microtubules, and thus an efficient maturation. We identify Vpr as a major regulator of microtubule-dependent trafficking.

## Results

### Modification of activation and clearance activity in HIV-1-infected macrophages

To gain insight into the defect in phagocytic functions in HIV-infected macrophages, we aimed to dissect the signaling cascades downstream of the engagement of surface receptors. Monocytes from healthy donors were differentiated into macrophages (monocyte-derived macrophages [MDMs]) with recombinant macrophage-colony stimulating factor for 11 d and were then infected with HIV-1<sub>ADA</sub> wild type (WT) for 8 d. MDMs were incubated for various times with IgG-opsonized sheep red blood cells (SRBCs) to induce a phagocytic trigger. After various times of contact, cells were lysed and analyzed by Western blotting to detect activation of the MAPKs p38, extracellular signal regulated-kinase 1/2 (ERK1/2), and stress-activated protein kinase (SAPK)/JNK. These kinases play a role in the maturation process of the phagosomes (Moretti and Blander, 2014) and also in activation of transcription factors, such as nuclear factor- $\kappa$ B, which leads to subsequent induction of secretion of proinflammatory cytokines. We noticed that the basal phosphorylation of SAPK/JNK, ERK1/2, and p38, as well as p65/RelA, was higher in HIV-1-infected macrophages than in noninfected cells, despite the relatively low rate of infection of primary human macrophages by WT viruses (between 10% and 40%; Fig. 1, A–D). After stimulation of FcR, however, the phosphorylation of ERK1/2 was markedly reduced in HIV-1-infected macrophages compared with noninfected cells (Fig. 1, E and F). Quantification of the results indicated that there are two waves of activation of ERK1/2 in control cells with peaks at 10 and 180 min, but no increase in ERK1/2 phosphorylation in HIV-infected macrophages. This was specific to the HIV-1 viral infection, because we did not observe the same defects after other preactivation treatments (Fig. 1 G).

When we used a cytokine array to detect various cytokines and chemokines in a semiquantitative manner in the supernatant of cells 6 h after stimulation (Fig. 1 H), we also noticed reduced production of cytokines in the supernatant of

cells preinfected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT, both in resting conditions and after a phagocytic stimulus, compared with noninfected cells. Therefore, our results indicate that the HIV-1 infection of macrophages induced a basal “preactivation” of the cells that dampened the cellular response downstream of the engagement of the phagocytic receptors.

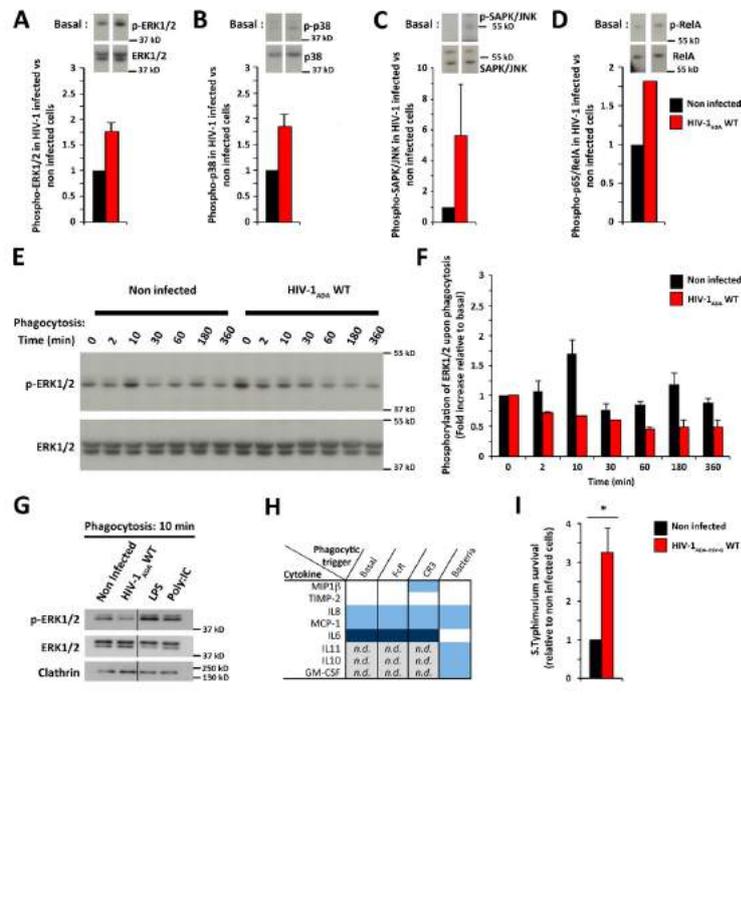
Phagocytosis eventually leads to the degradation of the ingested material. Some pathogens, such as *Salmonella typhimurium*, are invasive facultative intracellular bacteria that have evolved highly adapted gene expression programs to shape the vacuole in which they reside. We compared the intracellular survival of *S. typhimurium* in HIV-1<sub>ADA-VSV-G</sub> WT-infected versus noninfected macrophages using a gentamicin-plating assay (Fig. 1 I). A VSV-G pseudotyped virus was used to achieve higher rates of infection and the bacterial survival was assessed by counting the number of intracellular bacteria 1 and 24 h postincubation. The data are expressed as a ratio (i.e., index of survival, expressed relative to noninfected macrophages). Intracellular *S. typhimurium* survived 3.2-fold  $\pm$  0.2-fold better in HIV-infected macrophages compared with control cells. Such a defect in bacterial clearance is indicative of an altered phagosomal maturation.

### HIV infection impairs phagosome maturation

To further characterize the defective clearance activity in macrophages infected with HIV-1, we analyzed the late steps of phagosome maturation and the luminal content of phagosomes using 3- $\mu$ m beads coated with IgG to target FcRs. These beads were coupled to fluorophores sensitive to the hydrolytic activity (DQ-BSA beads) or to the oxidative burst (dichlorodihydrofluorescein diacetate [H<sub>2</sub>DCFDA]-OxyBURST beads), as well as a pH-insensitive calibration fluorophore to correct for variation in phagocytosis (Yates and Russell, 2008; Podinovskaia et al., 2013). MDMs infected with HIV-1<sub>ADA-VSV-G</sub> WT or noninfected controls were incubated for various times at 37°C with beads and then analyzed by flow cytometry focusing on the population of cells associated with beads (Fig. 2, A–D). The oxidative burst was detected as soon as 20–30 min until 3 h after contact with the beads in noninfected MDMs. In HIV-1-infected macrophages, the signal was reduced at each time point, up to 92% of the control condition (Fig. 2 C). The hydrolytic activity was detectable after 1.5 h of contact with beads in control conditions. In HIV-infected macrophages, we observed that the hydrolytic activity was reduced compared with noninfected MDMs (between 23% and 80% depending on the time; Fig. 2 D). Therefore, there is a marked decrease in the production of reactive oxygen species and hydrolytic activity in phagosomes of HIV-1-infected macrophages.

HIV<sub>ADA</sub> WT-infected macrophages were then allowed to phagocytose IgG-opsonized SRBCs for various times before fixation, permeabilization, and labeling with anti-LAMP1 (Fig. 2, E–G), a marker of late endosomes/lysosomes (Scott et al., 2014), and anti-p24 antibodies to detect HIV-1-infected cells. As shown in Fig. 2 G, although the majority of internalized SRBCs were surrounded by a relatively continuous LAMP1 staining in noninfected macrophages after 20 min or 60 min, LAMP1 staining of phagosomes in HIV-infected macrophages was often absent or was present as scattered staining around the SRBCs (Fig. 2 G, arrows), which was not scored as a positive recruitment. Accordingly, the recruitment of LAMP1, scored on internalized phagosomes only to rule out the known effect of HIV-1 infection on the efficiency of phagosome formation (Mazzolini et al., 2010), was inhibited by 24%–64%

Published October 26, 2015



**Figure 1. Activation status, signaling response to phagocytic triggers, and bacterial clearance in HIV-1-infected macrophages.** (A–D) Primary human macrophages were noninfected or infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT for 8 d. Total lysates were subjected to Western blotting with anti-phospho-ERK1/2 (A), anti-phospho-p38 (B), anti-phospho-SAPK/JNK (C), and anti-phospho-p65/RelA (D). The chemiluminescent signal was quantified and expressed as related to the noninfected condition, showing basal activation by HIV infection. (E) Macrophages infected for 8 d were incubated for different times with IgG-SRBCs at 37°C and then analyzed by Western blotting with anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2. (F) Results are expressed as a fold increase related to the basal condition for noninfected or HIV-1-infected cells. Means ± SEM of three different experiments are plotted. (G) Primary human macrophages were noninfected, infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT, or treated with lipopolysaccharide (LPS) or polyinosinic:polycytidylic acid (Poly:I:C) for 8 d. The cells were then incubated for different times with IgG-SRBCs at 37°C and then analyzed by Western blotting with anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2, or anti-clathrin as a loading control. One of three representative experiments is presented. (H) Human macrophages were infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT or mock infected for 8 d. They were incubated or not (basal) with IgG-SRBCs (FcR), with complement-SRBCs (CR3), or with invasive *S. typhimurium* for 6 h at 37°C. Supernatants were collected and analyzed on human cytokine antibody arrays. Semiquantitative analysis was performed and the results are presented as a table, with white indicating no differential expression compared with noninfected conditions, light blue indicating down-regulation, and dark blue indicating higher down-regulation. n.d., not detected in control as well as HIV-infected conditions. Three independent experiments were performed with similar results. (I) The number of intracellular *S. typhimurium* at 24 h was divided by the number of bacteria at 1 h in HIV-1-infected or noninfected macrophages and results are expressed as related to noninfected cells. The mean ± SEM of four independent experiments is presented. \*, P < 0.05.

depending on the time point analyzed (Fig. 2, E and F). The recruitment of LAMP1 on phagosomes of p24-negative cells of the same coverslips in HIV-1-infected conditions was not inhibited, indicating that there was no bystander effect in neighboring p24-negative cells (unpublished data).

Together, these results indicate that phagosome maturation, as defined by the acquisition of lysosomal markers, hydrolytic activity, and the superoxide burst, is impaired in HIV-1 WT-infected macrophages.

#### Hijacking of the MICAL-L1/EHD3 endosomal sorting machinery in HIV-infected macrophages

To better identify where phagosome maturation is arrested, we stained cells for the early endosomal marker EEA1 (Fig. 3 A). We observed that its recruitment was not modified in HIV-infected macrophages, with this marker being lost progressively after 10–20 min (Fig. 3 A). Therefore, the maturation arrest is between early and late endosomal marker acquisition. We investigated the localization of the MICAL-L1 protein and its partner the C-terminal Eps15 homology domain EHD ATPase protein 3 (EHD3), involved in control and tubulation on sorting/recycling endosomes (Fig. 3, B and C; Abou-Zeid et al., 2011; Cai et al., 2013). MICAL-L1 distribution was modified in HIV<sub>ADA</sub> WT-infected macrophages, in which more tubules were

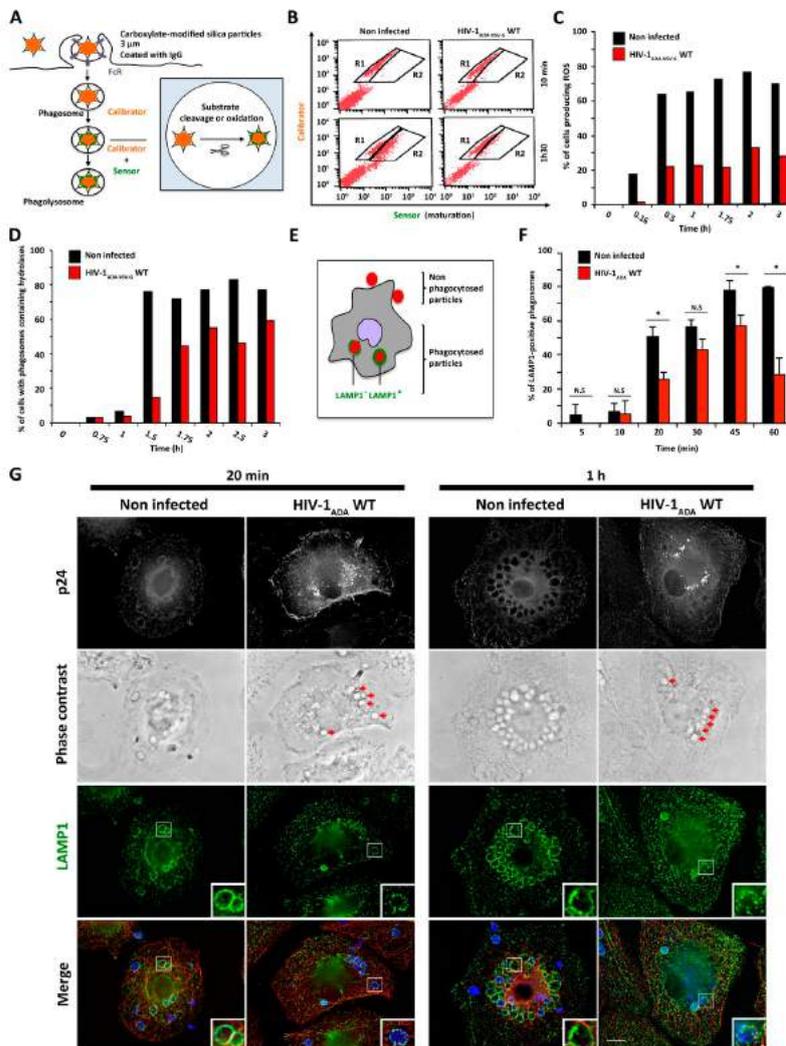
observed compared with noninfected macrophages (Fig. 3 B). Analysis of optical sections showed that EHD3 localization was also modified and that it was recruited to virus-containing compartments (Fig. 3 C). Because the functions of MICAL-L1 and EHD3 in phagosome maturation had not been reported before, we knocked down their expression in MDMs and observed a 41 ± 8% and 39 ± 7% defect, respectively, in the recruitment of LAMP1 calculated on internalized phagosomes after 1 h of phagocytosis (Fig. 3, D and E; P < 0.05).

Together, these results point to a defect in phagosome maturation at the level of sorting/recycling endosomes with hijacking of the EHD3/MICAL-L1 sorting machinery by HIV-1.

