

MYRIAM VAILLANCOURT

**IMPLICATION DE LA LIPIDE PHOSPHATASE  
SHIP1 DANS LES VOIES DE SIGNALISATION DU  
CD32A DANS LE NEUTROPHILE HUMAIN**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-Immunologie  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2005

## Résumé

Le neutrophile est spécialisé dans la chimiotaxie et la phagocytose. Ces deux phénomènes sont accompagnés d'une accumulation de phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate. Ce dernier est formé par les phosphatidylinositols 3-kinases. Leur activation et la formation de phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate sont bien caractérisés dans le neutrophile. La régulation du niveau de phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate par les lipide phosphatases est peu étudiée. Nous avons examiné le rôle des lipide phosphatases SHIP1 et PTEN suite à la stimulation du CD32a, un Fc $\gamma$ R, dans la régulation du niveau de phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate. Ce dernier augmente suite à la stimulation du CD32a. La localisation cellulaire et la phosphorylation de SHIP1, mais pas de PTEN, sont modifiées en réponse à la stimulation du CD32a. Ces événements seraient dépendants des Src kinases. Par contre, ils seraient indépendants de l'activation des phosphatidylinositol 3-kinases. SHIP1, et non PTEN, pourrait donc être impliquée dans la régulation du phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate formé suite à la stimulation du CD32a dans le neutrophile humain.

## **Abstract**

The human neutrophil is a cell specialized in chemotaxis and phagocytosis. These events are accompanied by an intracellular increase of the levels of phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate. This second messenger is synthesized by the members of the phosphatidylinositol 3-kinases family. Their activation and phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate increase are well characterized in the neutrophil. Little is known about the regulation of the levels of phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate by lipid phosphatases. We evaluated the role of two lipid phosphatases, SHIP1 and PTEN, in the regulation of the levels of phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate in response to CD32a cross-linking, an Fc $\gamma$  receptor. We observed an accumulation of phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate following CD32a cross-linking. The intracellular localization and phosphorylation of SHIP1, but not PTEN were modified upon CD32a stimulation. These events are Src kinase-dependent and are independent of the activation of phosphatidylinositol 3-kinases. SHIP1, but not PTEN, could be involved in the regulation of phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate in response to CD32a cross-linking in human neutrophil.

## Avant-Propos

Merci tout d'abord au Dr Paul H. Naccache de m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'ai vraiment apprécié travailler sous sa direction pendant ma maîtrise. Il a consacré beaucoup de temps à répondre à mes nombreuses interrogations et je me suis toujours sentie appuyée dans mon projet. Il accorde beaucoup de respect et de disponibilité à ses étudiants. Les discussions scientifiques et culturelles étaient très agréables. Merci de m'avoir fait renouer avec la science.

Merci à tous les membres de l'équipe. C'est grâce à vous si mon projet de maîtrise a été aussi agréable. C'est particulièrement grâce à certaines personnes qu'il a pu se réaliser. Un merci à Emmanuelle, qui a si bien su me conseiller et qui a été constamment présente pour moi. Merci à Sylvain, qui a consacré de longues journées pour ce projet. Merci également à Marie-Lisane pour les semaines qu'elle a consacrées à ce projet et pour ce qu'elle est. Et tous les autres, merci de faire partie de cette équipe qui est tellement dynamique et pleine de compétence. C'est un plaisir de travailler avec vous.

Merci à ma famille pour son soutien financier au cours de toutes ces années. Vous avez toujours été là pour m'encourager. Merci à Matthieu pour ses corrections et ses précieux conseils. Merci à tous ceux qui m'ont aidée à me rendre jusque-là, vous savez qui vous êtes...

Le manuscrit du chapitre II décrit l'implication de la lipide phosphatase SHIP1 dans les voies de signalisation du CD32a, un Fc $\gamma$ R, dans le neutrophile humain. J'ai effectué la majorité des expériences ayant permis la réalisation des figures de l'article. Sylvain Levasseur, Marie-Lisane Tremblay et Emmanuelle Rollet-Labelle ont également contribué à la réalisation des figures de l'article. J'ai écrit le manuscrit, et la correction s'est effectuée avec la collaboration du Dr Paul H. Naccache. Ce manuscrit a été soumis à la revue *Journal of Biological Chemistry* en avril 2005 et, suite à quelques modifications incluses dans la version finale du mémoire, il a été soumis à la revue *Journal of Immunology* en août 2005.

## Table des matières

RÉSUMÉ .....	i
ABSTRACT.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES.....	ix
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 LE NEUTROPHILE HUMAIN.....	1
1.1.1 Le neutrophile.....	1
1.1.2 L'adhésion cellulaire.....	2
1.1.3 La chimiotaxie.....	3
1.1.4 La phagocytose.....	4
1.1.5 Les granules.....	5
1.1.6 Le neutrophile et la réponse immunitaire acquise.....	6
1.2 LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE.....	7
1.2.1 Les récepteurs Fc $\gamma$ du neutrophile.....	7
1.2.2 Signalisation induite par le récepteur CD32a.....	10
1.2.3 Le PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> .....	11
1.2.4 Les phosphatidylinositol 3-kinases.....	15
1.3 LA LIPIDE PHOSPHATASE PTEN.....	22
1.3.1 Fonctions et structure de PTEN.....	22
1.3.2 Activité phosphatase.....	26
1.3.3 Régulation de l'activité de PTEN.....	28
1.3.4 PTEN et récepteurs Fc.....	30
1.3.5 PTEN et chimiotaxie.....	30
1.4 LA LIPIDE PHOSPHATASE SHIP1.....	32
1.4.1 Structure et fonctions de SHIP1.....	32
1.4.2 Activité phosphatase.....	34

1.4.3 Régulation de l'activité de SHIP1 .....	34
1.4.4 SHIP1 et récepteurs Fc .....	35
1.4.5 SHIP1 dans la phagocytose et chimiotaxie.....	38
1.5 LA LIPIDE PHOSPHATASE SHIP2.....	38
1.5.1 Structure et fonctions de SHIP2.....	38
1.5.2 Régulation de l'activité de SHIP2 .....	39
1.5.3 SHIP2 et récepteurs Fc .....	39
1.6 BUT DE L'ÉTUDE.....	39
CHAPITRE II .....	41
THE SRC HOMOLOGY 2-CONTAINING INOSITOL 5- PHOSPHATASE 1 (SHIP1) IS INVOLVED IN CD32A SIGNALING IN HUMAN NEUTROPHILS .....	41
2.1 RÉSUMÉ .....	42
ABSTRACT.....	44
INTRODUCTION .....	45
MATERIALS AND METHODS.....	47
RESULTS .....	52
DISCUSSION.....	58
REFERENCES .....	62
FOOTNOTES .....	68
FIGURE LEGENDS.....	69
CHAPITRE III.....	80
Discussion.....	80
CONCLUSION.....	84
Perspectives et conclusions.....	84
BIBLIOGRAPHIE.....	86

## Liste des tableaux

Tableau 1	Les phénotypes de souris knockout pour les PI3Ks de classe I, SHIP1 et PTEN	20
-----------	---	----

## Liste des figures

Schéma 1	Structure des récepteurs Fc des immunoglobulines	9
Schéma 2	Le rôle cellulaire du PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	13
Schéma 3	Modèle suggéré pour le rôle des phosphatidylinositols dans l'initiation de la phagocytose et la maturation du phagosome	14
Schéma 4	La synthèse et la régulation des phosphatidylinositols	17
Schéma 5	Structure des PI3Ks de classe I, II et III et de leurs protéines adaptatrices respectives	18
Schéma 6	La synthèse du PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> et sa régulation par les lipide phosphatases SHIP1 et PTEN	24
Schéma 7	Structure de la lipide phosphatase PTEN	25
Schéma 8	L'effet anti-oncogénique de PTEN par son contrôle sur l'activation d'Akt	27
Schéma 9	Modèle suggéré pour la régulation de l'activité enzymatique de PTEN par la phosphorylation	29
Schéma 10	Modèle suggéré pour l'implication du PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> et de PTEN dans la chimiotaxie	31
Schéma 11	Structure des lipides phosphatases SHIP1 et SHIP2	33
Schéma 12	Modèle suggéré pour l'implication de SHIP(1) en réponse à la stimulation du CD32a dans le macrophage	37
Figure 1	Cross-linking of CD32a leads to the accumulation of PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> in human neutrophils	72
Figure 2	SHIP1 and PTEN are present in human neutrophils	73
Figure 3	SHIP1, but not PTEN, is phosphorylated in response to CD32a cross-linking in human neutrophils	74
Figure 4	Antibody IV.3 linked to Pansorbin induces SHIP1 tyrosine phosphorylation in human neutrophils	75
Figure 5	SHIP1 but not PTEN translocates to the plasma membrane of human neutrophils in response to CD32a cross-linking	76



Figure 6	PP2 inhibits the tyrosine phosphorylation of SHIP1 observed in response to CD32a cross-linking	77
Figure 7	PP2 inhibits the translocation of SHIP1 to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking	78
Figure 8	Wortmannin does not inhibit SHIP1 tyrosine phosphorylation and translocation to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking	79

## Liste des abréviations utilisées

ARNO	ADP-ribosylation factor nucleotide-binding-site opener
BCR	B cell receptor
BMMCs	Bone marrow mast cells
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
C5a	Complement 5a fragment
CD11a/CD18	LFA-1
CD11b/CD18	MAC-1
CD16a	FcγRIIIa
CD16b	FcγRIIIb
CD32a	FcγRIIa
CD32b	FcγRIIb
CD40	Bp50
CD64	FcγRI
CD80	B7, B7.1
CD83	HB15
CD86	B7.2
CK2	Casein kinase II
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CML	Chronic myelogenous leukemia
CR1	Complement receptor 1
CRKL	CRK like protein
DFP	Diisofluorophosphate
DOK1	Docking protein 1
DOS	Daughter of sevenless
EGF	Epidermal growth factor
FAK	Focal adhesion kinase
FcR	Fc receptor
fMet-Leu-Phe	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

GAB1	GRB2-associated binding protein 1
GAP1	GTPase activating protein 1
GDP-GTP	Guanine diphosphate-guanine triphosphate
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GPCRs	G-protein-coupled receptors
GPI	Glycosyl phosphatidylinositol
GRP1	General receptor for phosphoinositides 1
HBSS	Hank's balanced salt solution
HLA	Human leukocyte antigen
HPLC	High pressure liquid chromatography
HR1	Kinase domain
HR2	Phosphatidylinositol kinase domain
HR3	C2 domain
HR4	Ras binding domain
iC3b	Inactive derivative of C3b
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukine
Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	Inositol(1,3,4,5)tetrphosphate
IP-10	Interferon-gamma-inducible protein-10
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs
kDa	kiloDaltons
LAD1	Leukocyte adhesion deficiency 1
LAD2	Leukocyte adhesion deficiency 2
LPS	Lipopolysaccharide
LTB <sub>4</sub>	Leucotriene B <sub>4</sub>
MAGI	Membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MIG	Monokine induced by interferon gamma
MIP	Macophage inflammatory protein
MMAC1	Mutated in multiple advanced cancers 1
MRPs	Myeloid-related proteins
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sodium orthovanadate
NGF	Nerve growth factor
PAF	Platelet activating factor
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PMN	Polymorphonuclear neutrophil
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate
PTEN	Phosphatase deleted on chromosome ten
PX	Phox homology
RNAi	RNA interference
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	Src homology domain 2
SH3	Src homology domain 3
SHIP	Src Homology 2-containing 5'-inositol phosphatase
SHP2	SH2-containing tyrosine phosphatase 2
TCR	T cell receptor
TEP1	TGFβ-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1
TLR	Toll-like receptor

TNF

Tumor necrosis factor

Vps34p

Vacuolar protein sorting mutant

# Introduction

## Chapitre I

### 1.1 Le neutrophile humain

Le neutrophile est une cellule jouant un rôle de première ligne dans la réponse immunitaire innée. De plus, plusieurs données récentes indiquent qu'il est aussi probablement impliqué à l'interface entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire acquise. Bien que l'implication du neutrophile dans le déclenchement et le développement de multiples pathologies inflammatoires dont l'arthrite rhumatoïde et la goutte soit admise, les mécanismes régissant le fonctionnement de cette cellule ne sont que partiellement élucidés<sup>1</sup>. Dans cette optique, il est donc important de développer une meilleure compréhension des voies d'activation de cette cellule afin de pouvoir mieux contrôler ses fonctions premières, soient la chimiotaxie et la phagocytose.