#### The perturbation of phagosome maturation in macrophages requires established infection and expression of the viral factor Vpr

To better understand how HIV perturbs the functions of macrophages, we infected the primary human macrophages with HIV-1<sub>ADA</sub> WT for various times before assessing LAMP1 recruitment as in Fig. 2. There was no significant inhibition of phagosomal maturation after 2 or 3 d (Fig. 4 A). However, we observed a marked inhibition of the recruitment of LAMP1 on the phagosomes after 6 or 8 d of HIV infection. Moreover, the inhibition of phagosomal maturation by HIV-1 was not observed when

Published October 26, 2015



**Figure 2. HIV-1 infection of macrophages inhibits phagosomal hydrolytic and oxidative activity and induces a delay in the recruitment of late endocytic markers on phagosomes.** Primary human macrophages were infected with HIV-1<sub>ADA</sub> VSV-G-WT or mock infected for 8 d before incubation with IgG-opsonized beads for various times. (A) Schematic representation of the detection of hydrolytic activity with DQ-BSA beads and oxidative activity with H<sub>2</sub>DCF-DA-OxyBURST beads. Modified substrates emit at 520 nm (sensor) and calibration fluorochrome emits at 647 nm (calibrator). (B) At different times of incubation, cells were placed on ice, resuspended with cold PBS, fixed, and analyzed by flow cytometry. The number of cells containing beads with a modified sensor fluorescence (R2) was divided by the total number of cells containing beads (positive for calibrator, y axis, R1 + R2). (C and D) Results are expressed as a percentage of cells with phagosomes containing detected oxidative (C) or hydrolytic (D) activity. One representative experiment of at least three is shown (see also Fig. S1). (E–G) Primary human macrophages were infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT or mock infected for 8 d. The cells were incubated for different times with IgG-SRBCs at 37°C. Macrophages were fixed, permeabilized, and labeled with AMCA-labeled anti-rabbit IgG to detect the total SRBCs (unpublished data), anti-p24 followed by Cy2-labeled anti-goat IgG (top line), anti-LAMP1 (third line) followed by Cy3-labeled anti-mouse IgG, and anti-tubulin followed by Cy5-labeled anti-human IgG (not depicted). Particles internalized in phagosomes are also detectable by phase contrast (second row, red arrows). Merged images (bottom line) show SRBCs in blue, LAMP1 in green, and microtubules in red. Z-stacks of wide-field fluorescent images were acquired, deconvoluted, and treated with Imajel. Bar, 10 μm; magnification in insets is 2.1× (G). The number of phagosomes positive or negative for LAMP1 was counted for at least 10 cells per condition (E and F). Results are expressed as a percentage of total internal phagosome number ± SEM (>200 phagosomes per condition, repeated in n = 3 independent experiments on different donors). \*, P < 0.05.

macrophages were treated with integrase inhibitor raltegravir, indicating that viral integration was necessary (Fig. 4 B). The capacity of macrophages to ingest IgG-opsonized particles, on the other hand, was progressively reduced with time of infection (Fig. 4 C); using *nef*-deleted HIV-1 variants, we confirmed that Nef was important for the internalization step (Fig. 4, C and F; Mazzolini et al., 2010). In contrast, Nef was not significantly involved in inhibiting recruitment of LAMP1 on the phagosomes that still did get internalized (Fig. 4 D). Most importantly, infection of macrophages with an HIV-1 strain deleted for the Vpr factor showed a recovery of the recruitment of LAMP1 on phagosomes, indicating that Vpr was essential for the virus to inhibit phagosome maturation (Fig. 4 E). Interestingly, there was no difference between HIV-<sub>YU-2</sub> WT and HIV-<sub>YU-2</sub> ΔVpr on the efficiency of the internalization step of phagocytosis (Fig. 4 G), demonstrating that, unlike Nef, Vpr is not involved in phagosome formation but is involved in phagosome maturation.

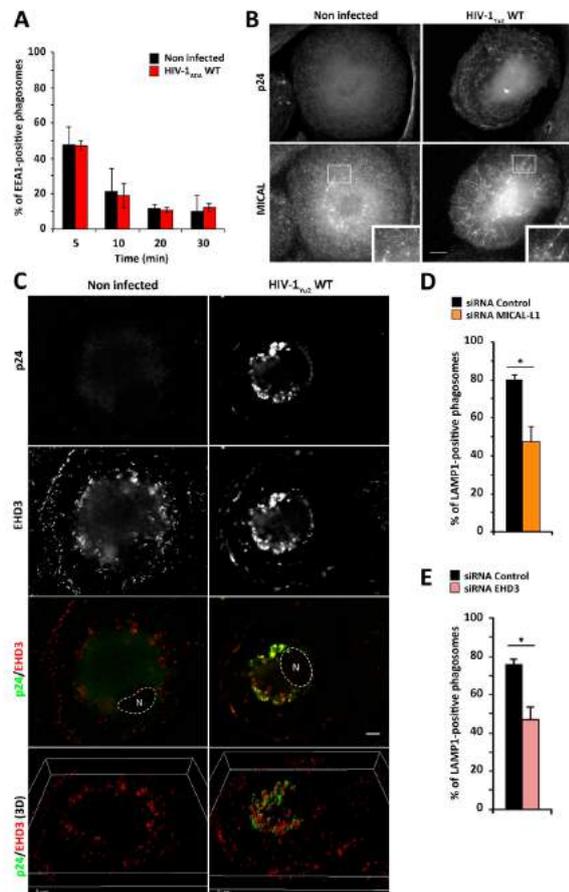
Together, these data clearly demonstrate that the impairment of phagosome maturation in human macrophages is not a consequence of the perturbation of Nef-dependent early mem-

brane remodeling events. Moreover, they reveal that the virus evolved with two factors to inhibit entry and maturation. Thus, Vpr was identified as a major regulator of phagosome maturation in HIV-infected macrophages.

#### The centripetal movement of phagosomes is slower in HIV-infected macrophages in a Vpr-dependent manner

Next, we investigated the subcellular localization of phagosomes containing IgG-opsonized SRBCs after uptake (Fig. 5, A and B). In control macrophages, ≈70% of phagosomes reached the cell center within 20 min and ≈90% after 60 min, whereas only 30% of the phagosomes were at the cell center in HIV-infected macrophages after 20 min and 44% after 60 min, with much variability. The movement of the phagosomes to the cell center was delayed in macrophages infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT, and this delay was at least partially dependent on Vpr because the phagosome distribution was not significantly different between cells infected with HIV-<sub>YU-2</sub> ΔVpr and noninfected macrophages (Fig. 5 C; P < 0.05).

Published October 26, 2015



**Figure 3. HIV-1 perturbs and hijacks the EHD3/MICAL-L1 sorting machinery.** (A) Primary human macrophages were infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT or mock infected for 8 d. The cells were incubated for different times with IgG-SRBCs at 37°C. Macrophages were treated as in Fig. 2 F except that staining was with anti-EEA1 followed by Cy3-labeled anti-mouse IgG. The number of internal phagosomes positive for EEA1 was counted. Results are expressed as a percentage of total internal phagosome number  $\pm$  SEM (>200 phagosomes per condition, repeated in  $n = 3$  independent experiments on different donors). (B) Primary human macrophages were noninfected (left) or infected with HIV-1<sub>YU-2</sub> WT (right) for 8 d. The cells were then fixed and stained with an anti-p24 antibody, followed by Alexa Fluor 488-coupled anti-goat IgG (top panels) and an anti-MICAL-L1 (B) or anti-EHD3 (C) antibody, followed by Cy3-labeled anti-rabbit IgG and Cy3-labeled anti-mouse IgG, respectively. Stacks of images were acquired and a maximum-intensity projection is shown in B. Bar, 5  $\mu$ m; magnification in insets is 2 $\times$ . (C) Stacks were deconvoluted and single optical sections are shown. 3D reconstruction was performed with Imaris. N, nucleus. Bar, 5  $\mu$ m. (D and E) Macrophages differentiated for 5 d were treated with control siRNA or siRNA against MICAL-L1 (D) or siRNA against EHD3 (E) for 72 h. They were then allowed to phagocytose IgG-opsonized SRBCs for 1 h, fixed, and stained to detect SRBCs with Alexa Fluor 647-coupled anti-rabbit IgG and LAMP1 with anti-LAMP1 followed by Cy3-labeled anti-mouse IgG (not depicted). LAMP1 acquisition was quantified as in Fig. 2. Results are expressed as a percentage of control cells. The means  $\pm$  SEM of three independent experiments (donors) are plotted. \*,  $P < 0.05$ .

To further characterize the centripetal movement of phagosomes, we followed their movement in living HIV-1-infected macrophages (Fig. 5, D and E) using a spinning disk confocal microscope and HIV-1Gag-iGFP, which generates infectious

virions in primary macrophages (Koppensteiner et al., 2012a; Gaudin et al., 2013). Phagosome movements were recorded every minute for 2 h after uptake, the internalization of particles being detected via a transition from bright phase to dark phase. The recorded velocities are of similar magnitude to the speeds already reported (Blocker et al., 1998; Harrison et al., 2003). The movements were slower in HIV-infected macrophages immediately after uptake (Fig. 5, C and D). Therefore, the peripheral location of phagosomes in HIV-infected macrophages appears as a consequence of a slowdown in the intracellular trafficking of the newly formed phagosomes.

#### Perturbed localization at microtubule plus ends of EB1 and p150<sup>Glued</sup> in HIV-infected macrophages

Because phagosome movement is a microtubule-dependent process (Blocker et al., 1998; Harrison et al., 2003), we investigated the microtubule network in HIV-1-infected macrophages (Fig. 6). Control MDMs and cells infected with HIV-1<sub>YU-2</sub> WT or HIV-1<sub>YU-2</sub>  $\Delta$ Vpr for 8 d were treated with nocodazole to depolymerize the microtubules (Fig. 6 A). After extensive washes, the cells were placed in medium without nocodazole to allow microtubule repolymerization. Although there was no striking difference between HIV-1-infected or control cells in steady-state conditions (basal), microtubule repolymerization was slower in HIV-1-infected MDMs compared with noninfected cells. The phenotype was intermediate in MDMs infected with a *vpr*-deleted HIV-1 mutant. Therefore, the infection of macrophages with HIV-1 perturbs the microtubule dynamics.

Proteins that localize to growing microtubule plus ends, collectively called plus-end tracking proteins (+TIPs), such as EB1 (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Gouveia and Akhmanova, 2010), are important to stabilize microtubules and confer local functions of the microtubule cytoskeleton. We observed a reduced localization of EB1-positive comet-shaped structures at the periphery of the cells in HIV-1-infected macrophages (Fig. 6 C), although the total amount of EB1 was unchanged (Fig. 6 D). There was no such reduction in HIV-1 $\Delta$ Vpr-infected cells (Fig. 6 D). The centripetal movement of organelles relies on the dynein/dynactin motor complex (Harrison et al., 2003) and EB1 was recently shown in vitro to recruit p150<sup>Glued</sup> to target the dynein/dynactin complex to the plus ends of microtubules (Duellberg et al., 2014). We observed that p150<sup>Glued</sup> was also mislocalized in HIV-infected macrophages (Fig. 6 E) and that the effect was partial in HIV-1 $\Delta$ Vpr-infected cells.

Collectively, our data show that HIV-1 infection affects the plus end loading of EB1 and p150<sup>Glued</sup> in a Vpr-dependent manner in primary human macrophages.

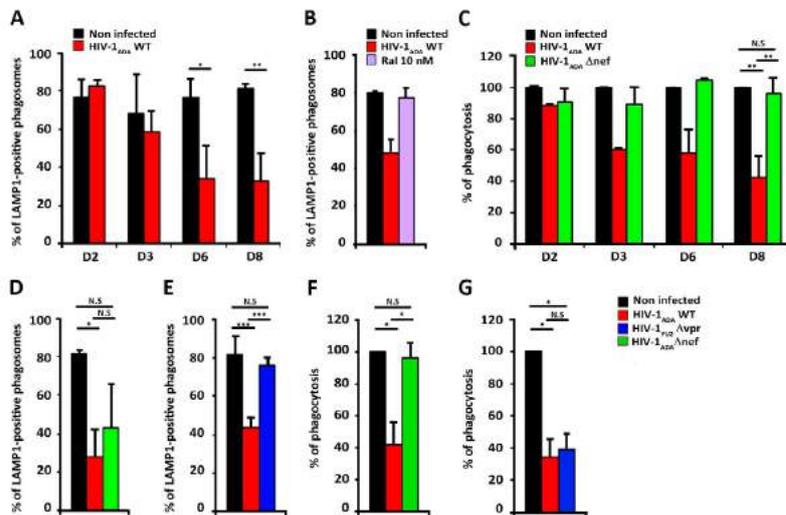
#### Vpr is sufficient to interact with and perturb the localization of EB1, p150<sup>Glued</sup>, and DHC

To analyze whether the expression of Vpr alone induces the mislocalization of +TIPs, we transiently transfected primary human macrophages to express HA-Vpr and stained them for EB1 (Fig. 7, A and B) and p150<sup>Glued</sup> (Fig. 7, C and D). Confocal sections and 3D reconstructions show that expression of Vpr led to the mislocalization of EB1 and p150<sup>Glued</sup> from the plus ends of microtubules to more perinuclear and also nuclear localization where Vpr is accumulated in these conditions.