#### 1.1.1 Le neutrophile

La réponse immunitaire innée vise une destruction rapide des pathogènes. Elle est non-spécifique et, contrairement à la réponse immunitaire acquise, elle peut agir dès la première exposition au pathogène. Le neutrophile, également nommé leucocyte polymorphonucléaire neutrophile (PMN) à cause de son noyau multilobé, tient son nom de sa couleur neutre à une coloration de Wright<sup>2</sup>. Il est un constituant important de la réponse immunitaire innée, étant le premier type cellulaire arrivé sur les lieux d'une inflammation ou d'une blessure. Il a donc comme rôle de participer à la défense de l'organisme et d'enclencher la réponse immunitaire.

Le neutrophile constitue la cellule blanche du sang la plus abondante, représentant plus de 55% des leucocytes du sang périphérique<sup>1</sup>. En moyenne, plus de  $10^{10}$  neutrophiles sont produits chaque jour par la moelle osseuse d'un être humain adulte sain<sup>3,4</sup>. Le neutrophile se différencie dans celle-ci à partir d'une cellule-souche myéloïde pluripotente. Les facteurs de croissance GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), de même que les

interleukines 3, 6 et 8 ont la capacité d'induire la différenciation de cellules-souches pluripotentes en neutrophiles<sup>2,5</sup>. Pour ce faire, la cellule passe par l'état de myéloblaste, de promyélocyte et de myélocyte, étapes au cours desquelles elle possède encore la capacité de se diviser<sup>2</sup>. Par la suite, elle devient amitotique, *i.e.* qu'elle ne peut plus se diviser. Elle se transforme ensuite en métamyélocyte et finalement en neutrophile mature, qui peut passer dans la circulation sanguine.

En l'absence d'un foyer inflammatoire, le neutrophile circule pendant quelques heures dans le sang périphérique avant de passer dans les tissus, où il a une durée de vie de quelques jours seulement. Ensuite, la plupart meurent par apoptose programmée.

### 1.1.2 L'adhésion cellulaire

Le neutrophile, dans la circulation sanguine, est habituellement inactif. Pour exercer ses fonctions, il doit passer de la circulation sanguine aux tissus infectés ou inflammés. Ce passage s'effectue en plusieurs étapes: le roulement sur l'endothélium activé, l'activation du neutrophile, l'adhésion et la migration transendothéliale<sup>1</sup>. Le neutrophile exprime des molécules d'adhésion de faible affinité qui lui permettent de rouler sur l'endothélium vasculaire activé lorsqu'il rencontre des ligands. Le neutrophile exprime constitutivement le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) qui se lie à la P-sélectine et à la L-sélectine sur l'endothélium<sup>6-8</sup>. Le neutrophile exprime également la L-sélectine qui serait impliquée dans le roulement<sup>9,10</sup>. Alors qu'il roule sur l'endothélium, le neutrophile peut être activé par le fMet-Leu-Phe (N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine), l'IL-8 (interleukine 8), le C5a (complement 5a fragment), le PAF (platelet activating factor) ou le LTB<sub>4</sub> (leucotriene B<sub>4</sub>) solubles ou liés à un récepteur sur l'endothélium<sup>11-15</sup>. Cette activation amène un changement de conformation des molécules d'adhésion de haute affinité, les  $\beta_2$ -intégrines, qui adoptent alors leur forme active prête à lier leur ligand. Dans le neutrophile, il y a une activation du CD11b/CD18 (Mac-1) et du CD11a/CD18 (LFA-1)<sup>15</sup>. Le CD11a/CD18 peut lier ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3<sup>16</sup> et le CD11b/CD18 peut lier ICAM-1, ICAM-2, iC3b (inactive derivative of C3b), le fibrinogène<sup>17,18</sup> et la E-sélectine<sup>1</sup>. L'activation des  $\beta_2$ -intégrines mène à une adhésion ferme sur l'endothélium. Par la suite, la transmigraton s'effectue grâce à la liaison

homotypique de PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) exprimé par le neutrophile et l'endothélium<sup>19</sup>. À l'aide d'un pseudopode, le neutrophile transmigre entre les cellules de l'endothélium du vaisseau sanguin tout en gardant un contact étroit avec celui-ci. Il atteint finalement les tissus.

Certaines maladies sont causées par un problème au niveau du roulement des neutrophiles ou de leur adhésion ferme. Par exemple, dans le cas de la LAD2 (leukocyte adhesion deficiency 2), une expression défectueuse du glucide sialyl-Lewis X, un ligand des sélectines, empêche une liaison entre les sélectines du neutrophile et de l'endothélium. Il y a donc une absence de roulement sur l'endothélium<sup>20</sup>. Dans le cas de LAD1 (leukocyte adhesion deficiency 1), les neutrophiles roulent mais ne peuvent pas adhérer fermement à l'endothélium, à cause d'une mutation dans le gène  $\beta_2$ -intégrine CD18<sup>1,21</sup>. Ces patients souffrent d'infections sévères à répétition.

### 1.1.3 La chimiotaxie

Dès son entrée dans les tissus, le neutrophile doit se diriger vers la source de l'inflammation, soit les pathogènes et les débris cellulaires, pour les éliminer. Pour ce faire, il utilise la chimiotaxie, qui est la capacité d'une cellule à suivre le gradient croissant d'une substance chimique<sup>5</sup>. Le neutrophile peut détecter plusieurs molécules relarguées par des pathogènes ou par des cellules lésées: les peptides formylés bactériens tel le fMet-Leu-Phe, l'IL-8, que le neutrophile lui-même peut sécréter, le C5a, les MRPs (myeloid-related proteins) S100A8, S100A9 et S100A8/A9 et les médiateurs lipidiques PAF et LTB<sub>4</sub><sup>22-24</sup>. La plupart des récepteurs d'agents chimioattractants sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérodimériques (GPCRs)<sup>25,26</sup>. Lorsque le neutrophile rencontre une de ces substances, son récepteur spécifique est activé, ce qui déclenche une cascade de signalisation et résulte en la polymérisation de l'actine. L'actine se polymérise au front de migration de la cellule et se dépolymérise à l'arrière<sup>27,28</sup>. Il y a alors formation d'un pseudopode qui contrôle le mouvement cellulaire et le neutrophile se dirige vers le site inflammatoire.



### 1.1.4 La phagocytose

Lorsque le neutrophile atteint le foyer inflammatoire, il a comme fonction de phagocyter les pathogènes et les débris cellulaires pour contribuer à la résorption de l'inflammation. La phagocytose est un type d'endocytose. L'endocytose est l'action d'internaliser des particules extracellulaires. La phagocytose est plus spécifiquement l'internalisation active des particules de taille supérieure à 0.5  $\mu\text{m}$  et est dépendante de l'actine et des récepteurs. C'est un processus hautement régulé. Plusieurs cellules font partie des cellules phagocytaires professionnelles, dont les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques<sup>29</sup>.

La première étape de la phagocytose est la reconnaissance du pathogène par la cellule phagocytaire. Le neutrophile étant la première cellule immunitaire à arriver sur les lieux inflammatoires, il doit avoir la capacité de reconnaître toutes les classes de pathogènes. Pour ce faire, il exprime des TLRs (toll-like receptors)<sup>30</sup>. Ces récepteurs transmembranaires ont la capacité de reconnaître les motifs PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), qui sont des structures moléculaires retrouvées seulement dans les pathogènes, comme le LPS (lipopolysaccharide), que l'on retrouve dans les bactéries Gram négatif, et l'ARN double-brin, que l'on retrouve dans les virus. Chaque TLR lie des PAMPs spécifiques et comme il en existe plus d'une dizaine, presque tous les pathogènes peuvent ainsi être reconnus. De plus le CD11b/CD18 est aussi capable de se lier aux LPS bactériens. Le neutrophile, en exprimant tous les TLRs (sauf le TLR3) peut donc identifier la majorité des pathogènes dès la première exposition<sup>30</sup>.

La stimulation des TLRs dans le neutrophile induit la production d'IL-8, la perte de la L-sélectine à la surface, augmente l'efficacité de la phagocytose et diminue la réponse chimiotactique induite par l'IL-8<sup>30</sup>. Il n'y a pas d'évidence jusqu'à aujourd'hui indiquant que les TLRs soient des récepteurs de phagocytose à proprement parler, mais ils pourraient faciliter la phagocytose *via* d'autres récepteurs, moduler la maturation des phagosomes et influencer la transcription nécessaire à la phagocytose<sup>31</sup>. Il a été démontré récemment que dans les macrophages murins *MyD88*<sup>-/-</sup> (myeloid differentiation factor 88, une protéine adaptatrice impliquée dans la cascade de signalisation de la majorité des

TLRs) et *tlr2*<sup>-/-</sup> *tlr4*<sup>-/-</sup>, la formation et la maturation du phagosome est plus lente lors de la phagocytose d'une bactérie que dans les macrophages de souris sauvages<sup>32</sup>.

Les TLRs permettent surtout la reconnaissance des pathogènes. Mais les cellules phagocytaires expriment certains récepteurs qui facilitent directement la phagocytose, comme par exemple des récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines (FcRs). Ce phénomène fait donc un lien entre la réponse immunitaire acquise et innée, les phagocytes étant des cellules de la réponse innée, et les lymphocytes B, qui produisent les immunoglobulines, étant des cellules de la réponse immunitaire acquise. Suite à une première exposition à un antigène, la réponse immunitaire acquise, via les lymphocytes B, va produire des anticorps contre ce pathogène. Lors d'une deuxième exposition, les anticorps vont pouvoir se lier sur le pathogène, phénomène que l'on nomme opsonisation. Les cellules exprimant des récepteurs Fc pour les immunoglobulines vont phagocyter plus facilement ce pathogène opsonisé. Plusieurs types cellulaires expriment des récepteurs Fc: les monocytes/macrophages, les mastocytes, les éosinophiles, les neutrophiles, les plaquettes et les lymphocytes B<sup>33</sup>. Il existe différents sous-types de récepteurs Fc, selon la classe d'immunoglobuline qu'ils lient: Fc $\alpha$  pour l'IgA, Fc $\epsilon$  pour l'IgE, Fc $\gamma$  pour l'IgG. Les récepteurs Fc $\gamma$  exprimés par le neutrophile seront décrits en détails dans les sections suivantes.

### 1.1.5 Les granules

Au cours de la phagocytose, les particules ingérées peuvent être détruites de deux façons: par la fusion du phagosome avec des granules cytoplasmiques contenant des enzymes digestives et par la production de réactifs oxygénés par la NADPH oxydase, phénomène appelé « explosion oxydative »<sup>34</sup>.

Le neutrophile possède plusieurs types de granules dans son cytoplasme. Le contenu de certaines granules peut être relargué dans le milieu extracellulaire pour aider à résorber l'inflammation, mais les granules peuvent également fusionner avec le phagosome pour digérer et détruire le pathogène ingéré. Les granules du neutrophile sont divisées en quatre types: azurophiles (ou primaires), spécifiques (ou secondaires), gélatinases et sécrétoires. Les granules azurophiles contiennent de la myéloperoxydase, du

lysozyme, du BPI (bactericidal permeability increasing protein), de l'élastase, des cathepsines, des défensines et des hydrolases acides<sup>35,36</sup>. Les granules spécifiques contiennent du lysozyme, de la lactoferrine, de la gélatinase, de la collagénase, de la  $\beta_2$ -microglobuline, du récepteur du TNF (tumor necrosis factor), du récepteur du fMet-Leu-Phe et du CD11b/CD18<sup>37</sup>. Les granules gélatinases contiennent une grande quantité de gélatinase et du CD11b/CD18<sup>36</sup>. Les granules sécrétoires contiennent de la phosphatase alcaline, du CD11b/CD18, du récepteur du fMet-Leu-Phe, et du CR1 (complement receptor 1). Les granules sécrétoires sont celles qui pourraient fusionner le plus rapidement avec la membrane plasmique du neutrophile, lorsque celui-ci roule sur l'endothélium activé<sup>37</sup>. Les granules gélatinases pourraient aider le neutrophile à traverser l'endothélium et à migrer à travers les tissus<sup>37</sup>. Les granules spécifiques et azurophiles fusionneraient avec le phagosome pour aider à digérer la particule ingérée<sup>37</sup>.

Certaines maladies sont causées par un problème au niveau des granules dans le neutrophile. Par exemple, dans le cas du syndrome de Chediak-Higashi, on retrouve des granules azurophiles géantes qui sont incapables de fusionner. Ces patients souffrent d'infections sévères<sup>1</sup>.