To further confirm the interaction between Vpr and microtubule-associated proteins, we performed coimmunopre-

Downloaded from jcb.rupress.org on July 2, 2016

Published October 26, 2015



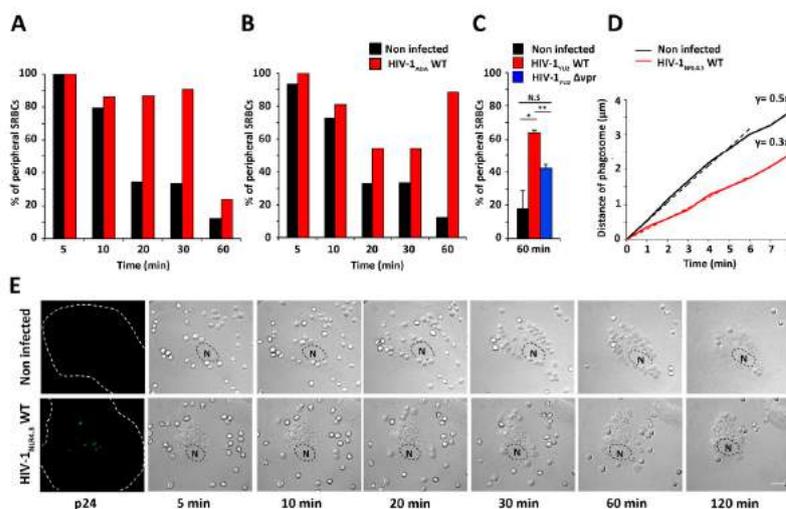
**Figure 4. Established HIV-1 infection and the viral factor Vpr are important for the phagosome maturation defect.** (A) Primary human macrophages were noninfected (black bars) or infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT (red bars) for 2, 3, 6, or 8 d. At each time point, the cells were incubated for 1 h with IgG-SRBCs at 37°C, fixed, and permeabilized. Then, they were labeled with Cy5-labeled anti-rabbit IgG to detect the total SRBCs, an anti-p24 antibody followed by Cy2-labeled anti-goat IgG to detect the infected cells, and an anti-LAMP1, followed by Cy3-labeled anti-mouse IgG. Z-stacks of fluorescence images were acquired and analyzed with ImageJ. The number of phagosomes positive for LAMP1 was calculated for >200 phagosomes per condition at each time point. Results are expressed as a percentage of total phagosomes. The means ± SEM from two independent experiments are plotted. (B) Primary human macrophages were noninfected (black bars), infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT alone (red bars), or in the presence of raltegravir (violet bars) at 10 mM for 8 d. Data were analyzed as in A. (C) Primary human macrophages were noninfected or infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT or HIV-1<sub>ADA</sub>ΔNef for

2, 3, 6, or 8 d. At each time point, the cells were incubated for 1 h with IgG-SRBCs at 37°C and fixed. External and internal SRBCs were counted and the efficiency of phagocytosis was calculated for noninfected cells (black bars), HIV-1<sub>ADA</sub> WT-infected cells (red bars), and HIV-1<sub>ADA</sub>ΔNef-infected cells (green bars). Results are expressed as a percentage of control noninfected cells. The means ± SEM of three independent experiments are plotted. (D and F) Primary human macrophages were noninfected (black bars) or infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT (red bars) or HIV-1<sub>ADA</sub>ΔVpr (green bars) for 8 d. Cells were treated and results analyzed as in A and C, respectively. The means ± SEM from five independent experiments are plotted. (E and G) Primary human macrophages were noninfected (black bars) or infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT (red bars) or HIV-1<sub>ADA</sub>ΔVpr (blue bars) for 8 d. Cells were treated and results analyzed as in A and C, respectively. The means ± SEM from five independent experiments are plotted. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ .

precipitation experiments to precipitate HA-Vpr and mass spectrometry analysis on lysates from transfected HeLa cells. We found that DHC was part of the proteins precipitated with HA-Vpr but not after control transfection with the empty HA plasmid. We confirmed this result by Western blotting (Fig. 7 E).

Next, we used the proximity ligation in situ assay (Duolink; Söderberg et al., 2006) to assess protein interaction (Fig. 7,

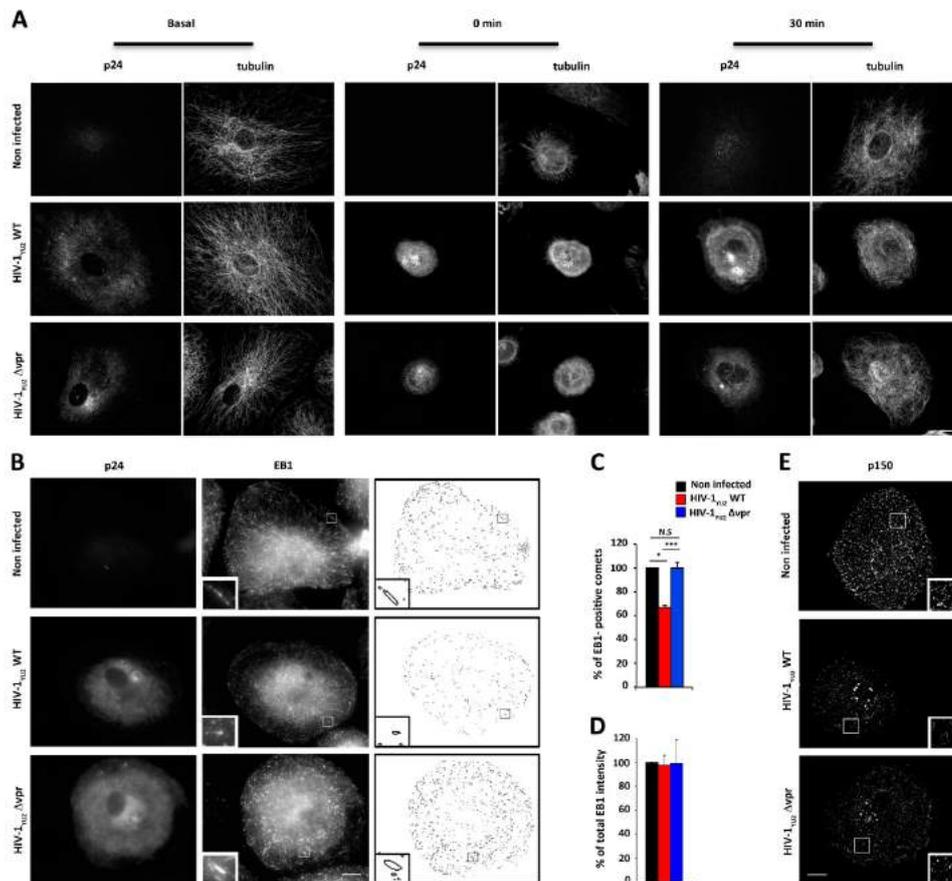
F–K). For this, we used HeLa cells with conditions to avoid massive toxic overexpression of HA-Vpr but reaching around 30% transfection efficiency. The mean number of spots detected per cell randomly analyzed on microscopy fields showed that Vpr interacted with EB1, p150<sup>Cdh1</sup>, and DHC (Fig. 7, H–K), compared with negative controls obtained by omitting one primary antibody in HA-Vpr-expressing coverslips



**Figure 5. Centripetal movement of phagosomes is inhibited in HIV-1-infected macrophages.** (A and B) Primary human macrophages were noninfected (black bars) or infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT (red bars) for 8 d. The cells were incubated for different time points with IgG-SRBCs at 37°C and then fixed and permeabilized. They were labeled and analyzed as described in Fig. 2. Peripheral SRBCs, situated at a distance to the nucleus of more than two SRBCs in diameter, were counted for at least 200 phagosomes per condition at each time point. Results are expressed as the percentage of total number of SRBCs; two independent experiments on different donors are shown. (C) Primary human macrophages were noninfected (black bars) or infected with HIV-1<sub>ADA</sub> WT (red bars) or HIV-1<sub>ADA</sub>ΔVpr (blue bars) for 8 d. Cells were incubated with IgG-SRBCs for 1 h at 37°C and then analyzed as in A. The means ± SEM of three independent experiments are plotted. (D) Primary human macrophages were infected with HIV-1Gag-iGFP for 8 d, then incubated with IgG-SRBCs at 37°C under a spinning disk confocal microscope equipped with 5% CO<sub>2</sub> and a heated chamber. Images were recorded

every minute for 120 min. The distances covered by internal phagosomes were measured for 53 phagosomes in noninfected cells and 60 phagosomes in HIV-1-infected macrophages and were plotted against time. The speed was calculated by linear regression. (E) Primary human macrophages were treated as in C. Gallery of phase contrast images of noninfected (top panels; see also Video 1) and HIV-1Gag-iGFP-infected (bottom panels; see also Video 2) cells showing phagosome movement. Bar, 10 μm. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ .

Published October 26, 2015



**Figure 6. HIV-1 and Vpr perturb the microtubule dynamics and localization of EB1 and p150<sup>Glued</sup>.** (A) Primary human macrophages were noninfected (top), infected with HIV-1<sub>YU2</sub>WT (middle), or infected with HIV-1<sub>YU2</sub>ΔVpr (bottom) for 8 d. Cells were treated or not (basal) with nocodazole at 10 μM for 1 h at 37°C. After washing, cells were fixed (time 0) or incubated at 37°C without nocodazole for the indicated times before fixation. Macrophages were then labeled with an anti-p24 antibody, followed by Cy2-labeled anti-mouse IgG and a recombinant anti-tubulin, and then followed by Cy3-labeled anti-human IgG. Images were acquired under a spinning disk microscope. One optical section for tubulin and Z projections of sections for p24 staining, from stacks of representative cells, are shown. Bar, 10 μm. (B) Primary human macrophages were noninfected (top), infected with HIV-1<sub>YU2</sub>WT (middle), or infected with HIV-1<sub>YU2</sub>ΔVpr (bottom) for 8 d. The cells were then fixed and stained with an anti-p24, followed by Cy2-labeled anti-goat IgG (left) and an anti-EB1, followed by Cy3-labeled anti-mouse IgG (middle). Stacks of images were acquired with a wide-field microscope and analyzed to define (right) and quantify (C) the comet-shaped ellipsoid objects. Bar, 5 μm; magnification in insets is 3.3×. (C and D) Macrophages were treated as in B and the number of EB1-positive comets (C; *n* > 2000 comets per condition) or the total intensity of EB1 staining (D) was calculated in 12 noninfected (black bars), 12 HIV-1<sub>YU2</sub>WT-infected (red bars), and 12 HIV-1<sub>YU2</sub>ΔVpr (blue bars) cells. Results are expressed as a percentage of control noninfected cells. The means ± SEM of three independent experiments (donors) are plotted. (E) Primary human macrophages were noninfected (top), infected with HIV-1<sub>YU2</sub>WT (middle), or infected HIV-1<sub>YU2</sub>ΔVpr (bottom) for 8 d. The cells were then fixed and stained with an anti-p24 antibody, followed by Cy2-labeled anti-goat IgG (not depicted) and an anti-p150<sup>Glued</sup>, followed by Cy3-labeled anti-mouse IgG. Stack of images were acquired, and Z projection of images is shown after TopHatFilter treatment. Bar, 10 μm; magnification in insets is 2.2×. \*, *P* < 0.05; \*\*\*, *P* < 0.0005.

(Fig. 7 F) or with the results obtained after empty HA plasmid transfection or a positive control combining the detection of α-tubulin and DHC.

In conclusion, Vpr interacted with EB1, p150<sup>Glued</sup>, and DHC and is sufficient to induce their mislocalization.

#### Vpr is sufficient to impair phagosome maturation

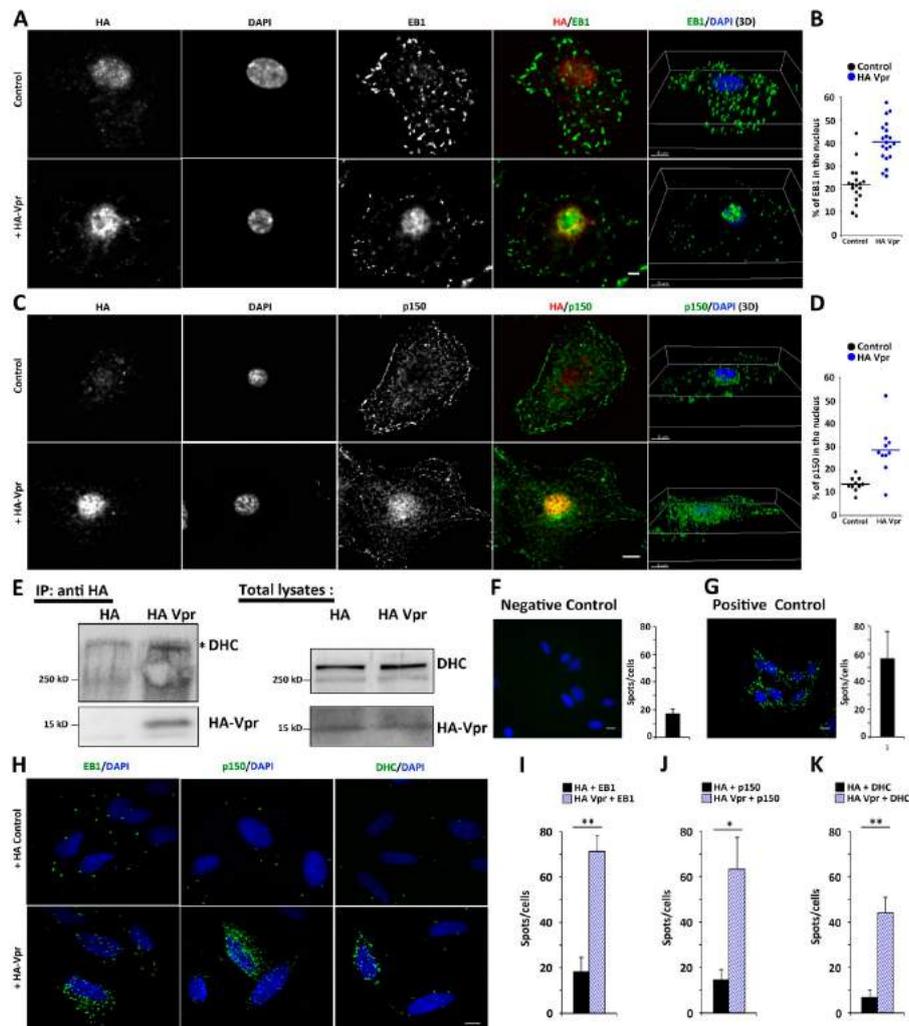
When human macrophages transiently expressing HA-Vpr were allowed to phagocytose IgG-opsonized SRBCs, we observed that Vpr led to a significant inhibition of LAMP1 recruitment on internalized phagosomes (Fig. 8, A and B), indicating that expression of Vpr alone was sufficient to alter the recruitment of

this late phagosomal marker. In addition, the depletion of EB1 induced a 38.1% ± 4.5% defect in phagosome maturation, as measured with the acquisition of LAMP1 on internalized phagosomes (Fig. 8, C and D). Together, these results show that EB1 depletion or Vpr expression was sufficient to lead to a defect in phagosome maturation.