### 1.1.6 Le neutrophile et la réponse immunitaire acquise

Ce qu'il advient du neutrophile après qu'il ait commencé à phagocyter au site inflammatoire ne fait pas l'unanimité. Certains prétendent que le neutrophile meurt rapidement et serait ensuite phagocyté après qu'il ait exercé ses fonctions<sup>38,39</sup>. D'autres affirment que le neutrophile subirait des transformations morphologiques pour devenir une cellule présentatrice d'antigène capable d'activer et de recruter les cellules de la réponse immunitaire acquise. En effet, certaines substances libérées lors de la dégranulation, comme par exemple la défensine- $\alpha$  et l'azurocidine, sont chimiotactiques pour les cellules dendritiques immatures et les lymphocytes T<sup>22</sup>. De plus, la culture de précurseurs tardifs de neutrophile en présence de GM-CSF, d'IL-4 et de TNF- $\alpha$  induit l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques aux cellules présentatrices d'antigène, comme le HLA-DR (human leukocyte antigen DR), HLA-DQ, CD80 (B7, B7.1), CD86 (B7.2), CD40 (Bp50), CMHII (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), ce qui

leur permet d'activer les lymphocytes T<sup>40,41</sup>. Lors de la culture de neutrophiles matures en présence de GM-CSF, d'IFN $\gamma$  (interferon gamma) et de sérum autologue, on observe une expression du CD83 (HB15), qui est un marqueur « spécifique » des cellules dendritiques<sup>42</sup>. La granulomatose de Wegener (également appelée ANCA-associated vasculitis) est une maladie où on observe une destruction des vaisseaux sanguins accompagnée d'une infiltration de neutrophiles au niveau du nez, des poumons et des reins<sup>43</sup>. Dans ce modèle inflammatoire humain, les neutrophiles expriment le CMH de classe II, le CD80 et le CD86<sup>44</sup>. De plus, les neutrophiles de plusieurs patients atteints d'infection bactérienne sévère expriment le CD83<sup>45</sup>. Le neutrophile peut également sécréter des chimiokines qui recrutent des cellules de la réponse immunitaire acquise, comme MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein alpha et beta), qui agissent sur les lymphocytes T et les cellules dendritiques, et IP-10 (interferon-gamma-inducible protein-10) et MIG (monokine induced by interferon gamma), qui agissent sur les lymphocytes Th1<sup>46</sup>. Le neutrophile pourrait ainsi jouer un rôle dans l'orchestration du recrutement et de l'activation des cellules de la réponse immunitaire acquise et innée.

## 1.2 La signalisation intracellulaire

### 1.2.1 Les récepteurs Fc $\gamma$ du neutrophile

Le neutrophile humain exprime constitutivement deux Fc $\gamma$ Rs, récepteurs qu'il exprime déjà lors de sa sortie de la moelle osseuse: le CD32a (Fc $\gamma$ RIIa) et le CD16b (Fc $\gamma$ RIIb) (voir schéma 1)<sup>47,48</sup>. Ces deux récepteurs ont une faible affinité pour la portion Fc des IgGs, mais sont présents en grand nombre sur ces cellules. On retrouve cinq fois plus de CD16b que de CD32a à la surface du neutrophile humain<sup>49</sup>. Le CD16b étant plus nombreux, c'est donc probablement lui qui lie les particules opsonisées. Les études menées par Nagarajan *et al.* suggèrent en effet que le CD32a serait constitutivement dans une conformation de faible affinité et qu'une stimulation par le fMet-Leu-Phe ou l'IL-8 serait nécessaire pour induire une augmentation de son affinité, un peu comme pour les  $\beta_2$ -intégrines<sup>50,51</sup>. Le neutrophile humain peut également exprimer un Fc $\gamma$ R de haute affinité, suite à une exposition prolongée à l'IFN $\gamma$ : le CD64 (Fc $\gamma$ RI)<sup>52</sup>. Il est important de mentionner que le neutrophile humain exprime une combinaison unique de Fc $\gamma$ Rs; en

effet, le CD32a n'est exprimé que chez l'homme et le CD16b n'est retrouvé que dans le neutrophile humain<sup>53</sup>. Il n'existe donc pas de modèles knockout pour ces deux récepteurs.

La plupart des FcγRs comportent un domaine de liaison extracellulaire, un domaine intramembranaire et un domaine intracytoplasmique. Ils envoient un message intracellulaire via un motif ITAM (immuno-receptor tyrosine-based activation motif)<sup>54,55</sup> ou ITIM (immuno-receptor tyrosine-base inhibitory motif)<sup>56</sup>, qui est situé soit sur leur propre domaine intracytoplasmique, soit sur une chaîne indépendante avec laquelle ils s'associent suite à leur stimulation. Les deux récepteurs du neutrophile sont atypiques. Le CD32a est un récepteur avec un domaine extracellulaire, un domaine intramembranaire et un domaine intracytoplasmique portant un motif ITAM unique (deux motifs YxxL séparés par 12 résidus au lieu de 7) (voir schéma 1)<sup>33</sup>. Le CD16b fait exception à la règle car il ne possède qu'un domaine extracellulaire ancré à la membrane plasmique via une molécule GPI (glycosyl phosphatidylinositol) et ne possède pas de domaine intracytoplasmique (voir schéma 1). Ses partenaires de signalisation ne sont pas connus dans le neutrophile, mais le CD32a et le CD11b/CD18 pourraient être impliqués<sup>57-59</sup>.

Comme les FcγRs exprimés constitutivement par le neutrophile humain sont de faible affinité pour leur ligand, l'activation d'un seul récepteur isolé sur une cellule n'est pas suffisante pour avoir un effet intracellulaire. Par contre, la stimulation de plusieurs récepteurs simultanément, ce qui se produit probablement *in vivo* lorsqu'une particule opsonisée entre en contact avec un neutrophile, est suffisante pour déclencher une cascade de signalisation<sup>2</sup>. On peut mimer ce phénomène *in vitro* en stimulant des neutrophiles avec des particules couplées à des anticorps<sup>60</sup> ou encore en incubant les neutrophiles avec des anticorps dirigés contre les FcγRs puis avec un deuxième anticorps dirigé contre les premiers, ce qui aura pour effet de rapprocher les FcγRs et d'envoyer un message intracellulaire<sup>61</sup>.

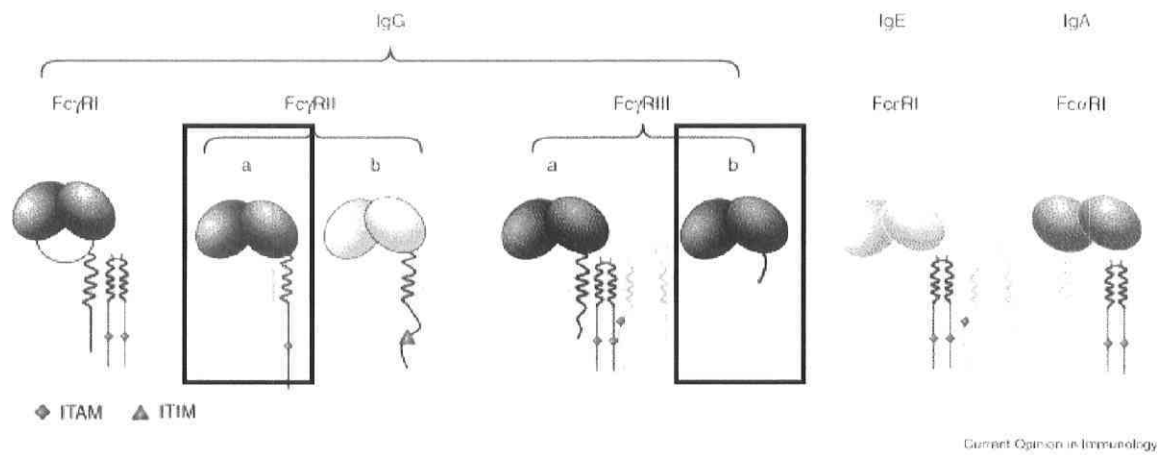


Schéma 1. Structure des récepteurs Fc des immunoglobulines. Les FcRs exprimés par le neutrophile humain sont encadrés. Hogarth, PM, Current Opinion in Immunology, 14, 2002.

### 1.2.2 Signalisation induite par le récepteur CD32a

Le CD32a est un récepteur activateur, c'est-à-dire qu'il délivre, de l'extérieur vers l'intérieur, un signal qui stimule positivement la cellule. Dans le neutrophile humain, immédiatement après la liaison du CD32a avec une particule opsonisée par des IgGs, il y a phosphorylation du CD32a sur deux résidus tyrosine du motif ITAM de la queue intracellulaire (tyrosine 282 et 298) par une Src kinase qui serait recrutée à la membrane plasmique. Son identification n'a pas été confirmée dans le neutrophile, mais Fgr, Lyn et Hck sont des candidats potentiels<sup>62,63</sup>. La stimulation du CD32a dans le neutrophile amène une augmentation significative du profil de phosphorylation global sur les résidus tyrosine<sup>64</sup>. Ce profil est inhibé par le PP2, un inhibiteur de la famille des Src kinases<sup>65</sup>, ce qui montre bien que les événements de phosphorylation par les Src kinases sont importants pour l'initiation de l'activation du CD32a<sup>64</sup>. Il existe également un autre résidu tyrosine dans la queue cytoplasmique du CD32a qui est phosphorylé lors de sa stimulation (tyrosine 275) mais qui n'est pas situé dans le motif ITAM. Des études de transfection dans les cellules COS-1 ont montré que la mutation de ce résidu n'inhibe pas la phagocytose, mais lorsque muté simultanément avec un des résidus du motif ITAM, on observe une diminution de la phagocytose<sup>66</sup>. La mutation d'un seul des deux résidus situés dans le motif ITAM diminue de moitié la capacité de phagocytose<sup>66</sup>. La stimulation du CD32a dans le neutrophile humain induit aussi une phosphorylation de la tyrosine kinase Syk<sup>60</sup>. Une pré-incubation avec du piceatannol, un inhibiteur de Syk, diminue la phagocytose par le CD32a<sup>67</sup>. *In vitro*, les mutations du motif ITAM ont une influence sur le recrutement de Syk<sup>62</sup>. La phosphorylation des résidus tyrosine du motif ITAM serait donc importante pour l'initiation de la cascade signalitique du CD32a.

La caractérisation du rôle de Syk dans les voies de signalisation des FcγRs a surtout été menée dans des modèles murins, donc en l'absence de CD32a. Les neutrophiles de souris *syk*<sup>-/-</sup> sont incapables de générer des réactifs oxygénés en réponse à la stimulation des FcγRs<sup>68</sup>. Les macrophages de souris *syk*<sup>-/-</sup> sont incapables de phagocyter efficacement<sup>69</sup>.

La stimulation du CD32a dans le neutrophile humain amène également une mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>64</sup>. Le CD32a est recruté dans les domaines membranaires résistants aux détergents après sa stimulation. Ces domaines membranaires sont riches en cholestérol et en sphingolipides et sont importants pour la signalisation de plusieurs récepteurs comme le TCR (T cell receptor) et le BCR (B cell receptor)<sup>70</sup>. Après ce déplacement du CD32a dans les domaines membranaires résistants aux détergents, on observe une perte d'immunoréactivité avec un anticorps dirigé contre le motif ITAM de sa partie intracellulaire<sup>64</sup>. Cette perte d'immunoréactivité pourrait être due à une protéine cytosolique, car lors de la stimulation du CD32a sur des membranes plasmiques isolées de neutrophile, on n'observe pas ce phénomène bien que le récepteur soit phosphorylé. Cette perte d'immunoréactivité est une observation dont la base mécanistique et la pertinence fonctionnelle ne sont pas encore comprises<sup>71</sup>. La sous-unité p85 de la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) est phosphorylée et retrouvée à la membrane plasmique en réponse à la stimulation du CD32a dans le neutrophile humain, ce qui suggère que cette dernière induit une accumulation de phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>)<sup>72</sup>. *In vitro*, les mutations du motif ITAM ont une influence sur le recrutement de la sous-unité p85 de la PI3K. L'implication du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> dans les fonctions cellulaires comme la chimiotaxie et la phagocytose, sa synthèse et sa régulation seront abordées plus en détail dans les sections suivantes.

### 1.2.3 Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>

Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> fait partie d'une classe de phospholipides qui contiennent un groupement inositol; on les nomme phosphoinositides ou phosphatidylinositols. Ils constituent de 2 à 8 % des lipides cellulaires totaux<sup>73</sup> et sont formés d'une molécule D-*myo*-inositol-1-phosphate liée à un groupement glycérol via un phosphate. Bien que représentant une faible proportion des lipides totaux, ils sont toutefois profondément impliqués dans la génération de signaux intracellulaires de plusieurs récepteurs, y compris les FcγRs dans le neutrophile.



Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est un second messenger cellulaire impliqué dans l'activation de la cellule, la survie et la prolifération cellulaire, le trafic membranaire, la production d'anion superoxyde, la polymérisation de l'actine, la chimiotaxie et la phagocytose (voir schéma 2).

La formation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> à la membrane plasmique est importante pour la chimiotaxie et la phagocytose. On observe une accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> dans le neutrophile stimulé au fMet-Leu-Phe<sup>74,75</sup>, qui est inhibée par la wortmannine, un inhibiteur des PI3Ks<sup>76</sup>. Une étude utilisant un domaine PH (pleckstrin homology), spécifique pour le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, couplé à une molécule fluorescente suggère qu'en présence de fMet-Leu-Phe, les phosphoinositides s'accumulent au front de migration dans les HL-60 différenciés en neutrophiles<sup>77</sup>. Des études avec des domaines PH suggèrent que le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> s'accumule principalement à la coupe phagocytaire lors de la phagocytose par les FcγRs<sup>78</sup>. En effet, la formation de la coupe phagocytaire serait accompagnée par l'accumulation de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (voir schéma 3)<sup>79</sup>. Ce même PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> serait ensuite transformé en diacylglycérol par la phospholipase C et en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> par une PI3K de classe I. Ce dernier disparaîtrait rapidement après la fusion des pseudopodes de la coupe phagocytaire. Finalement, il y aurait formation de PtdIns(3)P par une PI3K de classe III à la surface du phagosome.

Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> contrôle l'activation et/ou la localisation de plusieurs protéines, qui peuvent être recrutées via leur domaine PH. C'est le cas par exemple pour les kinases de la famille Tec (Bmx, Btk, Tec), les protéines adaptatrices DOS (daughter of sevenless) et Gab1 (GRB2-associated binding protein 1), des molécules d'échange GDP-GTP (guanine diphosphate-guanine triphosphate) comme ARNO (ADP-ribosylation factor nucleotide-binding-site opener), GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1) et cytohesine-3, certaines GTPases comme la centaurine α et GAP1 (GTPase activating protein 1) et la protéine kinase Akt<sup>80</sup>.

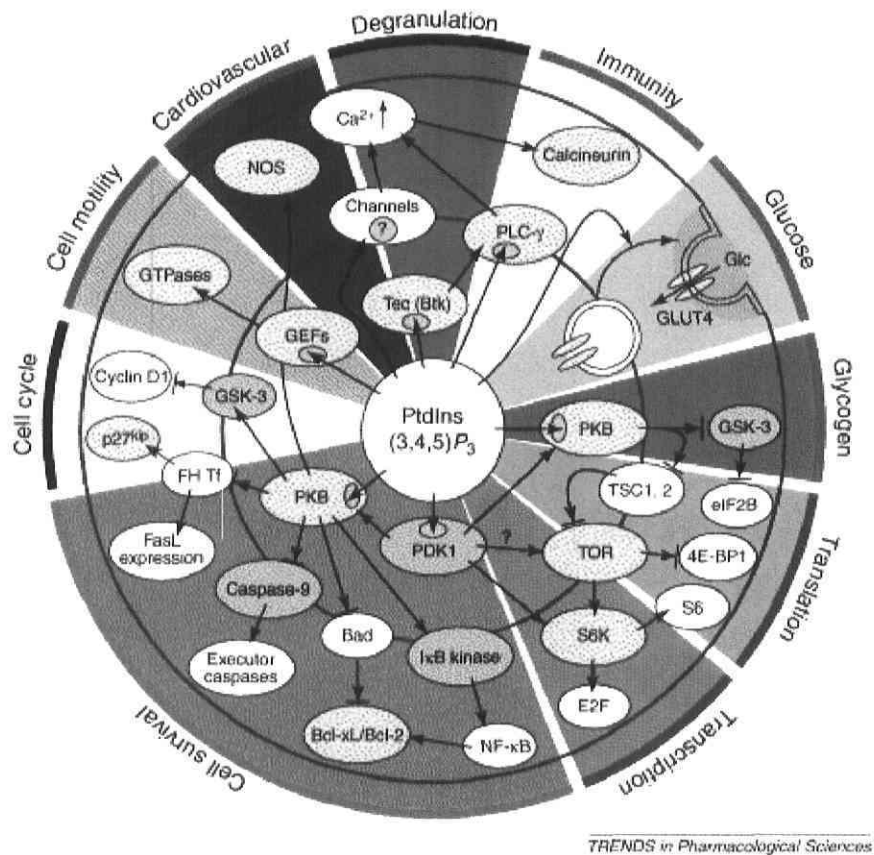


Schéma 2. Le rôle cellulaire du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Wymann, MP et al., Trends in Pharmacological Sciences, 24, 2003.

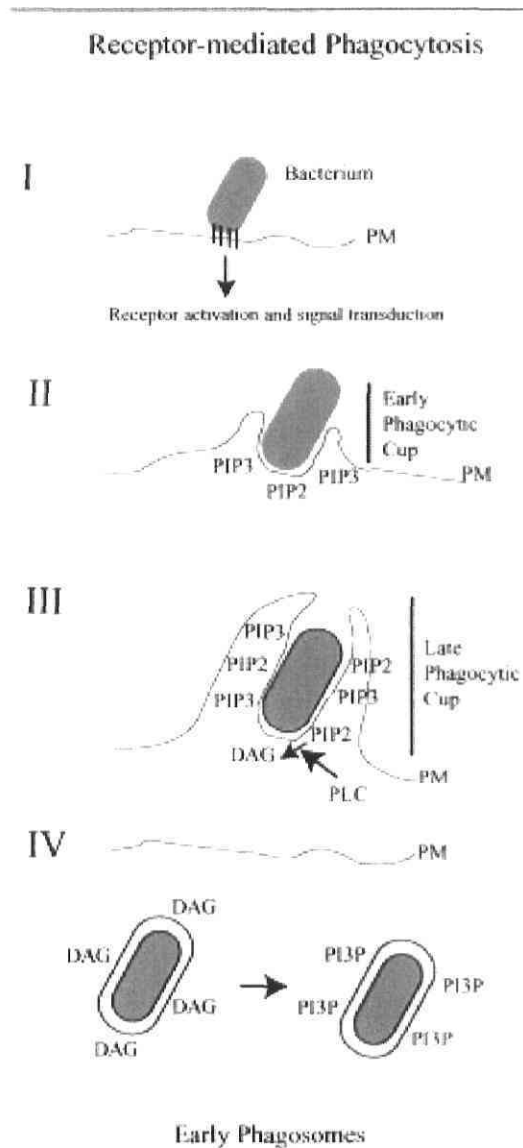


Schéma 3. Modèle suggéré pour le rôle des phosphatidylinositols dans l'initiation de la phagocytose et la maturation du phagosome. Brumell, JH et Grinstein, S, Cellular Microbiology, 5, 2003

### 1.2.4 Les phosphatidylinositols 3-kinases

Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est produit par les membres de la famille des PI3Ks. Les PI3Ks catalysent le transfert du  $\gamma$ -phosphate d'un groupe ATP à la position D3 d'un phosphoinositide. Elles peuvent phosphoryler le PtdIns, le PtdIns(4)P et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> pour former du PtdIns(3)P, du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> respectivement (voir schéma 4). Les produits des PI3Ks peuvent à leur tour être régulés par des 3-lipide phosphatases, comme par exemple PTEN, des 4-lipide phosphatases et des 5-lipide phosphatases, comme par exemple SHIP1.

La famille des PI3Ks est regroupée en trois groupes selon leur structure et leurs substrats: les classes I, II et III (voir schéma 5)<sup>81</sup>. Via leurs produits, elles contrôlent plusieurs fonctions cellulaires comme la prolifération et la survie cellulaire, le remodelage du cytosquelette, la chimiotaxie, la phagocytose, l'adhésion, la production de superoxide, le transport du glucose et le trafic intracellulaire<sup>80,82,83</sup>. Les nombreuses isoformes et leur redondance fonctionnelle rendent leur caractérisation difficile, même dans les modèles de souris knockout. Toutes les sous-unités catalytiques présentent trois régions d'homologie entre elles: un domaine HR1 (kinase domain), un domaine HR2 (PI kinase domain) et finalement, un domaine HR3 (C2 domain)<sup>80</sup>. Plusieurs membres possèdent également un domaine de liaison à la petite protéine G Ras (HR4 ou Ras binding domain). Il existe deux inhibiteurs couramment utilisés des PI3Ks, soit la wortmannine, un métabolite fongique, et le composé synthétique LY294002. Les deux substances inhibent toutes les classes de PI3Ks, étant tous deux des compétiteurs pour le site de liaison de l'ATP et s'y liant d'une manière irréversible<sup>80</sup>.

Les PI3Ks de classe I sont activées par des récepteurs situés à la surface de la cellule. Les protéines de la classe I comportent toutes une sous-unité adaptatrice de 50 à 100 kDa (kiloDaltons) et une sous-unité catalytique de 110 à 120 kDa qui sont liées avec une grande affinité. *In vitro*, les PI3Ks de la classe I peuvent utiliser comme substrat le PtdIns, le PtdIns(4)P et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub><sup>81</sup>. *In vivo*, leur substrat préféré est le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et elles seraient donc responsables de la production de la majorité du

PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub><sup>74</sup>. Certains membres ont également une activité protéine kinase. On les retrouve dans le cytosol des cellules au repos. Cette classe est divisée en deux sous-classes selon la structure et le mode d'activation: la classe IA et IB.

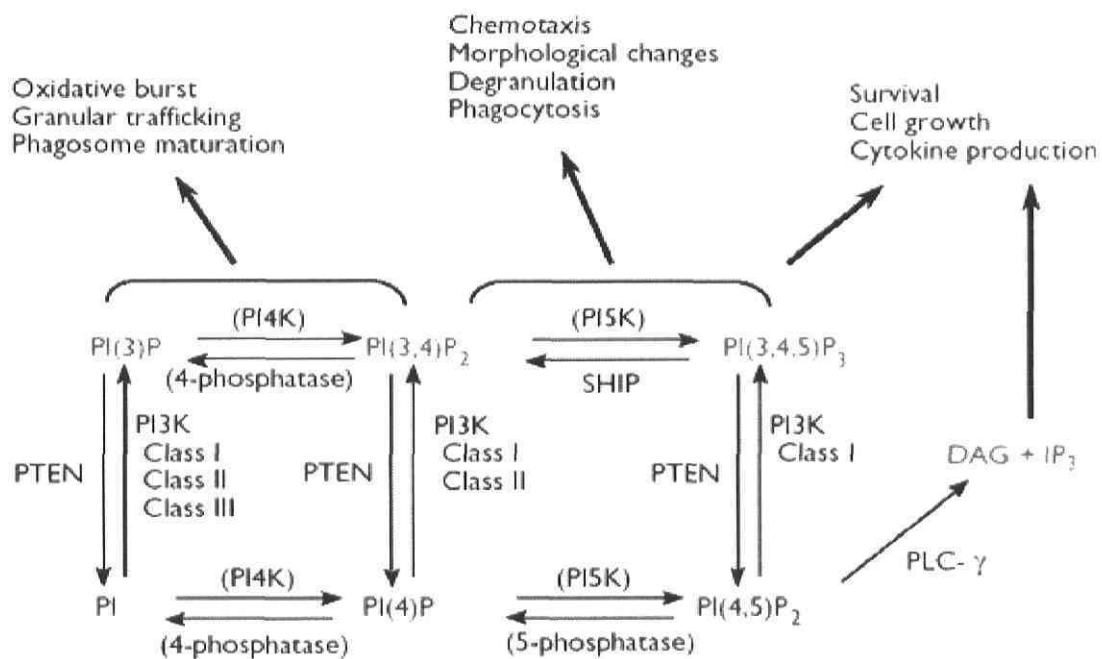


Schéma 4. La synthèse et la régulation des phosphatidylinositols. Les produits de la famille des PI3Ks sont en rouge. Les substrats des PI3Ks sont en bleu. Koyasu, S, Nature Immunology, 4, 2003.

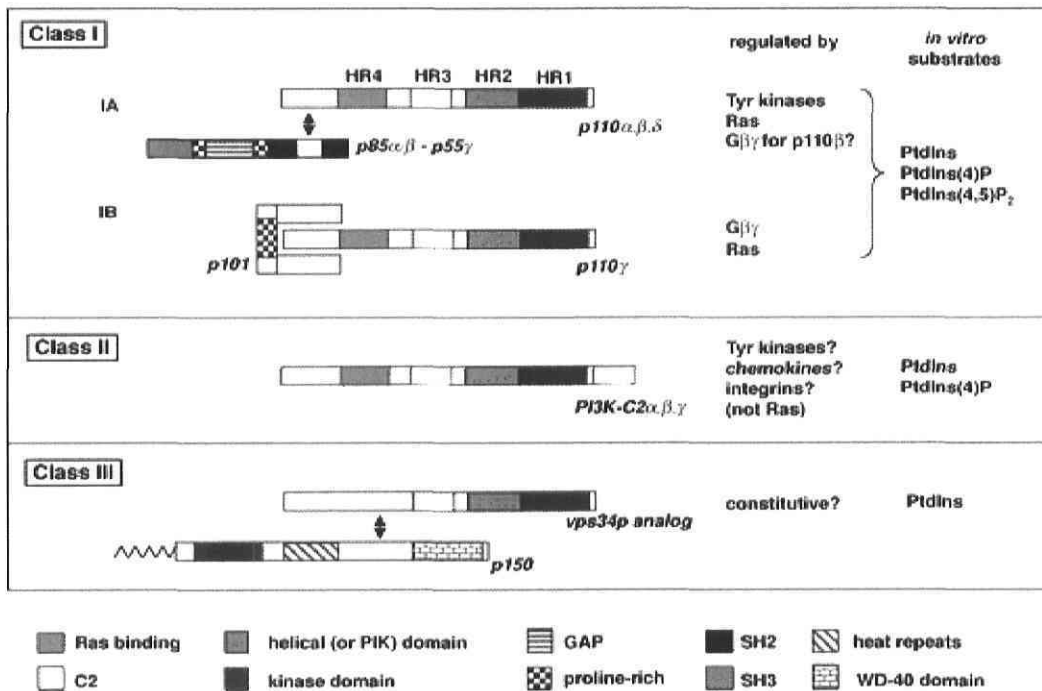


Schéma 5. Structure des PI3Ks de classe I, II et III et de leurs protéines adaptatrices respectives. Vanhaesebroeck, B et al., Ann. Rev. Biochem., 70, 2001.