## Discussion

In this study, we report that HIV-1-infected human macrophages show profound alterations of their functions leading to impairment of bacterial clearance. Importantly, we found that

Published October 26, 2015



**Figure 7. Vpr expression perturbs EB1 and p150<sup>Glued</sup> localization, leading to a phagosome maturation defect.** (A) MDMs were nucleofected at day 5 of differentiation to express HA-Vpr or with the HA plasmid as a control. 5 h later, they were fixed and stained with anti-HA antibodies followed by Cy3-labeled anti-rat IgG (left), DAPI (second lane), and an anti-EB1, followed by Alexa Fluor 488-coupled anti-mouse IgG (middle). Stack of images were acquired and one optical deconvoluted section is shown. Combined images and a 3D reconstitution are shown (right). Bar, 10  $\mu$ m. (B) Cells were treated as in A and the percentage of EB1 staining localized in the nucleus as detected with the DAPI staining was calculated using Icy software for HA-Vpr-expressing cells and control cells. The dot plot shows the results and means  $\pm$  SEM from 20 cells of two independent experiments (donors). (C and D) MDMs were nucleofected and treated as in A and B except that p150<sup>Glued</sup> was stained. Bar, 10  $\mu$ m. The dot plot shows the results and means  $\pm$  SEM from 10 cells of one experiment. (E) HeLa cells were transiently transfected to express HA-Vpr or with the HA plasmid as a control. Immunoprecipitation with anti-HA antibodies revealed coimmunoprecipitation of endogenous DHC detected with anti-DHC antibodies. The amounts of total proteins in lysates (1% of total lysates) are shown (right panels). Three independent experiments were performed. (F–K) HeLa cells were transiently transfected to express HA-Vpr or with the HA plasmid as a control, then fixed, and the Duolink proximity ligation in situ assay technology was used with rabbit anti-HA antibodies to detect Vpr combined with mouse mAb anti-EB1 (left panels and I) or mouse anti-p150<sup>Glued</sup> (middle panels and J), or with mouse anti-HA to detect Vpr combined with rabbit anti-DHC (right panels and K) (H). Negative control was obtained by omitting anti-HA antibody with mouse anti-p150<sup>Glued</sup> (F) and positive control was with mouse mAb anti-tubulin and rabbit anti-DHC (G). Bars, 10  $\mu$ m. The number of fluorescent spots was automatically counted using the Icy software SpotDetector function, and the mean number of spots per cell based on nuclei counting in different microscopy fields was plotted (F, G, and I–K). The means  $\pm$  SEM from three independent experiments are plotted. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ .

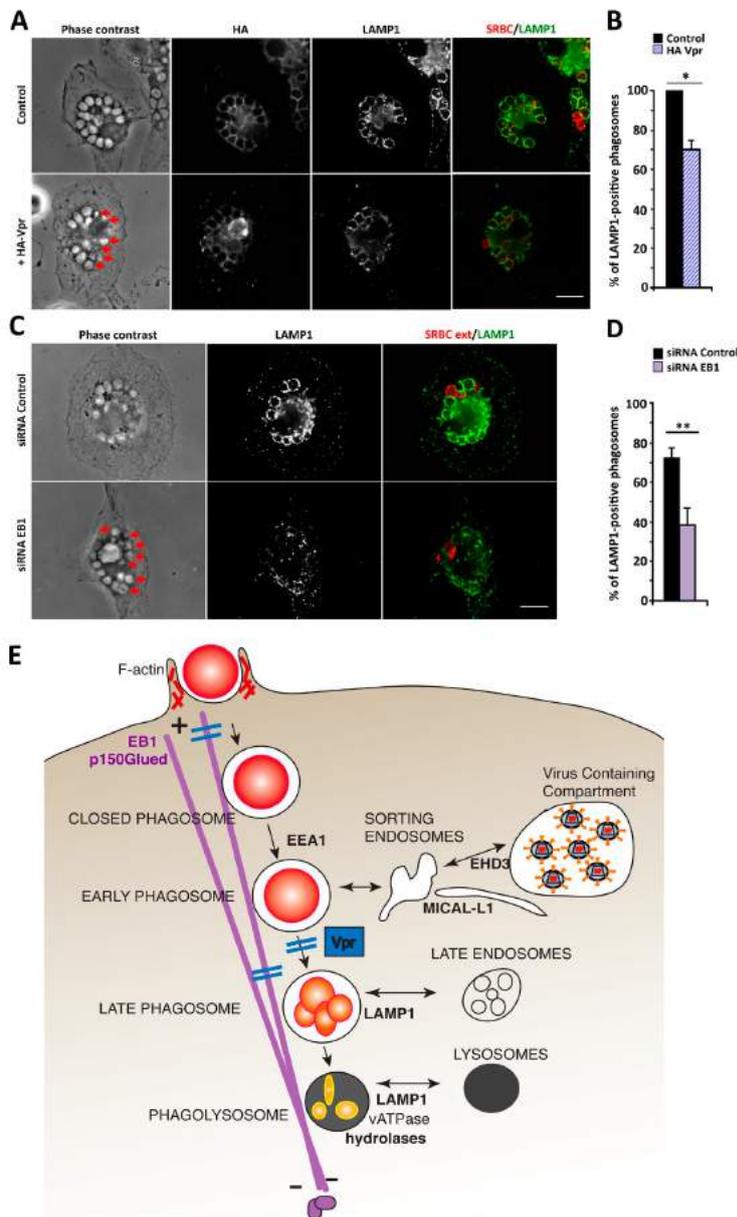
the Vpr viral factor was responsible for defects in phagosome maturation, and we showed for the first time that it affects microtubule-dependent trafficking and thus endocytic events.

We demonstrated that the maturation of phagosomes into phagolysosomes was impaired in HIV-infected macrophages. This maturation process is complex and incorporates a wide range of biological activities, including the intraphagosomal su-

peroxide burst, the degree of acidification, the extent of phagosome-lysosome fusion, and proteolytic capacity of lysosomes (Russell and Yates, 2007; Botelho and Grinstein, 2011; Fair and Grinstein, 2012; Flannagan et al., 2012). Because activation of murine bone marrow-derived macrophages was described to modify the early phagosomal degradative capacities (Yates et al., 2007), impairment of phagosomal maturation in HIV-infected

Downloaded from jcb.rupress.org on July 2, 2016

Published October 26, 2015



**Figure 8. Vpr expression or EB1 depletion leads to defective phagosome maturation.** (A) MDMs were nucleofected at day 5 of differentiation to express HA-Vpr or with the HA plasmid as a control, incubated for 60 min with IgG-SRBCs at 37°C, and then fixed and permeabilized. They were labeled and analyzed as described in Fig. 2 (E and F). Z-stacks of wide-field fluorescent images were acquired and deconvoluted and a Z projection (ImageJ) is shown. Bar, 10 μm.

(B) The number of LAMP1-positive phagosomes was counted as in Fig. 2 and expressed as a percentage of control HA-negative cells. The means ± SEM of three independent experiments are plotted ( $P < 0.05$ ). (C) MDMs differentiated for 5 d were treated with control siRNA or siRNA against EB1 for 72 h. They were then allowed to phagocytose IgG-opsonized SRBCs for 1 h, fixed, and stained to detect SRBCs with Alexa Fluor-coupled anti-rabbit IgG (not depicted, red in the merge images, right panels) and LAMP1 with anti-LAMP1 followed by Cy3-labeled anti-mouse IgG (middle panels). SRBCs are also detected with phase contrast (left panels). Z-stacks of wide-field fluorescent images were acquired and deconvoluted and a Z projection (ImageJ) is shown. Bar, 10 μm.

(D) LAMP1 acquisition was quantified as in Fig. 2. Results are expressed as a percentage of control cells. The means ± SEM of three independent experiments are plotted ( $P < 0.05$ ). (E) Model of Vpr-induced microtubule-dependent trafficking defects. Phagosome formation is partially inhibited by HIV Nef, perturbing the focal membrane remodeling. Phagosomes that do form in HIV-1-infected macrophages do not move efficiently onto the microtubules to reach the cell center and to undergo maturation. They show altered sorting events that are a consequence of the hijacking of the EHD3 and MICAL-1 components of the sorting machinery. This is caused by impaired plus end loading of p150<sup>Glued</sup> by EB1, which is mislocalized by Vpr. Vpr expression or EB1 depletion is sufficient to recapitulate these events. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ .

macrophages could be linked to the preactivated status that we observed. Activation of macrophages as well as HIV infection was previously reported to induce stabilization of the microtubule network (Patel et al., 2009; Sabo et al., 2013), but the phagosomal defect that we described seems to be specific to an established HIV-1 viral infection, because we did not observe the same defects after other treatments. Of note, the viral-containing compartment was shown to be less acidic than late endosomes in human macrophages (Jouve et al., 2007). We did not observe a massive colocalization of the viral capsid and the phagosomal content; therefore, the defect in phagosomal maturation that we describe does not seem to be related to the presence of the virus within the phagosome.

The perturbation of phagosomal maturation described here requires the establishment of a complete viral cycle. Importantly, the defects in phagosome formation (Mazzolini et al., 2010) and in phagosome maturation (this study) clearly rely on different steps of the viral cycle and different viral factors. This correlates with the temporal expression of the two proteins, because Nef is expressed abundantly early during virus replication, whereas Vpr is expressed later (Planelles and Benichou, 2009; Witkowski and Verhasselt, 2013; Guenzel et al., 2014). The effects on late events of phagosome maturation and activation are not a consequence of Nef's known ability to partially inhibit the phagosome formation in HIV-1-infected macrophages (Mazzolini et al., 2010) and to modify intracellular

Downloaded from jcb.rupress.org on July 2, 2016

trafficking and signaling (Fackler and Baur, 2002; Foster and Garcia, 2008; Witkowski and Verhasselt, 2013). Strikingly, we show that Vpr affects microtubule-dependent intracellular trafficking, and thus normal phagolysosome biogenesis. Vpr is a small basic protein conserved among human HIV-1 and HIV-2 and simian immunodeficiency virus. It regulates cell cycle progression, reverse transcription, and viral DNA nuclear import (McDonald et al., 2002; Planelles and Benichou, 2009; Kogan and Rappaport, 2011; Strebel, 2013; Guenzel et al., 2014). Therefore, our results reveal an unexpected role of Vpr in microtubule-dependent trafficking.

The initial formation of phagosomes is dependent on the actin cytoskeleton, but late intracellular trafficking of phagosomes to the cell center is mediated predominantly by microtubules (Desjardins et al., 1994; Blocker et al., 1996, 1998; Harrison et al., 2003). There are connections between the microtubule cytoskeleton and the machinery driving membrane fusion. The Rab7-interacting lysosomal protein, an effector of Rab7 and a marker of late endosomes/phagosomes, binds to the v-ATPase complex, p150<sup>Glued</sup>, and the Vps11 subunit of the homotypic fusion and protein sorting complex and is important for the biogenesis of phagolysosomes and bacterial clearance (Harrison et al., 2003, 2004; Johansson et al., 2007; van der Kant et al., 2013; De Luca et al., 2014). These machineries were recently shown to be modified in HIV-infected cells (Araúnga et al., 2015). In our study, we report modified trafficking events implicating EHD3 and MICAL-L1, which participate in sorting events by controlling tubulation at the level of recycling or late endosomes (Abou-Zeid et al., 2011; Naslavsky and Caplan, 2011; Cai et al., 2013). We show for the first time that MICAL-L1 is required for efficient phagosomal maturation. Unexpectedly, EHD3 was enriched on the viral compartment. This sequestration could impair its function in endocytic/phagocytic trafficking and contribute to the defect in phagosomal maturation in HIV-1-infected macrophages.

Live cell imaging of HIV-infected macrophages revealed that the movement of phagosomes was slower after formation of the closed internalized compartment. Treating the cells with low doses of nocodazole or taxol, which are known now to displace the +TIPs such as EB1 (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Gouveia and Akhmanova, 2010), slowed down the perinuclear accumulation of phagosomes approximately twofold (Blocker et al., 1998). Interestingly in neurons and filamentous fungi, it has been shown that microtubule plus end tracking of dynein is critical for correct initiation of retrograde cargo transport (Zhang et al., 2010; Moughamian and Holzbaur, 2012). More recently, an elegant in vitro reconstitution system determined that EB1 recruits p150<sup>Glued</sup> to target the dynein/dynactin complex to the plus ends of microtubules (Duellberg et al., 2014). In our study, ectopic expression of Vpr confirmed that this viral factor is sufficient to induce a defect in the initial EB1 loading of dynein motors on the plus ends of microtubules that is necessary for phagosome maturation. The differential location of phagosomes in infected macrophages will then affect the efficiency of fusion with other endosomal and lysosomal compartments, delaying the acquisition of hydrolytic activities.

Our data argue for a model (Fig. 8 E) in which the phagosomes formed in HIV-1-infected macrophages do not move efficiently onto the microtubules to reach the cell center because of impaired plus end loading of p150<sup>Glued</sup> by EB1, which is mislocalized by Vpr. They show altered sorting events and the hijacking of the EHD3 and MICAL-L1 components of the sort-

ing machinery. Altogether, these results provide a mechanistic understanding of the defects in bacterial killing and clearance that contribute to the establishment of opportunistic infections in HIV-infected patients.

## Materials and methods

### Antibodies and reagents

The following primary antibodies were used: purified rabbit anti-SRBCs (IGN Biochemicals), rabbit anti-p65/RelA (sc-372; Santa Cruz Biotechnology), rabbit monoclonal anti-phospho-p65 (Ser536, 3033; Cell Signaling Technology), mAb anti-tubulin (clone DM1A; Sigma-Aldrich), mAb anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) and anti-p44/42 MAPK (9106 and 9102, respectively; Cell Signaling Technology), rabbit monoclonal anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) and anti-SAPK/JNK (4668 and 9258, respectively; Cell Signaling Technology), rabbit monoclonal anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) and rabbit anti-p38 (9215 and 9212, respectively, Cell Signaling Technology), mouse mAb anti-EHD3 (clone 4B7; Abnova Corporation), mouse monoclonal anti-LAMP1 (555798; BD Biosciences), mouse monoclonal anti-EEA1 (610456; BD Biosciences), mouse monoclonal anti-EB1 (610535; BD Biosciences; or sc-47704; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-p150<sup>Glued</sup> (610473; BD Biosciences), mouse monoclonal anti-clathrin HC (610500; BD Biosciences), goat anti-p24 HIV-1 (4999-9007; AbD Serotec), mouse monoclonal anti-p24 HIV-1 (Kal-1; AbD Serotec), rabbit polyclonal anti-HA (H6908; Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-HA (MMS-101P; BioLegend), rabbit polyclonal anti-DHC (sc-9115; Santa Cruz Biotechnology), and the recombinant human Fc anti-tubulin (clone F2C was obtained from the Antibody and Recombinant Proteins Facility, Institut Curie; Moutel et al., 2009). Rabbit polyclonal anti-MICAL-L1 was described in Abou-Zeid et al. (2011). In brief, the GST-MICAL-L1-RBD was generated by inserting a BamHI-XhoI fragment into the corresponding sites of a pGEX-4T expression vector and expressed in *Escherichia coli*. Purified GST-MICAL-L1-RBD was injected into rabbits to generate polyclonal antibodies (Covablab). The resulting antiserum was affinity purified against a His-RBD-Sepharose column.

Secondary antibodies were as follows: AMCA-, Cy2-, and Cy3-labeled F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG; Cy5-labeled F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG; AMCA- and Cy5-labeled F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG; Cy5-labeled F(ab')<sub>2</sub> anti-rat IgG and Cy2-labeled F(ab')<sub>2</sub> anti-goat IgG; and HRP-labeled anti-mouse and anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch). Alexa Fluor 350/633-coupled phalloidins were obtained from Molecular Probes (Invitrogen).

siRNA sequences were as follows: 5'-GUCCCAGUAUUAC AACCACUU-3' (MICAL-L1 1) and 5'-GUGGAGCCUAGAGUGGAA CAA-3' (MICAL-L1 2; Abou-Zeid et al., 2011) to target MICAL-L1, and 5'-GCUGCGUGCCGGGGCGAGCG-3' to target EHD3 (Naslavsky et al., 2009). The control siRNA-targeting GFP was 5'-GAACGGCA UCAAGGUGAAC-3'.

The pcDNA3-HA plasmid was used as the control (from C. Lamaze, Institut Curie, Paris, France). The VprLai gene was subcloned into a pAS1B plasmid using the BamHI-XhoI sites. This vector contains an initiation codon, followed by the nucleotide sequence encoding the nine-amino acid epitope tag from the influenza virus HA and thus allows expression, driven by the cytomegalovirus promoter, of Vpr molecules fused at their N termini to HA (HA-tagged Vpr; Selig et al., 1999).

Carboxylated 3- $\mu$ m silica H<sub>2</sub>DCFDA-OxyBURST and DQ-BSA beads were as described (Podinovskaia et al., 2013). Nocodazole and lipopolysaccharide were from Sigma-Aldrich. Raltegravir was a

Published October 26, 2015

kind gift from Gianfranco Pancino (Institut Pasteur, Paris, France), polyinosinic:polycytidylic acid was purchased from Invivogen.

#### Cell culture and transfection

Human primary macrophages were isolated from blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang Ile-de-France, Site Saint Vincent de Paul, Trinité, or Saint-Antoine) by density gradient sedimentation in Ficoll (GE Healthcare), followed by adhesion on plastic at 37°C for 2 h and culture in the presence of complete culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 100 µg/ml streptomycin/penicillin, and 2 mM L-glutamine [Invitrogen/Gibco] containing 10 ng/ml recombinant macrophage-colony stimulating factor [R&D Systems]; Mazzolini et al., 2010). Treatment with siRNA was obtained after 72 h with Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen; Marion et al., 2012). Transient nucleofection of 5-d differentiated monocytes ( $5 \times 10^5$  cells/cuvette) with expression plasmids was performed using Amaxa with Ingenio solution (Mirus Bio LLC; Jacquot et al., 2007; Mazzolini et al., 2010). HeLa cells were cultured in DMEM containing 25 mM D-glucose, GlutaMAX, and 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies) supplemented with 10% FCS (Eurobio). They were transiently transfected using 10 µl Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) and 20 µg plasmid for a 100-mm subconfluent dish (Falcon).

#### Viral production and infection

Proviral infectious clones of the macrophage-tropic virus isolate ADA (HIV-1<sub>ADA</sub> WT), and the same clone disrupted for the Nef ORF (HIV-1<sub>ADA</sub> ΔNef) were kindly provided by Luciana da Costa (Federal University; Mazzolini et al., 2010). Proviral infectious clones of the macrophage-tropic virus isolate YU-2 (HIV-1<sub>YU2</sub> WT) were from the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program. The same clone disrupted for the Vpr gene HIV-1<sub>YU2</sub> ΔVpr was generated by PCR to insert two stop codons within the vpr gene without altering the vif gene, using the following set of primers: forward 5'-GATAGATG GAATAAGCCCCAGAAGACTAAGGGCCACAGAGG-3', and reverse 5'-CCTCTGTGGCCCTTAGTCTTCTGGGGCTTATTCATCTATC-3' (Jacquot et al., 2007). The NLR 4.3 HIV-1Gag-iGFP carrying an R5-tropic envelope with the V3-loop V92th014.12 was a gift from M. Schindler (Helmholtz Zentrum Munich and Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Munich, Germany; Koppensteiner et al., 2012a). Stocks of viruses were obtained by transfection of human embryonic kidney 293 T cells (CRL-1573,  $2 \times 10^6$ ; ATCC) with 6 µg of the corresponding proviral DNA, using FuGENE 6 Transfection Reagent as recommended by the manufacturer (Promega). VSV-G pseudotyped virus (HIV-1<sub>ADA-VSV-G</sub> WT) was generated by transfection of human embryonic kidney 293 T cells with 1.5 µg VSV-G vector (pMD.G) along with 4.5 µg HIV-1 proviral DNA (HIV-1<sub>ADA</sub> WT). Supernatants of the transfected cells were collected after 48 h, filtered, stored at -80°C, and quantified for the HIV-1 Cap24 antigen by ELISA (Innotests HIV Antigen mAb [Innogenetics] and Alliance HIV-1 ELISA kit [PerkinElmer]). Viral titers were assessed by infection of the indicator cells HeLa TZM-bl (bearing the β-galactosidase gene under the control of HIV-1 LTR; National Institutes of Health Reagent Program) with serial dilutions of the stocks, followed by a β-galactosidase coloration of the cells and counting of blue cells.

Monocytes differentiated into macrophages for 11 d were seeded in six-well plates at a density of  $5 \times 10^5$  to  $1 \times 10^6$  cells/well and cultivated in complete culture medium. For the microscopy experiments, the cells were detached after 10 d of differentiation and placed on coverslips at  $2 \times 10^5$  cells/well. At 11 d of differentiation, HIV-1 viruses (MOI 0.03) were added. Viruses were washed after 1 or 2 d, for HIV-1 VSV-G pseudotyped or WT, respectively, and cells were kept for 8 d or the indicated times before functional assays.

#### Phagocytosis assay and phagosome measurements

Phagocytosis assays mediated by Fc or CR3 receptors were performed with adherent cells plated on glass coverslips (Braun et al., 2004). For microscopy, red blood cells (RBCs) were washed in PBS and incubated with anti-RBC antibodies for 30 min at RT, then washed and resuspended in serum-free medium. After internalization of the IgG-RBCs for the indicated times, cells were fixed in 4% PFA (Sigma-Aldrich)/4% sucrose for 45 min at 4°C and external RBCs were labeled for 10 min with labeled F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse or anti-rabbit IgG in PBS/1% BSA. Cells were then permeabilized with 0.05% saponin before labeling of the intracellular RBCs with AMCA-labeled F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG and/or other primary antibodies in PBS/0.05% saponin/1% BSA. Fixation was different to detect microtubule-associated proteins: cells were fixed for 10 min in ethanol at -20°C, then in 4% paraformaldehyde for 15 min at RT and permeabilized in 0.15% Triton X-100/PBS. Fixation to detect MICAL-L1 and EHD3 was at 4% paraformaldehyde, followed by permeabilization in 0.15% Triton X-100/PBS. Mounting medium was Fluoromont-G (eBioscience).

To quantify phagocytosis, the number of internalized RBCs per cell was counted in 10–50 cells randomly chosen on the coverslips (>200 phagosomes, identified by combination of phase-contrast and fluorescent images), corresponding to the phagocytic index. The index obtained was divided by the index obtained for control cells and was expressed as a percentage of control cells. To quantify the recruitment of LAMP1 on the internalized phagosomes, images were acquired and the presence of the marker on internalized phagosomes was analyzed on a yes/no basis (>200 phagosomes per condition). The number of LAMP1-positive phagosomes was divided by the number of total internal phagosomes per condition and expressed as percentage. A minimum of three independent experiments (i.e., on different donors) was performed.

Image acquisition was performed on an inverted wide-field microscope (DMI6000; Leica) with a 100× (1.4 NA) objective and a MicroMAX camera (Princeton Instruments) or ORCA Flash4.0 (Hamamatsu). Z-series of images were taken at 0.2-µm increments and deconvolution was performed with Huygens software (Scientific Volume Imaging) when indicated. Analyses were performed using custom-made ImageJ (National Institutes of Health) routines or Icy software. 3D reconstructions were obtained using the IsoSurface function in Imaris 5.7 software.

To quantify the number of comet-shaped structures in EB1-labeled macrophages, Z projection of maximum intensities of the images, TopHatFilter, and a fixed threshold were used to segment and calculate the circularity of all objects. Ellipsoid objects (circularity <0.5), corresponding to comets, were then counted. To quantify localization of EB1 and p150<sup>Glued</sup> within the cell volume, we used the Icy software ROI Statistics tool.

#### Depolymerization/repolymerization of microtubules

After 8 d of infection, macrophages were incubated in complete culture medium with or without nocodazole (10 µM) for 1 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After washing with cold complete culture medium, cells were placed at 37°C for various times before fixation with 100% ethanol at -20°C for 10 min and 4% PFA at room temperature for 15 min. Cells were then permeabilized with 0.15% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) at 4°C for 2 min before labeling with antibodies and image analysis as described in the previous paragraph.

#### Phagosomal bead assay and flow cytometry analysis

H<sub>2</sub>DCFDA-OxyBURST beads were coupled to H<sub>2</sub>DCFDA and Alexa Fluor 633-SE (Molecular Probes). The oxidized substrate emitted a fluorescent signal at 520 nm when excited at 490 nm, and Alexa Fluor 633

Downloaded from jcb.rupress.org on July 2, 2016

Published October 26, 2015

emitted at 647 nm when excited at 633 nm. DQ-BSA beads were coupled to DQ green BSA and calibrated to Alexa Fluor 633-SE. The hydrolyzed substrate emitted at 520 nm when excited at 490 nm (Podinovskaia et al., 2013). Beads were extensively washed and incubated with HIV-1- or mock-infected macrophages in six-well plates in serum-free medium at 37°C. At each time point, cells were detached and washed twice before fixation with 4% PFA for 45 min at 4°C. PFA was neutralized with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mM in PBS). Cells were washed with PBS and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur or Accuri C6; BD Biosciences). The emission at 520 nm (substrate) and 650 nm (calibrator) was recorded after excitation at 488 and 635 nm, respectively. Analysis was performed using CellQuest Pro software (BD Biosciences). The number of cells containing substrate-positive beads was divided by the total number of cells containing beads and the results were expressed as a percentage.

#### Bacterial growth and plating assay

*S. typhimurium* (ATCC14028 or 4/74; Niedergang et al., 2000; Kröger et al., 2013, respectively) were grown overnight at 37°C with shaking in Luria-Bertani (LB) broth and then subcultured without shaking for 4–5 h in LB containing 300 mM NaCl (*S. typhimurium*). The absorbance at 600 nm of the bacterial suspensions was used to determine the MOI, by estimating that  $10^9$  bacteria/ml give an  $A_{600}$  of 1. The inoculum dose was then calculated by plating serial dilutions onto LB agar plates. MDMs were infected at a MOI of 50 in six-well plates. After a 30-min incubation at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ , the cells were washed two times with sterile PBS, washed once with complete RPMI medium supplemented with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin, and then incubated in the latter medium for the indicated times. At each time point, cells were washed twice with PBS and lysed with 0.5% Triton X-100 in PBS. The number of viable bacteria present at each time point was determined by plating serial dilutions on LB agar plates.

#### Immunoprecipitation and Western blots

Cells were lysed for 15 min at 4°C in lysis buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 50 mM NaF, and 1 mM sodium orthovanadate, supplemented with complete protease inhibitor cocktail; Roche Diagnostic). Lysates were centrifuged at 10,000 *g* for 10 min at 4°C. The postnuclear supernatants were kept and an equal amount of proteins (BCA dosage kit; Pierce) was analyzed by SDS-PAGE. Immunoprecipitation was performed with HeLa cell lysates incubated with 4  $\mu\text{g}$  rabbit anti-HA antibody for 1 h, followed by a 3-h incubation with Protein G beads. Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) and incubated in blocking solution PBS/0.1% Tween-20 supplemented with 5% milk for 2 h. Blots were rinsed with PBS/0.1% Tween-20 and antibodies were incubated in the blocking solution. Detection was performed using ECL substrate (GE Healthcare). For mass spectrometry analysis, digestion was performed on beads and samples were desalted (ZipTip C18) and then analyzed with a nanoESI-Orbitrap on the LTQ-Orbitrap Fusion with nano-LC Proxeon 1000 (Thermo Fisher Scientific; Mass Spectrometry Facility, Institut Jacques Monod, Paris, France).

#### Cytokine arrays

Supernatants of primary macrophages were collected after 6 h of stimulation and were incubated with membranes containing primary antibody against different cytokines as indicated by the manufacturer (RayBio Human Cytokines Antibody Array kit; Cliniscience). The ECL signal was quantified and the semiquantitative results were summarized in a table in Fig. 1 H.

#### Live cell imaging of phagocytosis in HIV-1-infected primary macrophages

To follow phagocytosis on HIV-1 GFP-infected or noninfected cells, images were recorded every min for 2 h on a spinning disk confocal

(CSU-X1M1; Yokogawa) inverted microscope (DMI6000; Leica) equipped with a CoolSnap HQ<sup>2</sup> camera (Photometrics) and a heated chamber and  $\text{CO}_2$  in the BSL3 laboratory. HIV-1-GFP and SRBCs were visualized by fluorescence and phase contrast with a 100 $\times$ , 1.4 NA, PH differential interference contrast objective. Acquisition was performed with MetaMorph 7.5.5 software (Molecular Devices). The movies were analyzed using ImageJ with the Manual Tracking Plugin (F. Cordelières, Institut Curie, Orsay, France). Distances relative to the nucleus (visible on phase contrast images) were calculated in micrometers and the traveled distances were calculated and plotted against time. The slopes were calculated with linear regression.

#### Proximity ligation in situ assay (Duolink)

The Duolink proximity ligation in situ assay (Söderberg et al., 2006) was used according to the manufacturer's instructions. Anti-HA rabbit polyclonal Ab was combined with anti-EB1 mouse mAb or anti-p150<sup>Glued</sup> mouse mAb and anti-HA mouse monoclonal Ab was combined with anti-DHC rabbit mAb. The positive control was obtained using a combination of anti- $\alpha$ -tubulin mouse mAb and anti-DHC rabbit mAb. Negative controls were performed by omitting anti-HA rabbit antibodies. Fluorescent spots generated were automatically counted and the mean number of spots per cell was calculated from nuclei counting using the Icy software SpotDetector function.