La classe IA est constituée d'une sous-unité catalytique p110 (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  ou p110 $\delta$  qui sont codées par trois gènes différents). Ces sous-unités catalytiques sont constitutivement liées à une sous-unité régulatrice (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p85 $\gamma$ , qui après épissage alternatif, donne sept sous-unités régulatrices différentes)<sup>80</sup>. La sous-unité p85 possède un domaine SH3 (Src homology domain 3) dans sa région N-terminale, deux domaines riches en résidus proline et deux domaines SH2 (Src homology domain 2). C'est via la sous-unité régulatrice p85 que le complexe p85/p110 peut transloquer à la membrane plasmique où se trouve son substrat<sup>84</sup>. Via son domaine SH2, la p85 peut venir se lier aux résidus tyrosine phosphorylés d'un récepteur, comme par exemple le motif ITAM du CD32a<sup>72</sup>. Toujours via son domaine SH2, elle peut également interagir avec une ou plusieurs protéines adaptatrices phosphorylées. La liaison du complexe p85/p110 à Ras/GTP, Shc, Cbl, Lyn, Fyn, Abl et Lck<sup>82,85-88</sup> permettrait une translocation à la membrane plasmique et une activation de la sous-unité régulatrice p85. La phosphorylation de la p85 sur un résidu tyrosine activerait le complexe<sup>89</sup>.

Les souris knockout pour le gène de la p85 $\alpha$  meurent quelques jours après la naissance alors que celles knockout pour la p85 $\beta$  sont asymptomatiques (voir tableau 1)<sup>90</sup>. Les isoformes de la sous-unité catalytique p110 $\alpha$  et  $\beta$  sont largement exprimés chez les mammifères, tandis que l'isoforme  $\delta$  est retrouvé dans les cellules hématopoïétiques<sup>91</sup>. Les souris *p110 $\alpha$ -/-* et *p110 $\beta$ -/-* meurent avant la naissance (voir tableau 1)<sup>92</sup>. Les PI3Ks de la classe IA sont donc essentielles au bon fonctionnement de l'organisme.



Targeted gene	Locus	Immune phenotype
p85 $\alpha$ /p55 $\alpha$ /p50 $\alpha$ /p85 $\alpha$	5q13	Perinatal lethal Impaired B cell development and activation Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired Th2 responses to intestinal nematodes Overproduction of IL-12 from DCs, enhanced Th1 responses to <i>Leishmania major</i> infection
p85 $\beta$	19q13.2	No immune phenotype reported
p110 $\alpha$	3q26	Embryonic lethal
p110 $\beta$	3q23	Embryonic lethal
p110 $\delta$	1q36	Mice are viable, impaired T and B cell antigen receptor signalling, impaired B cell development and activation
p110 $\gamma$	7q22	Impaired T cell development and activation, impaired leukocyte chemotaxis, decreased oxidative burst, decreased thrombembolism, impaired inflammatory responses, improved heart function.
PTEN	2q36	Embryonic lethal, autoimmune disease, tumorigenesis, increased T cell activation and increased chemotaxis in heterozygote mice
SHIP-1	2q36	Myeloid infiltration into various organs, increased myeloid cell proliferation and survival, increased mast cell degranulation, increased B cell activation, increased chemotaxis

Tableau 1. Les phénotypes de souris knockout pour les PI3Ks de classe I, SHIP1 et PTEN. Ward, SG et Finan, P, Current Opinion in Pharmacology, 3, 2003.

La classe 1B comporte un seul membre, la p110 $\gamma$ , qui est activée suite à la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G, dont font partie tous les récepteurs de molécules chimiotactiques<sup>25,26</sup>. Sa molécule adaptatrice est la p101, qui présente un domaine riche en résidus proline<sup>93</sup> (voir schéma 5). La p110 $\gamma$  est retrouvée dans les leucocytes des mammifères seulement<sup>80</sup>. Ras pourrait se complexer avec la p110 $\gamma$  et l'activer allostériquement<sup>94</sup>. Les souris *p110 $\gamma$ -/-* sont fertiles et viables, mais leurs neutrophiles et macrophages ont une capacité de migration réduite dans des modèles inflammatoires *in vitro* et *in vivo*<sup>95,96</sup>.

La classe II est caractérisée par la présence d'un domaine C2 supplémentaire à l'extrémité C-terminale, domaine qui lui permettrait de se lier aux lipides membranaires d'une manière Ca<sup>2+</sup>-indépendante<sup>97</sup>. Ses membres ont un poids moléculaire apparent de 170-210 kDa. *In vitro*, leur substrat préféré est le PtdIns et avec moins d'affinité, le PtdIns(4)P. Les membres de la classe II ont tous un domaine PX (phox homology) dans leur extrémité C-terminale. On les retrouve constitutivement à la membrane plasmique<sup>98</sup>. Les mammifères expriment trois membres de la classe II: la PI3K-C2 $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  qui sont codées par trois gènes différents. La PI3K-C2 $\alpha$  et  $\beta$  sont largement exprimées tandis que la PI3K-C2 $\gamma$  est retrouvée principalement dans le foie<sup>80</sup>. Aucune protéine adaptatrice ne leur est associée<sup>82</sup>. L'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet-derived growth factor), l'insuline, la liaison aux intégrines et le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) peuvent activer cette classe de PI3Ks<sup>99-102</sup>.

Les protéines de la classe III sont des homologues de la protéine de levure Vps34p (vacuolar protein sorting mutant) et ont comme substrat le PtdIns *in vitro*. Elles produisent donc du PtdIns(3)P<sup>103</sup>. Comme la quantité de ce produit demeure constante dans les cellules, l'activation de cette classe serait indépendante de la stimulation cellulaire<sup>80</sup>. La protéine adaptatrice est la p150.

L'activation des PI3Ks à la membrane plasmique est importante pour le phénomène de phagocytose par les Fc $\gamma$ Rs. Dans le neutrophile humain, la stimulation du CD32a mène à l'activation et à la translocation à la membrane plasmique de la sous-unité p85 et donc, par extrapolation, à l'activation de la classe IA des PI3Ks<sup>63,72,104</sup>. En réponse

à la stimulation du CD32a, on observe également une activation de la kinase Akt, qui est activée par des produits des PI3Ks comme le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub><sup>105</sup>. Le rôle des PI3Ks a été bien étudié dans des modèles de macrophages et de lignées cellulaires<sup>106,107</sup>. L'implication des PI3Ks de la classe I et III dans les différentes étapes de la formation et de la maturation du phagosome a été suggérée dans les modèle de cellules COS transfectées avec le CD32a fusionné à la sous-unité de la p85 et dans les macrophages murins transfectés avec le CD32a<sup>108-110</sup>.

L'activation des PI3Ks est également importante pour la chimiotaxie. Dans le neutrophile, la classe IB (p110γ/p101) est impliquée dans la réponse aux agents chimioattractants comme le fMet-Leu-Phe<sup>75,95,96,111</sup>. Les neutrophiles murins *p110γ*<sup>-/-</sup> ont une capacité réduite de répondre à l'agent chimiotactique fMet-Leu-Phe<sup>112</sup>. Les PI3Ks sont donc importantes dans la phagocytose et la chimiotaxie.

### 1.3 La lipide phosphatase PTEN

La chimiotaxie et la phagocytose sont accompagnés d'une accumulation du second messager cellulaire PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> dans le neutrophile humain. Mais le mode de régulation des niveaux de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est peu caractérisé dans ce type cellulaire. Deux lipide phosphatases utilisent le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> comme substrat et pourraient donc réguler l'accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>: PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) et SHIP1 (Src homology-2 containing 5'-inositol phosphatase 1) (voir schéma 6). Ces deux protéines seront décrites en détails dans les sections suivantes.

#### 1.3.1 Fonctions et structure de PTEN

PTEN est également appelée MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers 1) ou TEP1 (TGFβ-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1). Cette protéine a été identifiée simultanément par plusieurs groupes qui, en étudiant une région fréquemment mutée sur le chromosome 10, ont découvert que cette région codait pour la protéine PTEN<sup>113-115</sup>. Comme ces mutations sur le chromosome 10, plus particulièrement dans la région 10q23, étaient retrouvées dans plusieurs types de tumeurs, ces groupes ont

supposé que PTEN pourrait être un anti-oncogène, ce qui s'est avéré être le cas. En effet, PTEN est fréquemment mutée dans les cancers du cerveau, du sein et de la prostate<sup>113</sup>. De plus, la maladie de Cowden et le syndrome Bannayan-Zonana, qui sont caractérisés par la prédisposition aux cancers, seraient causés par une mutation germinale de PTEN<sup>116,117</sup>.

PTEN est une protéine ubiquitaire d'environ 403 acides aminés. Son poids moléculaire apparent est de 55 kDa sur un gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)<sup>114</sup>. Elle possède un domaine phosphatase dans la partie N-terminale (résidus 1 à 185) (voir schéma 7). La région C-terminale contient un domaine C2 (résidus 186-351) qui lui permettrait de se lier aux phospholipides membranaires<sup>118,119</sup>, un domaine riche en proline, un motif PEST qui la rend sensible à la dégradation par le protéasome et un domaine PDZ qui lui permet de se lier aux protéines MAGI-2 et MAGI-3 (membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation 2 et 3)<sup>120-123</sup>. PTEN est essentielle pour le développement car les souris *pten*<sup>-/-</sup> meurent avant la naissance (voir tableau 1)<sup>124</sup>. De plus, les souris *pten*<sup>+/-</sup> ont une plus grande susceptibilité aux cancers<sup>124,125</sup>.

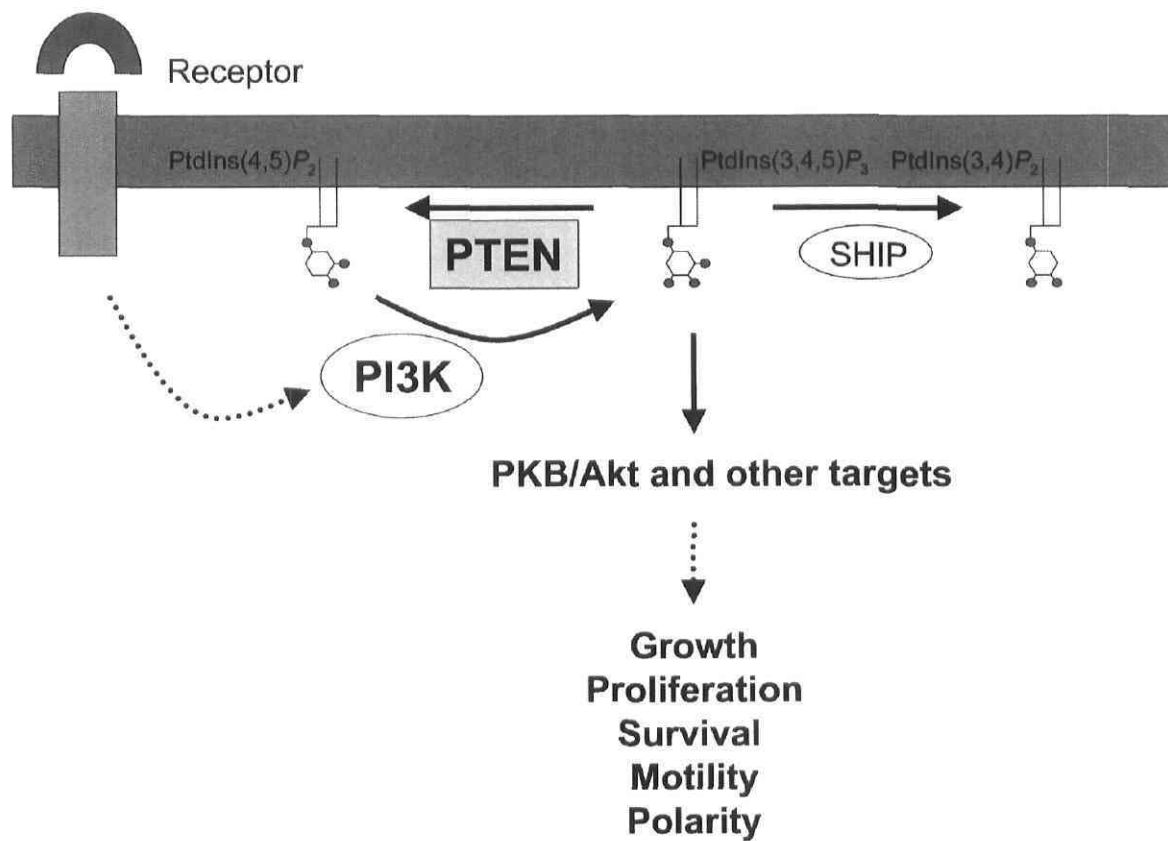


Schéma 6. La synthèse du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et sa régulation par les lipide phosphatases SHIP1 et PTEN. Leslie, NR and Downes, PC, Biochem J, 382, 2004.