#### Statistical analyses

The statistical significance of the data was tested with an unpaired Student's *t* test. Differences were considered significant if the *p*-value was <0.05 and 0.005.

#### Online supplemental material

Fig. S1 (related to Fig. 2) shows detection of hydrolytic and oxidative activity in macrophages infected or not with HIV-1. Fig. S2 (related to Fig. 3) shows the depletion of MICAL-L1 and EHD3 in human MDMs upon treatment with siRNA. Video 1 shows the internalization of IgG-opsonized RBCs in noninfected human MDMs. Video 2 shows the internalization of IgG-opsonized RBCs in HIV-infected human MDMs. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201503124/DC1>. Additional data are available in the JCB DataViewer at <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201503124.dv>.

#### Acknowledgments

We thank Marie N'Guyen for help with the Imagestream technology, the Mass Spectrometry Facility at Institut Jacques Monod, Clarisse Berlioz-Torrent for help with viral production, Chantal Deschamps and Melita Gordon for discussions, and Jamil Jubrail for reading the manuscript.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris Descartes, Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites (ANRS; AO2010-1 and AO2012-2 to S. Benichou and F. Niedergang), Agence Nationale de la Recherche (2011 BSV3 025 02), and Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20130326518 to F. Niedergang). D.G. Russell acknowledges support from the National Institutes of Health (award HL100928). J. Mazzolini was supported by a doctoral fellowship from ANRS. A. Dumas was supported by doctoral fellowships from Université Paris Descartes and Sidaction.

The authors declare no competing financial interests.

Downloaded from jcb.rupress.org on July 2, 2016

Submitted: 26 March 2015  
Accepted: 18 September 2015

## References

- Abou-Zeid, N., R. Pandjaitan, L. Sengmanivong, V. David, G. Le Pavec, J. Salameo, and A. Zahraoui. 2011. MICAL-like1 mediates epidermal growth factor receptor endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 22:3431–3441. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-01-0030>
- Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2010. Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* 123:3415–3419. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.062414>
- Arañga, M., D. Guo, J. Wiederin, P. Ciborowski, J. McMillan, and H.E. Gendelman. 2015. Opposing regulation of endolysosomal pathways by long-acting nanoformulated antiretroviral therapy and HIV-1 in human macrophages. *Retrovirology*. 12:5. <http://dx.doi.org/10.1186/s12977-014-0133-5>
- Blocker, A., F.F. Severin, A. Habermann, A.A. Hyman, G. Griffiths, and J.K. Burkhardt. 1996. Microtubule-associated protein-dependent binding of phagosomes to microtubules. *J. Biol. Chem.* 271:3803–3811. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.7.3803>
- Blocker, A., G. Griffiths, J.C. Olivo, A.A. Hyman, and F.F. Severin. 1998. A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *J. Cell Sci.* 111:303–312.
- Botelho, R.J., and S. Grinstein. 2011. Phagocytosis. *Curr. Biol.* 21:R533–R538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.053>
- Braun, V., V. Fraissier, G. Raposo, I. Hurbain, J.B. Sibarita, P. Chavrier, T. Galli, and F. Niedergang. 2004. TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J.* 23:4166–4176. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600427>
- Cai, B., S.S. Giridharan, J. Zhang, S. Saxena, K. Bahl, J.A. Schmidt, P.L. Sorgen, W. Guo, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2013. Differential roles of C-terminal Eps15 homology domain proteins as vesicular and tubular roles of recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* 288:30172–30180. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.488627>
- Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein. 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13:621–634. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3515>
- Carter, C.A., and L.S. Ehrlich. 2008. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 62:425–443. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162758>
- Collman, R.G., C.F. Perno, S.M. Crowe, M. Stevenson, and L.J. Montaner. 2003. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J. Leukoc. Biol.* 74:631–634. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0703357>
- De Luca, M., L. Cogli, C. Progidia, V. Nisi, R. Pascolutti, S. Sigismund, P.P. Di Fiore, and C. Bucci. 2014. RILP regulates vacuolar ATPase through interaction with the V1G1 subunit. *J. Cell Sci.* 127:2697–2708. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.142604>
- Deschamps, C., A. Echard, and F. Niedergang. 2013. Phagocytosis and cytokinesis: do cells use common tools to cut and to eat? Highlights on common themes and differences. *Traffic*. 14:355–364. <http://dx.doi.org/10.1111/tra.12045>
- Desjardins, M., L.A. Huber, R.G. Parton, and G. Griffiths. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* 124:677–688. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.124.5.677>
- Dueßberg, C., M. Trokter, R. Jha, I. Sen, M.O. Steinmetz, and T. Surrey. 2014. Reconstitution of a hierarchical +TIP interaction network controlling microtubule end tracking of dynein. *Nat. Cell Biol.* 16:804–811. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2999>
- Fackler, O.T., and A.S. Baur. 2002. Live and let die: Nef functions beyond HIV replication. *Immunity*. 16:493–497. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00307-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00307-2)
- Fairn, G.D., and S. Grinstein. 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* 33:397–405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.03.003>
- Flannagan, R.S., V. Jaumouillé, and S. Grinstein. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 7:61–98. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Foster, J.L., and J.V. Garcia. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology*. 5:84. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-5-84>
- Gaudin, R., S. Berre, B. Cunha de Alencar, J. Decalf, M. Schindler, F.X. Gobert, M. Jouve, and P. Benaroch. 2013. Dynamics of HIV-containing compartments in macrophages reveal sequestration of virions and transient surface connections. *PLoS ONE*. 8:e69450. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069450>
- Gouveia, S.M., and A. Akhmanova. 2010. Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins: end binding proteins and their partners. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 285:1–74. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381047-2.00001-3>
- Guenzel, C.A., C. Hérate, and S. Benichou. 2014. HIV-1 Vpr a still “enigmatic multitasker”. *Front. Microbiol.* 5:127. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00127>
- Harrison, R.E., C. Bucci, O.V. Vieira, T.A. Schroer, and S. Grinstein. 2003. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol. Cell. Biol.* 23:6494–6506. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.18.6494-6506.2003>
- Harrison, R.E., J.H. Brumell, A. Khandani, C. Bucci, C.C. Scott, X. Jiang, B.B. Finlay, and S. Grinstein. 2004. *Salmonella* impairs RILP recruitment to Rab7 during maturation of invasion vacuoles. *Mol. Biol. Cell.* 15:3146–3154. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-02-0092>
- Jacquot, G., E. Le Rouzic, A. David, J. Mazzolini, J. Bouchet, S. Bouaziz, F. Niedergang, G. Pancino, and S. Benichou. 2007. Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. *Retrovirology*. 4:84. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-4-84>
- Jambo, K.C., D.H. Banda, A.M. Kankwatira, N. Sukumar, T.J. Allain, R.S. Heyderman, D.G. Russell, and H.C. Mwandumba. 2014. Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol.* 7:1116–1126. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2013.127>
- Johansson, M., N. Rocha, W. Zwart, I. Jordens, L. Janssen, C. Kuijl, V.M. Olkkonen, and J. Neefjes. 2007. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORPL1, and the receptor betall spectrin. *J. Cell Biol.* 176:459–471. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200606077>
- Jouve, M., N. Sol-Foulon, S. Watson, O. Schwartz, and P. Benaroch. 2007. HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe*. 2:85–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.011>
- Kedzierska, K., and S.M. Crowe. 2002. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr. Med. Chem.* 9:1893–1903. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867023368935>
- Kogan, M., and J. Rappaport. 2011. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*. 8:25. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-8-25>
- Koppensteiner, H., C. Banning, C. Schneider, H. Hohenberg, and M. Schindler. 2012a. Macrophage internal HIV-1 is protected from neutralizing antibodies. *J. Virol.* 86:2826–2836. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.05915-11>
- Koppensteiner, H., R. Brack-Werner, and M. Schindler. 2012b. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. *Retrovirology*. 9:82. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-9-82>
- Kröger, C., A. Colgan, S. Srikumar, K. Händler, S.K. Sivasankaran, D.L. Hammarlöf, R. Canals, J.E. Grissom, T. Conway, K. Hokamp, and J.C. Hinton. 2013. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe*. 14:683–695. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.010>
- Marion, S., J. Mazzolini, F. Herit, P. Bourdoncle, N. Kambou-Pene, S. Hailfinger, M. Sachse, J. Ruland, A. Benmerah, A. Echard, et al. 2012. The NF- $\kappa$ B signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling API and OCRL-bearing vesicles. *Dev. Cell*. 23:954–967. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.09.021>
- Mazzolini, J., F. Herit, J. Bouchet, A. Benmerah, S. Benichou, and F. Niedergang. 2010. Inhibition of phagocytosis in HIV-1-infected macrophages relies on Nef-dependent alteration of focal delivery of recycling compartments. *Blood*. 115:4226–4236. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-12-259473>
- McDonald, D., M.A. Vodicka, G. Lucero, T.M. Svitkina, G.G. Borisy, M. Emerman, and T.J. Hope. 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* 159:441–452. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200203150>
- Moretti, I., and J.M. Blander. 2014. Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes. *Curr. Opin. Immunol.* 26:100–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2013.11.003>
- Moughamian, A.J., and E.L. Holzbaur. 2012. Dynactin is required for transport initiation from the distal axon. *Neuron*. 74:331–343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.025>
- Moutel, S., A. El Marjou, O. Vielemeyer, C. Nizak, P. Benaroch, S. Dübel, and F. Perez. 2009. A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnol.* 9:14. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-9-14>
- Naslavsky, N., and S. Caplan. 2011. EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends Cell Biol.* 21:122–131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2010.10.003>

## ANNEXE 2

---

Afin de rendre accessible et disponible la technique de phagocytose en trois dimensions. Nous avons décidé de publier le détail du protocole expérimental dans le journal *“Journal of Visualised Experiments”*. Celui-ci est actuellement « sous presse ».

La mise au point de cette technique est née de la nécessité d’avoir un moyen technologique pour observer la formation, l’extension des pseudopodes et particulièrement leur fermeture. Afin d’analyser les évènements moléculaires se déroulant au cours de ce processus, la microscopie à ondes évanescentes de haute résolution a été utilisée en alternance avec l’épifluorescence.

Des macrophages qui expriment transitoirement des protéines d’intérêt fusionnées à des étiquettes fluorescentes sont mis au contact d’une surface couvertes de globules rouges opsonisés et fixés de façon non covalente. Les macrophages peuvent alors entourer et détacher les globules rouges tout en gardant l’extrémité des pseudopodes dans la région illuminée par l’onde évanescente (100 nm entre la lamelle et l’échantillon), ce qui permet une visualisation en temps réel des protéines d’intérêt à l’extrémité des pseudopodes et au site de fermeture des phagosomes. L’épifluorescence, quant à elle, permet de visualiser la base de la coupe phagocytaire.

Cette technique nous a donc permis d’identifier sur des cellules vivantes, la dynamine-2 comme protéine responsable de la scission des phagosomes et de mettre en évidence la régulation croisée entre celle-ci et l’actine-F. L’actine-F et la dynamine-2 s’accumulent en un point au moment de la fermeture du phagosome.

## Video Article

## "Phagosome Closure Assay" to Visualize Phagosome Formation in Three Dimensions Using Total Internal Reflection Fluorescent Microscopy (TIRFM)

Florence Marie-Anaïs<sup>1</sup>, Julie Mazzolini<sup>1</sup>, Pierre Bourdoncle<sup>1</sup>, Florence Niedergang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm U1016, Institut Cochin., Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité

Correspondence to: Florence Niedergang at [florence.niedergang@inserm.fr](mailto:florence.niedergang@inserm.fr)

URL: <http://www.jove.com/video/54470>

DOI: [doi:10.3791/54470](https://doi.org/10.3791/54470)

Keywords: phagosome, actin, pseudopods, macrophages, closure, phagocytosis, TIRFM

Date Published: 6/27/2016

Citation: Marie-Anaïs, F., Mazzolini, J., Bourdoncle, P., Niedergang, F. "Phagosome Closure Assay" to Visualize Phagosome Formation in Three Dimensions Using Total Internal Reflection Fluorescent Microscopy (TIRFM). *J. Vis. Exp.* (), e54470, doi:10.3791/54470 (2016).

### Abstract

Phagocytosis is a mechanism used by specialized cells to internalize and eliminate microorganisms or cellular debris. It relies on profound rearrangements of the actin cytoskeleton that is the driving force for plasma membrane extension around the particle. In addition, efficient engulfment of large material relies on focal exocytosis of intracellular compartments. This process is highly dynamic and numerous molecular players have been described to have a role during phagocytic cup formation. The precise regulation in time and space of all of these molecules, however, remains elusive. In addition, the last step of phagosome closure has been very difficult to observe because inhibition by RNA interference or dominant negative mutants often results in stalled phagocytic cup formation.

We have set up a dedicated experimental approach using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) combined with epifluorescence to monitor step by step the extension of pseudopods and their tips in a phagosome growing around a particle loosely bound to a coverslip. This method allows us to observe, with high resolution the very tips of the pseudopods and their fusion during closure of the phagosome in living cells for two different fluorescently tagged proteins at the same time.

### Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/54470/>

### Introduction

Phagocytosis is a major cell function that starts with the recognition and binding of material to surface receptors, which then leads to the internalization and degradation of the ingested material. While single-celled eukaryotes such as the mold *Dictyostelium discoideum* and amoebae use phagocytosis for feeding on bacteria, higher organisms have evolved with professional cells. Macrophages or dendritic cells are the first line of defense against pathogens in various tissues and organs, and are crucial to activate the adaptive immune system through antigen presentation and cytokine production<sup>1-4</sup>. Under certain circumstances phagocytosis can be performed by non-professional phagocytic cells e.g. endothelial and epithelial cells. This process is important to maintain homeostasis during development and in adulthood for normal tissue turnover and remodeling. Finally, specialized phagocytes such as Sertoli cells in the testis or retinal pigment epithelial cells are extremely potent phagocytes<sup>5</sup>.

The formation of a phagosome where degradation of microorganisms or cellular debris occurs starts with the clustering of phagocytic receptors on the surface of the phagocytic cell. Downstream signaling events following clustering of opsonic receptors such as Fc receptors (FcR) or complement receptors (CRs) have been well characterized. However, there are also numerous non-opsonic receptors including Toll-like receptors (TLRs), lectins, mannose receptors and scavenger receptors. These receptors recognize determinants on the particle surface such as mannose or fucose residues, phosphatidylserine, and lipopolysaccharides<sup>1,6-9</sup>.