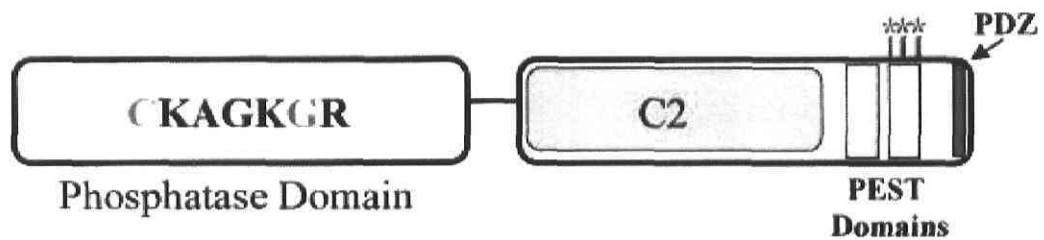


Schéma 7. Structure de la lipide phosphatase PTEN. Les astérisques représentent les sites de phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine. Waite, KA and Eng, C, Am. J. Hum. Genet., 70, 2002.

### 1.3.2 Activité phosphatase

PTEN contrôle négativement la voie des PI3Ks en déphosphorylant en position 3' le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> pour reformer un de leurs substrats, c'est-à-dire le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (voir schéma 6)<sup>126,127</sup>. PTEN et les PI3Ks forment donc une boucle de régulation. Par le fait même, PTEN contrôlerait toutes les voies en aval des PI3Ks, dont la kinase Akt<sup>128-130</sup>. En contrôlant les niveaux de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, PTEN contrôle Akt et la survie cellulaire, d'où son effet anti-oncogénique (voir schéma 8). En effet, l'activité lipide phosphatase sur le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> serait importante pour l'activité de suppresseur de tumeur<sup>127</sup>. *In vitro*, PTEN déphosphoryle aussi l'Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (inositol(1,3,4,5)tétraphosphate) en position 3', mais l'importance de cette fonction biologique n'est pas encore connue. En plus de son activité lipide phosphatase, PTEN possède une activité protéine phosphatase sur des résidus sérine, thréonine et tyrosine *in vitro*<sup>131</sup>. *In vivo*, elle a une activité protéine tyrosine phosphatase sur la protéine FAK (focal adhesion kinase), ce qui lui confère un rôle d'inhibiteur de l'adhésion, de la migration et de la motilité cellulaire<sup>132,133</sup>. L'inhibition de la phosphorylation de FAK pourrait donc être associée à son rôle d'anti-oncogène. PTEN déphosphoryle également les résidus tyrosine de la protéine adaptatrice Shc<sup>134,135</sup>, qui contrôle la voie des Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase), ce qui influencerait la motilité cellulaire et pourrait avoir un lien avec l'inhibition tumorale.

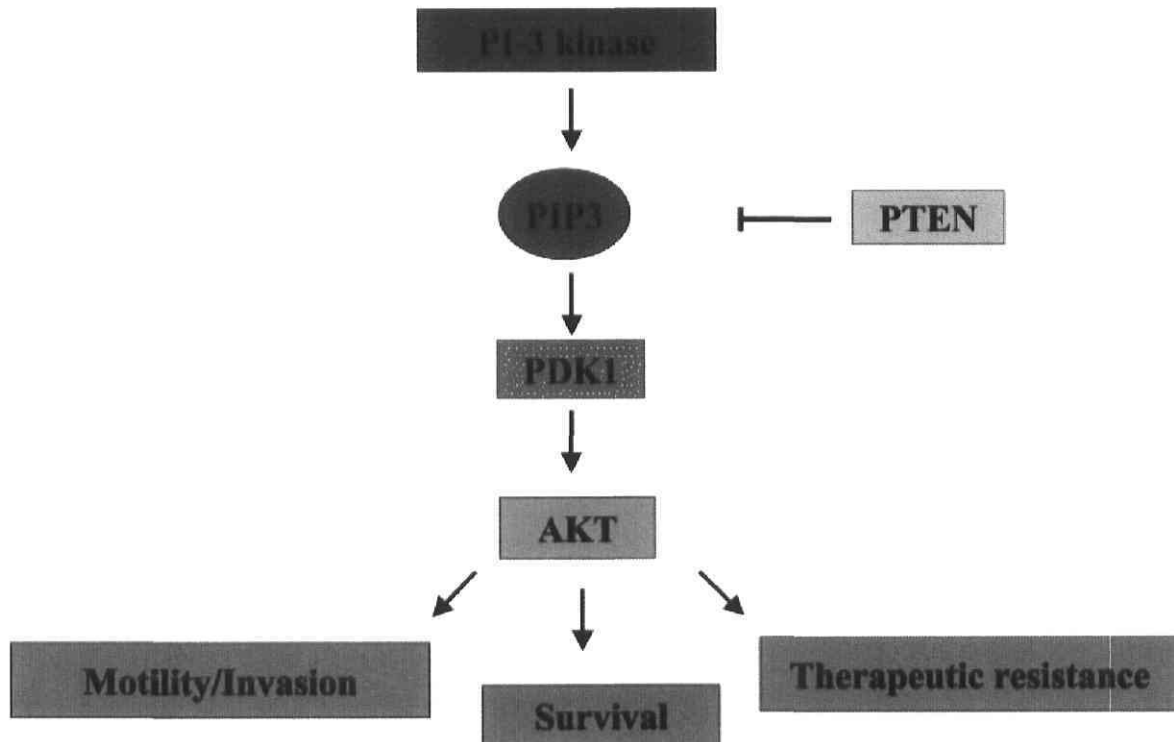


Schéma 8. L'effet anti-oncogénique de PTEN par son contrôle sur l'activation d'Akt.

Wu, X et al., *BJU International*, 93, 2004.



### 1.3.3 Régulation de l'activité de PTEN

Le mode de régulation de PTEN n'a pas encore été défini. Plusieurs hypothèses ont toutefois été émises. La phosphorylation des résidus sérine et thréonine du domaine C-terminal (sérine 370 et 385, thréonine 366) inhiberait l'activité lipide phosphatase<sup>130,136</sup>, la liaison aux phospholipides membranaires<sup>137</sup> et la stabilité de PTEN<sup>138</sup> (voir schéma 9). Dans le cytosol, PTEN serait phosphorylée et la queue C-terminale se replierait, rendant ainsi le domaine PDZ inaccessible. La kinase qui phosphorylerait les résidus sérine et thréonine serait CK2 (casein kinase 2)<sup>130,136,138</sup>. L'oxydation des résidus cystéine 71 et 124 de PTEN pourrait inhiber son activité phosphatase et inhiber certaines interactions protéiques<sup>139,140</sup>. La thioredoxine, qui est une protéine surexprimée dans plusieurs tumeurs, pourrait se lier à PTEN lorsque celle-ci est oxydée et réguler négativement PTEN, favorisant ainsi l'accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, donc la survie cellulaire<sup>139,141</sup>.

La déphosphorylation rendrait le domaine PDZ accessible pour l'interaction avec d'autres protéines, augmenterait l'affinité pour les phospholipides membranaires et augmenterait également la susceptibilité à la dégradation<sup>122,137</sup>. De plus, ces événements de phosphorylation seraient importants pour l'interaction de PTEN avec les protéines MAGI1, 2 et 3 que l'on retrouve dans les cellules épithéliales et qui pourraient contrôler positivement PTEN<sup>120-123</sup>. L'activation de PTEN pourrait également se faire via la liaison aux phospholipides membranaires PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique<sup>119,142</sup>.

PTEN est également phosphorylée sur des résidus tyrosine (tyrosine 240 et 315) par une kinase de la famille Src<sup>143,144</sup>. Cette phosphorylation diminuerait la stabilité de la protéine, modifierait l'activité lipide phosphatase positivement ou négativement selon les études publiées et serait indépendante de la phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine<sup>143,144</sup>.

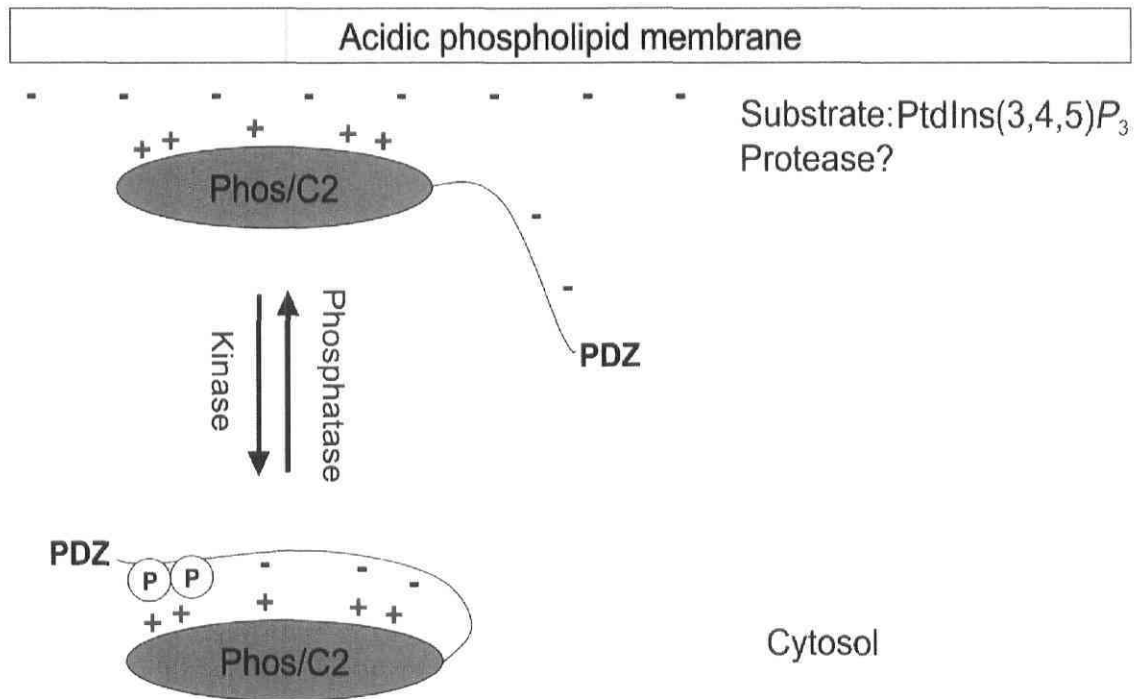


Schéma 9. Modèle suggéré pour la régulation de l'activité enzymatique de PTEN par la phosphorylation. Leslie, NR and Downes, PC, Biochem J, 382, 2004.

### 1.3.4 PTEN et récepteurs Fc

Peu de publications ont rapporté une implication de PTEN dans la signalisation des FcRs. Kim *et al.* ont remarqué que les cellules COS transfectées avec le CD32a montraient une diminution de phagocytose lorsque transfectées également avec PTEN<sup>145</sup>. Donc, dans ce modèle cellulaire, PTEN contrôlerait négativement la réponse du CD32a. Cao *et al.* ont observé que les macrophages de souris *pten*<sup>-/-</sup> phagocytent plus que ceux des souris *pten*<sup>+/+</sup><sup>146</sup>. PTEN aurait donc un rôle inhibiteur dans la phagocytose, probablement en diminuant ou en limitant l'accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>.

### 1.3.5 PTEN et chimiotaxie

Plusieurs études dans le neutrophile et l'amibe unicellulaire *Dictyostelium discoideum* suggèrent que PTEN joue un rôle dans la chimiotaxie. Lors de la chimiotaxie, le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> s'accumulerait au front de migration grâce à l'accumulation de PTEN à l'arrière de la cellule en mouvement (voir schéma 10). PTEN serait donc cytosolique dans les cellules au repos, mais s'accumulerait à l'arrière de la cellule activée par un agent chimiotactique dans les neutrophiles murins et dans *Dictyostelium discoideum*<sup>147-149</sup>. Ce modèle est toutefois controversé dans le neutrophile<sup>150</sup>.

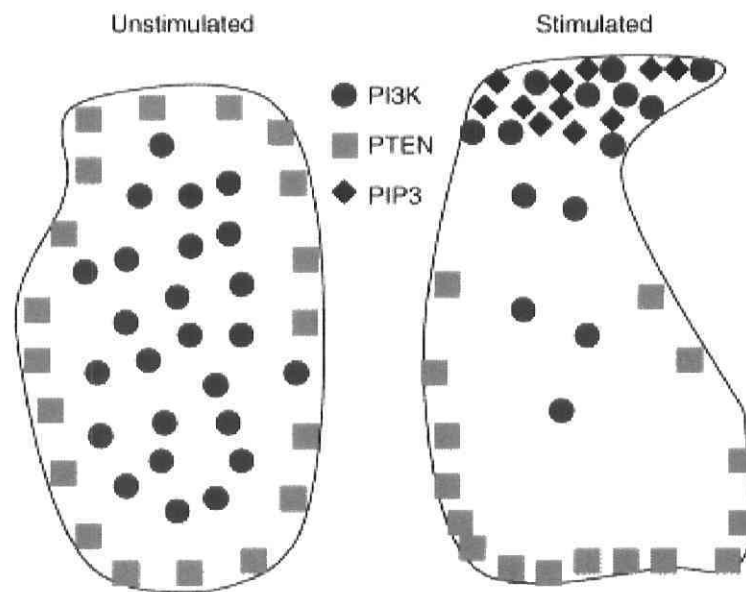


Schéma 10. Modèle suggéré pour l'implication du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et de PTEN dans la chimiotaxie. Sulis ML, Trends Cell Biol, 13, 2003.

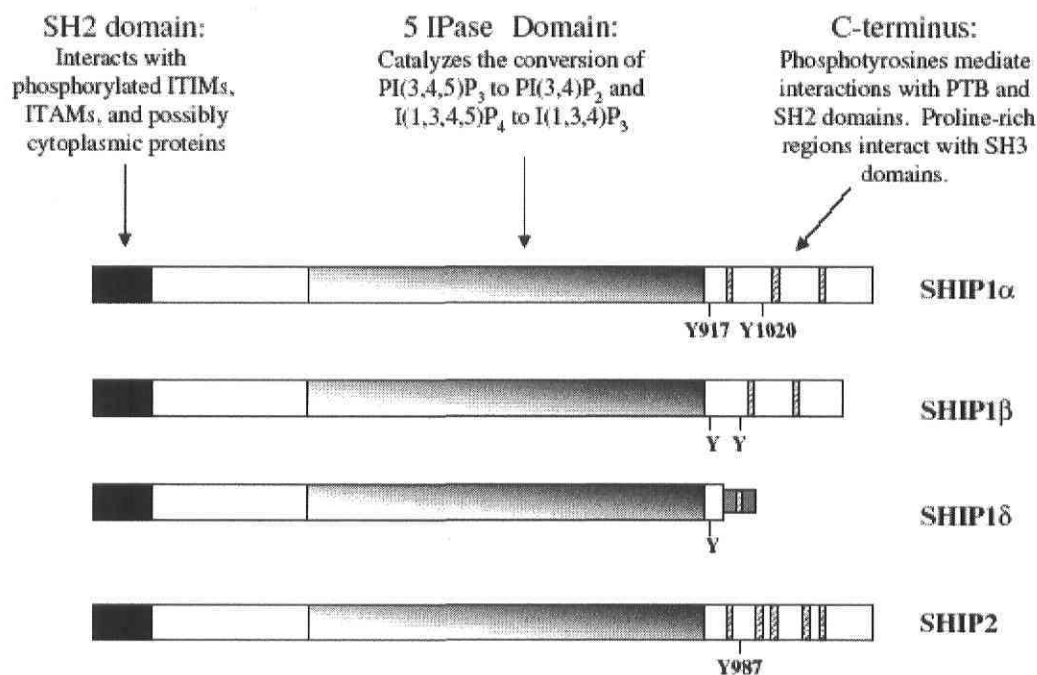
## 1.4 La lipide phosphatase SHIP1

Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> peut être régulé par PTEN, mais également par SHIP1. Contrairement à PTEN, cette lipide phosphatase déphosphoryle le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en position 5' pour former du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, qui n'est pas un substrat pour les PI3Ks. SHIP2 est une autre lipide phosphatase qui peut déphosphoryler le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en position 5' et qui sera traitée dans la section suivante.

### 1.4.1 Structure et fonctions de SHIP1

La protéine SHIP1 a été identifiée par trois groupes différents qui observaient la liaison d'une protéine de 145kDa avec la protéine adaptatrice Shc en réponse à l'érythropoïétine, l'IL-3, le Steel factor, la stimulation du BCR et du TCR ainsi qu'à certains facteurs de croissance comme le M-CSF (macrophage colony-stimulating factor)<sup>151-155</sup>. SHIP1, qui est également nommée SHIP1 $\alpha$ , possède 1190 acides aminés et un poids moléculaire apparent est d'environ 145 kDa sur un gel SDS-PAGE (voir schéma 11). Il existe plusieurs homologues de SHIP1 de poids moléculaire inférieur à 145kDa, nommés SHIP1 $\beta$  et SHIP1 $\delta$ , mais leur origine et fonction n'ont pas encore été déterminées<sup>153,156</sup> (voir schéma 11). Les acides aminés 1 à 100 représentent le domaine SH2, qui est important pour la liaison à des résidus tyrosine phosphorylés, comme les motifs ITIM et ITAM phosphorylés<sup>151,157</sup>. Les acides aminés 400 à 866 forment le domaine lipide phosphatase de SHIP1. Les derniers 300 acides aminés constituent le domaine C-terminal et contiennent deux résidus tyrosine qui peuvent être phosphorylés (tyrosine 917 et 1020). Lorsque phosphorylés, ces résidus sont des sites de liaison pour les domaines SH2 et PTB, pour la protéine adaptatrice Shc par exemple<sup>158</sup>. La queue C-terminale est riche en résidus proline qui interagissent avec les domaines SH3. SHIP1 est une protéine majoritairement exprimée dans les cellules hématopoïétiques<sup>151</sup>.

A



B

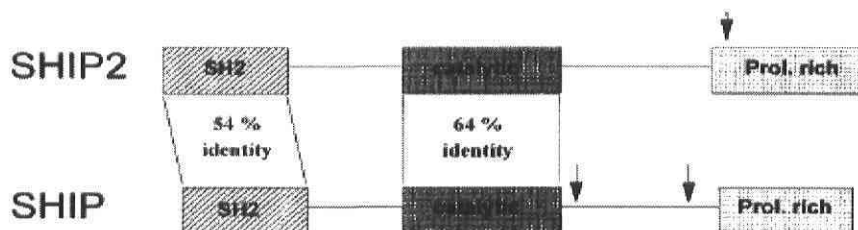


Schéma 11. Structure des lipides phosphatases SHIP1 et SHIP2. A: La structure de SHIP1, de ses homologues et de SHIP2. Les domaines ainsi que leurs interactions protéiques sont indiqués. March, ME et Ravichandran, K, *Seminars in Immunology*, 14, 2002. B: Le pourcentage d'homologie entre SHIP2 et SHIP(1). Les sites de phosphorylation sur des résidus tyrosine sont indiqués par des flèches. Pesesse X. et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 239, 1997.

### 1.4.2 Activité phosphatase de SHIP1

SHIP1 possède une activité 5'-lipide phosphatase et utilise comme substrat le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et l'Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub><sup>151-153</sup>. Tout comme PTEN, son activité sur le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> lui confère un rôle régulateur de la voie des PI3Ks, plus particulièrement sur les protéines comme Btk<sup>159</sup> et Akt<sup>160-162</sup>. Contrairement à PTEN, SHIP1 ne produit pas un substrat des PI3Ks, mais du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. Le domaine C-terminal serait important pour l'hydrolyse du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub><sup>163</sup>. Comme SHIP1 compétitionne avec Grb2 pour la liaison à Shc, elle pourrait également contribuer à la régulation négative de Ras<sup>154</sup>. La fonction biologique de SHIP1 semble être étroitement liée à la régulation de la survie des cellules myéloïdes. En effet, les souris knockout pour ce gène sont viables et fertiles mais souffrent d'hyperprolifération des cellules myéloïdes (voir tableau 1)<sup>164</sup>. La longévité de ces souris est donc plus courte car elles finissent par mourir d'infiltration pulmonaire de macrophages et neutrophiles. Les neutrophiles et les BMDCs (mast cells from the bone marrow) des souris *ship1*<sup>-/-</sup> sont moins sensibles aux stimuli apoptiques à cause de l'accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et de l'activation constitutive d'Akt dans ces cellules<sup>161</sup>. Gardai *et al.* ont proposé un modèle d'induction d'apoptose via l'inactivation d'Akt par SHIP1 dans les neutrophiles humains<sup>165</sup>.

### 1.4.3 Régulation de l'activité

SHIP1 est constitutivement active et sa localisation dans la cellule détermine son activité<sup>166</sup>. En réponse à la stimulation de plusieurs récepteurs, elle transloque à la membrane plasmique, où se trouve son substrat, via une protéine adaptatrice comme Shc ou via son domaine SH2<sup>157,167</sup>. Elle est ensuite phosphorylée sur des résidus tyrosine<sup>157,167</sup>. Cette séquence d'événements reste à être validée dans le neutrophile (voir article Chapitre II). La tyrosine kinase responsable n'a pas encore été identifiée mais Lck et Lyn sont deux candidats potentiels<sup>158,166</sup>. La phosphorylation sur des résidus tyrosine de SHIP1 est donc un indice de sa translocation à la membrane plasmique. La fonction de ces événements de phosphorylation n'est pas encore connue. En effet, *in vitro*, SHIP1 phosphorylée et SHIP1 non phosphorylée ont la même activité enzymatique<sup>152,166,168,169</sup>.

Plusieurs interactions protéiques avec SHIP1 ont été rapportées. En plus de la protéine adaptatrice Shc, elle peut se lier à la tyrosine phosphatase SHP2 (SH2-containing tyrosine phosphatase 2)<sup>170,171</sup>, à la sous-unité p85 de la PI3K<sup>172</sup>, à la protéine adaptatrice GAB1<sup>173</sup> et aux protéines DOK1 (docking protein 1) et CRKL (CRK like protein)<sup>174</sup>. Un complexe SHIP1/Shc/DOK1 a également été rapporté<sup>175,176</sup>. Donc, en plus de son rôle dans la régulation du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, SHIP1 pourrait être une protéine adaptatrice.

#### 1.4.4 SHIP1 et récepteurs Fc

Le rôle de SHIP1 dans la signalisation de plusieurs FcRs est bien établi. SHIP1, qui est plutôt une molécule inhibitrice, se lie pourtant aussi bien à des FcRs portant un motif inhibiteur ITIM qu'à ceux portant un motif activateur ITAM, ce qui est plutôt inhabituel. Par exemple, le récepteur CD32b (FcγRIIb), qui contient un motif ITIM et qui est exprimé par les lymphocytes B, les mastocytes et les macrophages<sup>56</sup>, recrute SHIP1, ce qui a pour effet d'inhiber l'activation du BCR et des FcRs dans ces cellules<sup>177,178</sup>. Dans le mastocyte, SHIP1 a la capacité de se lier à l'ITAM du FcεRI via sa chaîne γ et serait impliquée dans sa régulation négative<sup>179,180</sup>. En effet, les mastocytes dérivés de la moëlle osseuse de souris *ship1*<sup>-/-</sup> dégranulent plus facilement que ceux des souris *ship1*<sup>-/+</sup> ou *ship1*<sup>+/+</sup> en réponse à la stimulation du FcεR<sup>181</sup>. Le récepteur de haute affinité FcγRI aurait également la capacité de recruter SHIP1 via l'ITAM de la chaîne γ<sup>169</sup>. Donc autant les FcRs activateurs qu'inhibiteurs peuvent recruter SHIP1.

Des études dans des lignées de monocytes suggèrent un rôle de SHIP1 dans les voies de signalisation du CD32a. La stimulation du CD32a dans la lignée humaine de monocytes U937 induit la phosphorylation de SHIP1 sur des résidus tyrosine<sup>167</sup>. *In vitro*, SHIP1 peut lier un peptide correspondant au motif ITAM du CD32a et co-immunoprécipite avec la protéine adaptatrice Shc<sup>167</sup>. Dans la lignée humaine THP-1, SHIP1 co-immunoprécipite avec le CD32a lorsque celui-ci est stimulé<sup>157</sup>. De plus, la transfection de cellules COS-7 avec un dominant négatif de Shc empêche la phosphorylation de SHIP en réponse à la stimulation du CD32a, ce qui signifie que SHIP1 devrait se lier à Shc pour être phosphorylée<sup>157</sup>. Dans les COS-7 surexprimant le



domaine SH2 de SHIP1, on voit une diminution de la phosphorylation de SHIP1 en réponse à la stimulation du CD32a<sup>157</sup>. Donc, c'est via son domaine SH2 que SHIP1 pourrait être activée suite à la stimulation du CD32a (voir schéma 12).