Pathogen or cell debris recognition involves binding to and clustering of several types of phagocytic receptor, which then lead to intense and transient actin remodeling. In parallel, focal exocytosis of intracellular compartments contributes to the release of membrane tension and is important for efficient phagocytosis of large particles. The signaling events leading to actin polymerization and membrane deformation were dissected in experimental models that triggered a single phagocytic receptor. During FcR-mediated phagocytosis, there is intense actin polymerization that is regulated by small GTPases (Rac, Cdc42). Among their downstream effectors, the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) leads to activation of the Actin-Related Protein 2/3 complex (Arp2/3) that nucleates actin filaments<sup>1,2,4,10</sup>. Local production of phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) is crucial for initial actin polymerization that drives pseudopod formation. Its conversion to PI(3,4,5)P<sub>3</sub> is required for pseudopod extension and phagosome closure<sup>11</sup>. Several pathways contribute to the disappearance of PI(4,5)P<sub>2</sub>. Firstly detachment of phosphatidylinositol phosphate kinases (PIPKs) from the phagosome arrests PI(4,5)P<sub>2</sub> synthesis. Secondly, it can be phosphorylated and consumed by class I PI3K kinases (PI3K) and converted in PI(3,4,5)P<sub>3</sub><sup>12</sup>. A role for phosphatases and phospholipases has also been implied in PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis and F-actin removal during phagocytosis in mammalian cells and in *Dictyostelium*<sup>13,14</sup>. The phospholipase C (PLC)δ hydrolyzes PI(4,5)P<sub>2</sub> into diacylglycerol and inositol-1,4,5-trisphosphate. The PI(4,5)P<sub>2</sub> and PI(3,4,5)P<sub>3</sub> phosphatase OCRL (oculocerebrorenal syndrome of Lowe) has also been implicated in phagosome formation. Precise local formation of F-actin and its

depolymerization is tightly regulated in space and time and we have shown that recruitment of intracellular compartments is important to deliver locally the OCRL phosphatase, thus contributing to local actin depolymerization at the base of the phagocytic cup<sup>13,16</sup>. For this, we used the experimental set up described here.

The mechanism and molecular players required for phagosome closure and membrane scission remain poorly defined because of the difficulties in visualizing and monitoring the site of phagosome closure. Until recently, phagocytosis was observed on fixed or living cells that internalize particles on their dorsal face or on their sides, making the timely visualization of the site of phagosome closure difficult. In addition, fixing methods could cause retraction of membranes and bias the results on pseudopodia extension and closure. By contrast, the assay that we have set up and describe here allows us to visualize pseudopod extension and the closure step of phagocytosis in living cells<sup>13</sup>, based on total internal reflection microscopy (TIRFM)<sup>16</sup>. This optical technique uses an evanescent wave to excite fluorophores in a thin area at the interface between a transparent solid (coverslip) and a liquid (cell culture medium). The thickness of the excitation depth is around 100 nm from the solid surface, allowing visualization of molecular events close to the plasma membrane. TIRFM allows a high signal-to-background ratio, and limits the out-of-focus fluorescence collected and the cytotoxicity due to illumination of cells.

Taking advantage of TIRFM, we developed the "phagosome closure assay" in which coverslips are activated with poly-lysine and then coated with IgG-opsonized red blood cells (IgG-SRBCs). Macrophages expressing transiently fluorescently tagged proteins of interest are then allowed to engulf the IgG-SRBCs. While cells detach the target particles that are non-covalently bound to the glass surface, the tips of the pseudopods can be observed and recorded in the TIRF mode. TIRF acquisitions are combined with acquisitions in the epifluorescence mode, after shifting the stage 3  $\mu\text{m}$  above, which allows the visualization of the base of the phagocytic cup. Addition of pharmacological drugs such as those inhibiting actin or dynamin during the process is also possible to further dissect the process at the molecular level.

The protocol described in detail here is for a RAW264.7 murine macrophage cell line and opsonized particles, but virtually, it can be adapted to any other phagocytic cell and with other targets such as beads. This method will allow better characterization of the regulation in time and space of the molecular players involved in pseudopod extension and phagosome closure during various phagocytic processes.

## Protocol

Note: The plasmid used Lifeact-mCherry is a kind gift of Dr. Guillaume Montagnac, Institut Curie, Paris, generated after<sup>17</sup>

### 1. Cells and Transfection

Note: RAW264.7 macrophages are grown to sub confluency in complete medium (RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamine and 10% FCS (Fetal Calf Serum)) in a 100 mm plate. They are transfected with plasmids encoding fluorescently tagged proteins by electroporation. Routinely approximately  $5 - 6 \times 10^6$  cells are transfected with 20  $\mu\text{g}$  or 10  $\mu\text{g}$  of plasmid for each transfection or co-transfection respectively. Note that other means of transfection based on electroporation or lipofection can be used as alternative approaches.

1. Scrape the cells with a cell lifter and resuspend them in 10 ml of culture medium by pipetting up and down several times.
2. Centrifuge the cell suspension 300 x g, 5 min at RT in swinging angle rotor.
3. Preheat 10 ml of complete medium supplemented with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of gentamicin at 37 °C.
4. Following centrifugation, discard the supernatant and resuspend the pellet in 3 ml of "washing buffer A" from the electroporation kit.
5. Centrifuge the cell suspension 300 x g, 5 min at room temperature in swinging angle rotor.
6. In the meantime prepare the DNA mix at room temperature: 120  $\mu\text{l}$  2x Buffer B, 20  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA coding for the protein of interest, *q.s.p.* 240  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O.
7. Following centrifugation, discard the entire supernatant.
8. Resuspend the cell pellet in the DNA mix and transfer into 4 mm electroporation cuvettes.
9. Incubate at RT for 3 min.
10. Electroporate at 250 V, 900  $\mu\text{F}$ .
11. Immediately resuspend the cells in the pre-warmed (37 °C) complete medium supplemented with gentamicin and plate them in a 100 mm dish.
12. Incubate the transfected cells overnight at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.
13. The next morning, replace the complete medium with 10 ml of serum-free microscopy medium (RPMI 1640 without phenol red, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamine).

### 2. Opsonization of Red Blood Cells

Note: As a model of particle target for macrophages, sheep red blood cells (SRBCs) are used. Usually, around  $7 \times 10^6$  SRBCs per 35 mm glass bottom dish is used.

1. Wash the SRBCs with 100  $\mu\text{l}$  of 1x PBS (phosphate buffered saline)/0.1% BSA (bovine serum albumin) and centrifuge (600 x g, 4 min).
2. Following centrifugation, discard the supernatant and resuspend the SRBCs in 100  $\mu\text{l}$  of 1x PBS/0.1% BSA and centrifuge (600 x g, 4 min).
3. Following centrifugation, discard the supernatant and resuspend the SRBCs in 1x PBS/0.1% BSA with rabbit IgG anti-SRBCs at sub-agglutinating concentration. Use 500  $\mu\text{l}$  of solution containing antibody/5  $\mu\text{l}$  of SRBCs.

Note: The sub-agglutinating concentration of antibodies corresponds to the lowest concentration that did not induce agglutination detected as formation of a network. In general, the sub-agglutinating concentration is 8.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

1. Determine the concentration of IgG anti-SRBCs required to opsonize the SRBCs by a hemagglutination test. Serially dilute the IgG anti-SRBCs (stock at 13.1 mg/ml) between 1/50 - 1/25,600 in a microplate. Add  $2 \times 10^6$  SRBCs in each well. Incubate the plate in the dark at RT for several hr.

4. Incubate at RT for 30 mins with slow rotation.
5. After two washes in 1x PBS/0.1% BSA as described above, resuspend the IgG-opsonized SRBCs (IgG-SRBCs) in pre-warmed serum-free microscopy medium (2 ml/dish).

### 3. Poly-lysine Coating of Coverslips

1. In the meantime, treat 35 mm glass bottom dishes with 2 ml of 0.01% poly-L-lysine for 30 min at room temperature.
2. Wash the dishes two times with 2 ml of 1x PBS.

### 4. Non-covalent Fixation of SRBCs on Glass Bottom Dishes

1. Pour 2 ml of SRBCs suspension per 35 mm glass bottom dish.
2. Centrifuge with a swinging rotor at 500 x g during 2 min onto 35 mm glass bottom dishes.
3. Remove the supernatant and wash once with 2 ml of 1x PBS/10% BSA.
4. Incubate the particles for 30 min with 2 ml of 1x PBS/10% BSA per dish.
5. Wash the dishes three times with 2 ml of 1x PBS.
6. Replace 1x PBS with 2 ml of pre-warmed (37 °C) serum-free microscopy medium.

### 5. Phagocytosis Visualized by TIRFM

#### 1. Microscope

Note: TIRFM was performed using a microscope equipped with an oil-immersion objective (N 100x, NA1.49), a heating chamber with CO<sub>2</sub>, and two single photon detection cameras EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) coupled with a 1.5X lens.

1. The day before the TIRF microscope session, turn on the heating chamber at 37 °C to allow a homogeneous heating of the microscope stage.

#### 2. Critical Angle Determination

Note: ImageJ Color Profiler software is used to process TIRF image streams.

1. Place a 35 mm glass bottom dish containing opsonized SRBC with serum-free microscopy medium under the microscope.
2. Scrape the cells and resuspend them in the medium before adding them (100 - 500 µl) in the dish.
3. Use the "Live Acquisition" software to control the microscope and perform excitation with a 491 nm and/or a 561 nm laser to identify cells expressing fluorescently tagged proteins.
4. Identify a cell that expresses the fluorescently tagged proteins.
5. Place it in the middle of the field and acquire 500 images at one excitation wavelength, with different angles starting from 0° up to 5°, with an increment of 0.01° (Figure 2A). The angles are automatically changed by the microscope system.
6. Determine the critical angle allowing the incident light to be totally reflected at the glass/ medium interface and generate the evanescent wave. Using ImageJ Color Profiler software, open the image sequence by clicking on "File", "Open" and select the file.
7. Select a region of interest (ROI), with the rectangular tool, in the cell with a uniform fluorescence (Figure 2B yellow 1).
8. Plot the "Z axis profile" mean fluorescence intensity measured in the ROI with function of the angles on the x axis by clicking on "Image" tab, "Stacks" in the drop down menu and "Plot Z-axis Profile" (Figure 2B red 2).  
Note: The critical angle is the angle leading to the maximum fluorescence before a sharp decrease in fluorescence.
9. Use any value of angle on the x-axis superior to the critical angle during the microscopy session to obtain a TIRF signal as example 2.00 (Figure 2C).

#### 3. Acquisitions

1. Using Live Acquisition software, set up the parameters of acquisition with the module "Protocol Editor" (Figure 3A).
  1. Create a protocol with a "loop" comprising "Multi Channels" acquisition to acquire fluorescent signal from proteins of interest in the TIRF region. Enter the TIRF angle (for example 2.00), the exposure time (for example 50 msec) and the laser intensity (for example 50%) (Figure 3B 1).
  2. Introduce a "Z move" of the objective 3 µm above the TIRF region to obtain signal acquisition in epifluorescence with the "Multi Channels" tool. Enter an angle below the critical angle (as example 1.00), the time of exposition (50 msec) and the laser intensity (50%) (Figure 3B, 2 and 3).
  3. Next add a "z move" of the objective 3 µm below, to return in the TIRF region (Figure 3B 4). Add a "snapshot" of the cell in bright light LED (Light-Emitting Diode) (Figure 3B 5).
2. Find a cell of interest with a moderate level of fluorescently tagged protein expression that initiates phagocytosis of SRBC by extending plasma membrane around the particle.
3. Place it in the middle of the field.
4. Start streaming acquisition of 500 - 1,000 frames. In the "loop count" tab, enter "750 frames" (Figure 3B 1).  
Note: ImageJ Color Profiler software is used to process TIRF image streams.
5. Open the sequence images in Image J software by clicking "File", "Open" and choosing the file.
6. Separate the channels by clicking on the tab "Image", "Hyperstacks" drop down menu and on "Stack to hyperstack" function. Complete the appeared window: Order: xyctz; Channel (c): number of channels (ex: "2" if you have two fluorochromes); Slices (z): number of slices in z axis (ex: "1" if there is no movement in the z- axis); Frames (t): number of images divided per number of channels; Display mode: Grayscale.  
Note: Two separate image sequences are generated, corresponding to the two different channels.

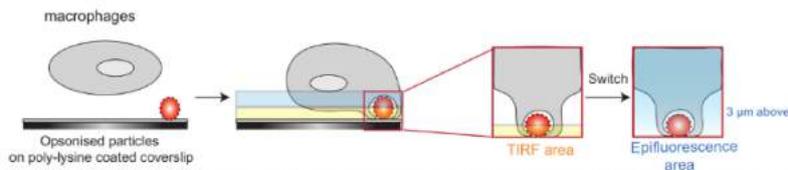
## Representative Results

The experimental system described in this manuscript is schematically represented in **Figure 1**. Transfected RAW264.7 macrophages expressing the proteins of interest fused to a fluorescent tag are placed into contact with IgG-opsonized sheep red blood cells (SRBCs) that were non-covalently fixed on the coverslip. The macrophages can detach the SRBC from the coverslip to engulf it. The TIRF microscope used allows concomitant acquisition of signals from the TIRF area corresponding to the tips of the pseudopods and signals in the epifluorescence mode after a Z shift 3  $\mu\text{m}$  above.

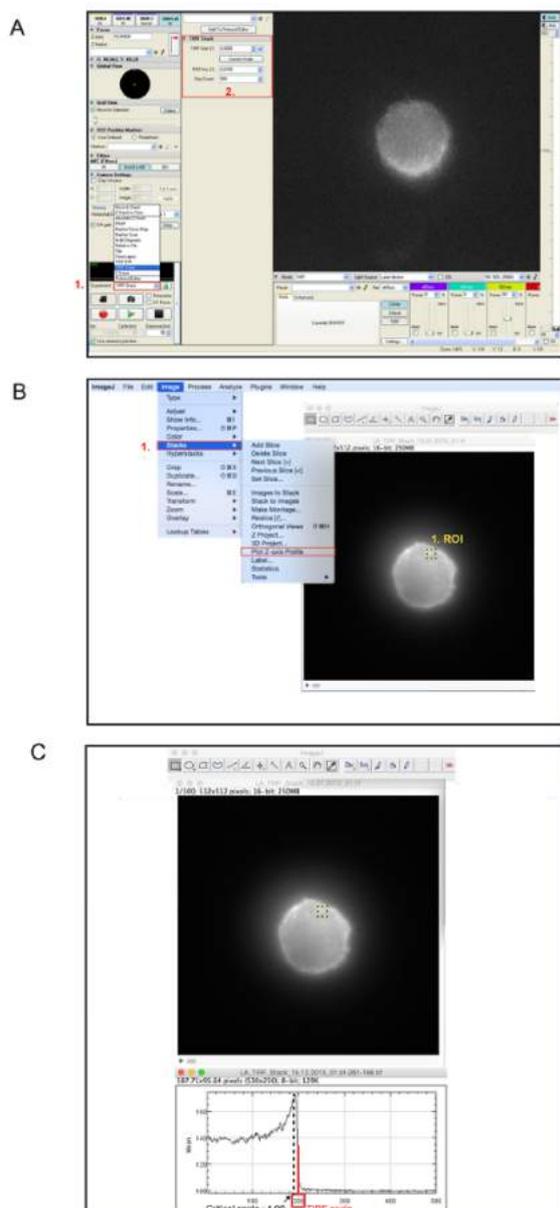
It is essential to determine the critical angle for total internal reflection fluorescence as described in **Figure 2**. This ensures a clean TIRF signal from a 100 nm region below the plasma membrane. **Figure 3** represents the development of acquisition parameters through a module called "Protocol Editor" included in the Live Acquisition software. This module allows users to create and manage workflows before they are sent to the microscope, which will execute the process. At the end of the acquisition, the user collects a TIFF stream.

**Figure 4** shows, a representative live-cell TIRFM movie of a "phagosome closure assay" in RAW264.7 macrophages transfected with the plasmid (e.g., Lifeact-mCherry, a kind gift of Dr. Guillaume Montagnac, Institut Curie, Paris, generated after <sup>17</sup>) to follow actin polymerization. Macrophages transiently expressing plasmid were allowed to engulf IgG-SRBCs bound to the coverslip. As the tips of the pseudopods were apposed to the glass coverslip around one SRBC, an F-actin ring was detected in the TIRF area (top panel) that progressively narrowed until it closed. In parallel, the blurry F-actin signal detected by epifluorescence after shifting the stage 3  $\mu\text{m}$  above (bottom panel) corresponded to depolymerization at the base of the phagocytic cup. After 3 min of acquisition, the SRBC was totally internalized, as confirmed with transmitted light (panel on the right).

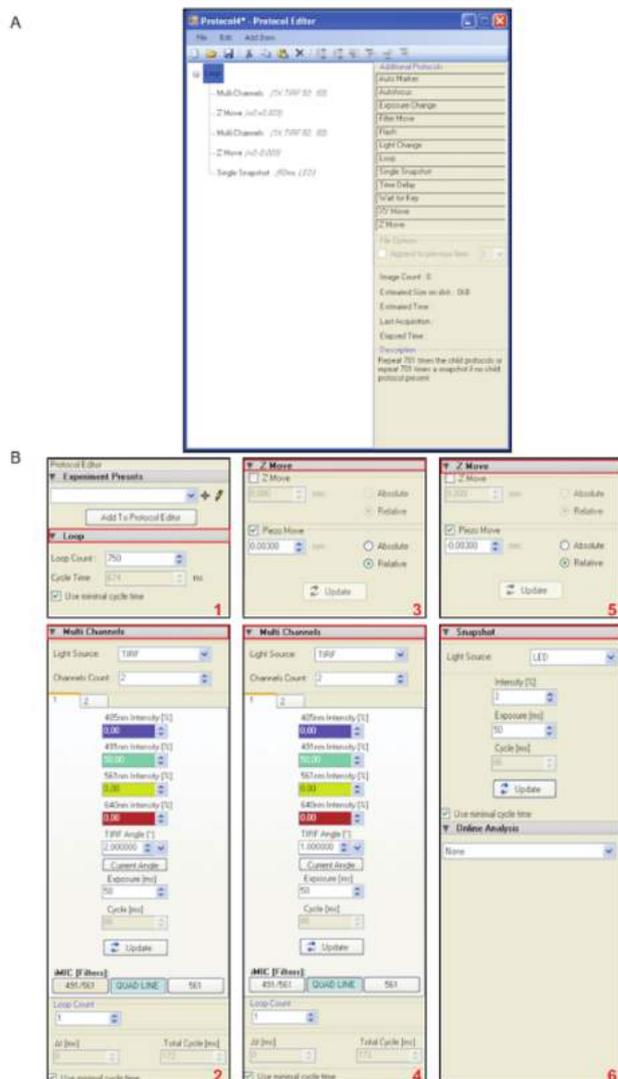
Therefore, this method can be used to properly distinguish the molecular events that take place at the very ends of the pseudopods and the molecular events occurring at the base of the phagocytic cup.



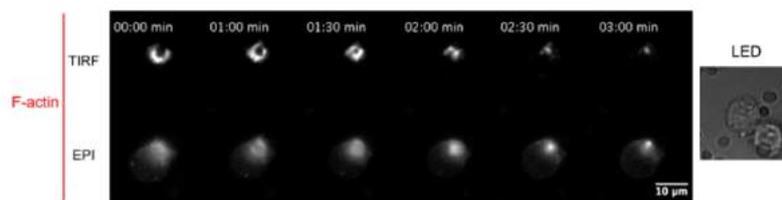
**Figure 1. Schematic Representation of the "Phagosome Closure Assay" Analyzed by TIRFM.** The phagosome closure assay is performed using macrophages transiently expressing one or two fluorescently tagged-protein. Macrophages are deposited on IgG-opsonized SRBCs non-covalently fixed on poly-lysine coated coverslips. Images are recorded in TIRF mode to detect the site of phagosome closure and in epifluorescence mode to detect the base of the phagocytic cup. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 2: Determination of the Critical Angle for TIRFM. (A)** Using "Live acquisition", a cell expressing fluorescently tagged proteins is placed in the middle of the field (region 1 in red). With the TIRF Stack option, images were acquired at one excitation wavelength, with different angles starting from  $0^\circ$  up to  $5^\circ$ , with an increment of  $0.01^\circ$  (region 2 in red). **(B)** The sequence of images is opened using ImageJ Color Profiler software and the mean fluorescence intensity of a region of interest (ROI) is plotted with function of the angles on the x axis using "Stacks" and "PlotZ axis profile" (region 1 in red). **(C)** The x position of the peak of fluorescence on the plot corresponds to the critical angle:  $1.98^\circ$  (black dotted line). Any value after this angle can be used. As an example,  $2.00^\circ$  can be chosen (red line). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 3. Workflow Process using Live Acquisition Module: "Protocol Editor".** (A) In the "Protocol Editor" window, a workflow canvas is created. (B) This protocol comprises a "Loop" of actions that the microscope will repeat the number of times decided by the user. As an example: 750 (1). One loop included: "Multi Channels" acquisition with laser excitation of fluorescent proteins of interest in TIRF mode. As example: Laser 491 nm intensity 50% -TIRF angle 2.00 (2); "Z move" of the objective 3 μm (3); "Multi Channels" acquisition in epifluorescence mode (4); "Z move" of the objective back to the TIRF region (5) and a "Snapshot" in transmitted light (6). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 4. F-actin is Accumulated as a Point at the site of Phagosome Closure.** Phagosome closure assay was performed using RAW264.7 macrophages transiently expressing the plasmid Lifeact-mCherry (a kind gift of Dr. Guillaume Montagnac, Institut Curie, Paris, generated after <sup>17</sup>). The plasmid signal was acquired in TIRF area (top) and in epifluorescence mode (bottom). The red arrowhead indicates the actin accumulation in the TIRF region. Transmitted light image at 3 min is presented, indicating an internalized SRBC. Scale bar, 10 µm. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Movie 1: F-actin is Accumulated in the Tips of the Pseudopods and at the Site of Phagosome Closure, while it is Cleared from the Base of the Phagocytic Cup.** Phagosome closure assay was performed using RAW264.7 macrophages transiently expressing the plasmid. Plasmid imaging in TIRF area (top) and in epifluorescence mode (bottom) using the TIRFM was performed alternatively every 50 msec during 3 min at 37 °C. [Please click here to view this video.](#)

## Discussion

The experimental protocol described here proposes an unprecedented method to follow in real time and in living cells, with high-resolution, the formation of a phagosome and in particular its closure. Several technical aspects have to be discussed. Firstly, the assay is very sensitive to temperature. It is very important to check that the heating chamber is at 37 °C and that all media, devices or cells are kept within the chamber to avoid temperature changes that could impair the efficiency of phagocytosis. We noticed that subtle temperature changes were sufficient to prevent phagosome formation. Secondly, the protocol described here allows a precise determination of the TIRF angle that will be used throughout the experiment. We believe that this constitutes a substantial advantage when performing TIRF experiments, allowing us to be confident when concluding about events near the plasma membrane. Thirdly, when working with transiently transfected cells, it is important to choose cells with moderate levels of expression of the proteins of interest. With the revolution of the genome-editing technology, it will be feasible to work with cells expressing proteins at native levels. Thus, quantitative fluorescence microscopy will be possible to explore the dynamics of major functions in living cells.

With this assay, it is now possible to analyze precisely in time and space the different players involved in pseudopod extension and fusion. The forced orientation of the target to engulf allows better monitoring of extending pseudopods and the closure site, compared with phagosome formation imaging using a confocal microscope and a different experimental set up. The only caveat is the low output. Not all cells chosen on the basis of their fluorescence will phagocytose during the acquisition time. A potential improvement would be to have a patterned surface coated with target particles to increase the number of concomitant acquisitions. Using this method, we have dissected the spatio-temporal organization of F-actin dynamics and recruitment of recycling (VAMP3-positive) vesicles during phagosome formation <sup>13</sup>. We observed recruitment of F-actin at the very tips of closing pseudopods, but no VAMP3-positive vesicles in this closing zone of the phagocytic cup. VAMP3 was only detected as a plasmalemmal diffuse signal. In contrast, VAMP3-positive vesicles were detected at the base of the forming phagosome, as visualized in the epifluorescence images. These results showed that F-actin polymerization occurs in the extending pseudopods and in their tips, while there is depolymerization at the base where the vesicular traffic is concentrated. This spatio-temporal dynamic of F-actin polymerization was proposed in seminal work reviewed in <sup>2</sup> and recently also confirmed in <sup>12</sup>.

Using the same experimental model, we recently showed that dynamin-2, which mediates the scission of endocytic vesicles, was recruited early and concomitantly with actin during phagosome formation and pseudopod extension. Dynamin-2 then accumulates at the site of phagosome scission. Acute treatment of cells with pharmacological inhibitors clearly showed that dynamin-2 plays a crucial role in phagosome scission <sup>18</sup>. The unique possibility to monitor with high precision the closure step in phagosome formation allowed us to conclude the possible role of dynamin-2 in phagosome scission.

The phagosome closure assay can be in principle adapted to any other phagocytic cell (dendritic cells, neutrophils), provided that they express fluorescently tagged proteins of interest. In addition, the method can be extended to other target particles like beads or bacteria. The size and shape of the different targets could also be varied to get further insight into the mechanism of phagosome formation and in particular the forces involved in phagosome closure. Following the localization of different molecular players in living phagocytosing cells using the phagosome

closure assay described here opens avenues for better definition of the molecular mechanisms and machineries important for phagosome formation and closure.

## Disclosures

The authors have nothing to disclose.

## Acknowledgements

We thank Dr. Alexandre Benmerah (Institut Imagine Necker, Paris, France) for initial discussions on the experimental approach and Dr. Jamil Jubrail for reading the manuscript. Nadège Kambou and Susanna Borreil are acknowledged for performing experiments with the method in our laboratory. This work was supported by grants from CNRS (ATIP Program), Ville de Paris and Agence Nationale de la Recherche (2011 BSV3 025 02), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM INE20041102865, FRM DEQ20130326518 including a doctoral fellowship for FMA) to FN, and Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales" (ANRS) including a doctoral fellowship for JM.

## References

1. Flannagan, R. S., Jaumouille, V., & Grinstein, S. The cell biology of phagocytosis. *Ann Rev Pathol.* **7**, 61-98 (2012).
2. Swanson, J. A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 639-649 (2008).
3. Stuart, L. M., & Ezekowitz, R. A. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol.* **8**, 131-141 (2008).
4. Niedergang, F. in *Encyclopedia of Cell Biology*. Vol. 2 (ed Ralph A Bradshaw and Philip D Stahl (Editors in Chief)) 751-757, Waltham, MA: Academic Press, (2016).
5. Poon, I. K., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.* **14**, 166-180 (2014).
6. Aderem, A., & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593-623 (1999).
7. Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol.* **12**, 492-502 (2012).
8. Underhill, D. M., & Ozinsky, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* **20**, 825-852. (2002).
9. Canton, J., Neculai, D., & Grinstein, S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* **13**, 621-634 (2013).
10. Freeman, S. A., & Grinstein, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev.* **262**, 193-215 (2014).
11. Scott, C. C. *et al.* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol.* **169**, 139-149 (2005).
12. Schlam, D. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase enables phagocytosis of large particles by terminating actin assembly through Rac/Cdc42 GTPase-activating proteins. *Nat Commun.* **6**, 8623 (2015).
13. Marion, S. *et al.* The NF-kappaB Signaling Protein Bcl10 Regulates Actin Dynamics by Controlling AP1 and OCRL-Bearing Vesicles. *Dev Cell.* **23**, 954-967 (2012).
14. Looovers, H. M. *et al.* Regulation of phagocytosis in Dictyostelium by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog Dd5P4. *Traffic.* **8**, 618-628 (2007).
15. Deschamps, C., Echard, A., & Niedergang, F. Phagocytosis and cytokinesis: do cells use common tools to cut and to eat? Highlights on common themes and differences. *Traffic.* **14**, 355-364 (2013).
16. Johnson, D. S., Jaiswal, J. K., & Simon, S. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy illuminator for improved imaging of cell surface events. *Curr Protoc Cytom.* **Chapter 12**, Unit 12 29 (2012).
17. Riedl, J. *et al.* Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods.* **5**, 605-607 (2008).
18. Marie-Anais, F., Mazzolini, J., Herit, F., & Niedergang, F. Dynamin-actin cross-talk contributes to phagosome formation and closure. *Traffic.* **17.5**, 487-499 (2016).