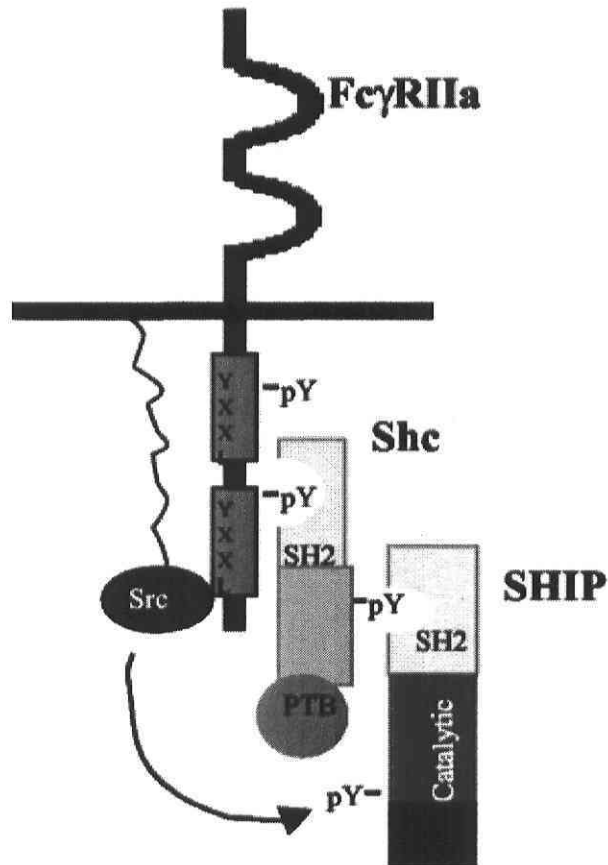


Schéma 12. Modèle suggéré pour l'implication de SHIP(1) en réponse à la stimulation du CD32a dans le macrophage. Le recrutement d'une Src kinase induirait la phosphorylation du motif ITAM, le recrutement et la phosphorylation de la protéine adaptatrice Shc et de SHIP1. Tridandapani, S, JI, 169, 2002.

### 1.4.5 SHIP1 dans la phagocytose et chimiotaxie

Cox *et al.* ont observé que les macrophages murins exprimant un dominant négatif de SHIP1 ont un taux de phagocytose plus élevé que les cellules sauvages<sup>107</sup>. De plus, les résultats obtenus par Nakamura *et al.* suggèrent que les macrophages de souris *ship1*<sup>-/-</sup> ont une capacité de phagocytose plus importante que les macrophages de souris sauvages<sup>182</sup>. Donc SHIP1 contrôlerait négativement la phagocytose dans les macrophages murins. SHIP1 est retrouvé à la coupe phagocytaire lors de la stimulation des FcγRs de macrophages murins, probablement à cause d'une accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> à cet endroit<sup>107</sup>. Peu d'études ont démontré un lien entre l'activation de SHIP1 et le phénomène de chimiotaxie. Les macrophages des souris *ship1*<sup>-/-</sup> montrent une chimiotaxie accrue en réponse à la chimiokine SDF-1 (stromal cell-derived factor-1)<sup>183</sup>. SHIP1 pourrait donc jouer un rôle inhibiteur dans les phénomènes de chimiotaxie et de phagocytose.

## 1.5 La lipide phosphatase SHIP2

SHIP2 est un homologue de SHIP1 et peut également utiliser le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> comme substrat pour former du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. Elle a une structure semblable à SHIP1 et un domaine lipide phosphatase conservé (voir schéma 11).

### 1.5.1 Structure et fonctions de SHIP2

La protéine SHIP2 a été identifiée par Pesesse *et al.* quelques années après SHIP1<sup>184</sup>. Mais Guilherme *et al.* avaient déjà remarqué l'activation d'une protéine ayant une activité 5'-phosphatase en réponse à l'insuline et qui était différente de SHIP1<sup>185</sup>. SHIP2 est une protéine de 1258 acides aminés d'un poids moléculaire apparent d'environ 160kDa sur gel SDS-PAGE. Sa structure lui confère une grande homologie avec SHIP2 (voir schéma 11). Les domaines SH2 et phosphatase sont conservés. La queue C-terminale contient seulement un résidu tyrosine qui peut être phosphorylé (tyrosine 987). Contrairement à SHIP1, elle est largement exprimée<sup>184,186</sup>.

Tout comme SHIP1, elle a une activité 5'-phosphatase sur l'Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> et sur le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub><sup>187</sup>, et peut donc contrôler négativement la voie des PI3Ks. Plusieurs études proposent un rôle régulateur dans la voie de l'insuline pour SHIP2<sup>185</sup>. En effet, les

souris knockout pour ce gène sont plus sensibles à l'insuline, ce qui résulte en une hypoglycémie sévère et une mort des nouveau-nés<sup>188</sup>. Marion *et al.* ont publié des résultats reliant des mutations du gène *SHIP2* au diabète de type II chez l'homme et le rat<sup>189</sup>. La surexpression de *SHIP2* dans les cellules CML (chronic myelogenous leukemia) inhibe leur prolifération, ce qui porte à croire que *SHIP2* pourrait également jouer un rôle inhibiteur dans la prolifération cellulaire<sup>190</sup>. Prasad *et al.* ont observé une phosphorylation de *SHIP2* en réponse à l'adhésion de cellules HeLa sur le collagène I, ce qui suggère un rôle de *SHIP2* dans le remodelage du cytosquelette dans ces cellules<sup>191</sup>.

### 1.5.2 Régulation de l'activité de SHIP2

Tout comme *SHIP1*, l'activité enzymatique de *SHIP2* ne serait pas modifiée par sa phosphorylation sur des résidus tyrosine, qui serait Src-dépendante<sup>191</sup>. Plusieurs facteurs de croissance peuvent induire une stimulation de *SHIP2*: l'EGF, le PDGF, le NGF (nerve growth factor), l'IGF1 (insulin-like growth factor 1) et l'insuline<sup>192</sup>. Comme *SHIP1*, elle aurait la capacité d'inactiver Akt, probablement en déphosphorylant le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub><sup>193</sup>. Elle s'associe également à la protéine adaptatrice Shc en réponse à certains facteurs de croissance, comme l'EGF, le NGF et le PDGF<sup>192</sup>.

### 1.5.3 SHIP2 et récepteurs Fc

L'implication de *SHIP2* dans la signalisation des FcRs est moins caractérisée que celle de *SHIP1*. Par contre, on sait qu'en réponse à la stimulation du BCR, elle peut aussi être recrutée par l'ITIM du CD32b, être phosphorylée sur des résidus tyrosine et s'associer à Shc<sup>194</sup>.

## 1.6 But de l'étude

Le neutrophile est une cellule dont les fonctions principales sont la chimiotaxie et la phagocytose. Ces deux phénomènes nécessitent l'activation de la famille des PI3Ks. Cette famille produit, entre autre, le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> qui est un second messager cellulaire lipidique. Lors de l'activation des récepteurs de chimiotaxie et de phagocytose dans le neutrophile humain, on observe une accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> dans la cellule. La wortmannine, un inhibiteur de PI3Ks, diminue significativement la capacité des

neutrophiles à répondre à une substance chimiotactique et à phagocyter. Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est donc important pour les fonctions principales du neutrophile.

La régulation du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est très peu caractérisée dans le neutrophile humain, la plupart des travaux étant réalisés dans les macrophages et des lignées cellulaires. Deux lipide phosphatases utilisent le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> comme substrat, soit SHIP1 et PTEN. SHIP1 est une 5'-phosphatase et produit du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. Elle est constitutivement active et cytosolique, et serait recrutée à la membrane plasmique pour avoir accès à son substrat, le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Elle serait phosphorylée à la membrane plasmique. Elle est exprimée dans les cellules myéloïdes. PTEN est une 3'-phosphatase et produit du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Elle serait inactive et phosphorylée dans le cytosol. Son mécanisme de régulation est inconnu, mais elle devrait transloquer à la membrane plasmique pour être activée. Elle est ubiquitaire.

La présente étude vise à caractériser les voies enzymatiques régulant les niveaux de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> dans le neutrophile humain. Le modèle utilisé est la stimulation du CD32a, un récepteur de portion Fc des immunoglobulines G qui permet la phagocytose. L'activation des lipide phosphatases SHIP1 et PTEN a été étudiée en réponse à la stimulation du CD32a. La caractérisation des voies signalétiques menant à leur implication a été approchée à l'aide d'inhibiteurs de Src kinases et de PI3Ks.

## **Chapitre II**

**The Src Homology 2-Containing Inositol 5-Phosphatase 1 (SHIP1) is  
Involved in CD32a Signaling in Human Neutrophils**

## 2.1 Résumé

Le phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate est important pour la chimiotaxie et la phagocytose. Ses mécanismes de régulation sont inconnus dans le neutrophile humain. Nous avons étudié le rôle de SHIP1 et PTEN, deux lipide phosphatases, dans la régulation du phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate. Lors de la stimulation du CD32a, on observe une accumulation de phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate, la phosphorylation sur des résidus tyrosine et la translocation à la membrane plasmique de SHIP1. La stimulation du CD32a n'influence pas la phosphorylation sur les résidus sérine/thréonine de PTEN et sa translocation à la membrane plasmique. Un inhibiteur de Src kinases inhibe la phosphorylation et la translocation à la membrane plasmique de SHIP1. Un inhibiteur de PI3Ks n'a pas d'effet sur ces deux indices d'activation. Nos résultats indiquent que SHIP1, mais pas PTEN, serait impliquée, d'une manière Src-dépendante, dans la régulation de l'accumulation du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en réponse à la stimulation du CD32a dans le neutrophile humain.

**The Src Homology 2-Containing Inositol 5-Phosphatase 1 (SHIP1) is involved in CD32a signaling in human neutrophils<sup>1</sup>**

Myriam Vaillancourt, Sylvain Levasseur, Marie-Lisane Tremblay, Emmanuelle Rollet-Labelle and Paul H. Naccache<sup>2\*</sup>

\*Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre de Recherche du CHUL and Department of Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Sainte-Foy, QC, Canada G1V 4G2.

Running title: SHIP1 involvement in CD32a signaling in human neutrophils

Key words: neutrophils, Fc receptors, phosphatase, lipid mediators



**ABSTRACT**

Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) plays important signaling roles in immune cells, particularly in the control of activating pathways and of survival. It is formed by a family of phosphatidylinositol 3'-kinases (PI3Ks) which phosphorylate PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> *in vivo*. In human neutrophils, the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> increase rapidly at the leading edge of locomoting cells and at the base of the phagocytic cup during FcγR-mediated particle ingestion. Even though these, and other, data indicate that PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> is involved in the control of chemotaxis and phagocytosis in human neutrophils, the mechanisms that regulate its levels have yet to be fully elucidated in these cells. We evaluated the role of SHIP1 and PTEN, two lipid phosphatases that utilize PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> as substrate, in the regulation of the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in response to CD32a cross-linking. We observed that the cross-linking of CD32a resulted in a transient accumulation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. CD32a cross-linking also induced the tyrosine phosphorylation of SHIP1 and its translocation to the plasma membrane. CD32a cross-linking had no effect on the level of serine/threonine phosphorylation of PTEN and did not stimulate its translocation to the plasma membrane. PP2, a Src inhibitor, inhibited the tyrosine phosphorylation of SHIP1 as well as its translocation to the plasma membrane. Wortmannin, a PI3K inhibitor, had no effect on either of these two indices of activation of SHIP1. Our results indicate that SHIP1, but not PTEN, is involved, in a Src kinase-dependent manner, in the regulation of the elevated levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> observed upon the cross-linking of CD32a in human neutrophils.

## INTRODUCTION

Neutrophils are important cells in the innate immune system that are quickly recruited to infected or injured sites where one of their major function is to dispose of cells and debris as well as invading microorganisms. The latter is accomplished through a phagocytic process that is greatly aided by opsonization by immunoglobulins. Human neutrophils express three receptors for the Fc domain of IgG (Fc $\gamma$ Rs)<sup>3</sup>: one interferon-inducible high-affinity receptor CD64 (or Fc $\gamma$ RI) and two constitutively expressed low-affinity receptors CD32a (or Fc $\gamma$ RIIa) and CD16b (or Fc $\gamma$ RIIIb) (1, 2). Resting neutrophils express only CD32a and CD16b.

CD32a is an activating receptor containing a non-canonical immuno-receptor tyrosine-based activation motif (ITAM) (3, 4). This monomeric receptor is expressed on human neutrophils, and on platelets (5), monocytes and macrophages (2). Since this receptor is only expressed in human, no mice knock out models are available. It has been demonstrated that when CD32a is cross-linked by an opsonized particle, its ITAM is phosphorylated by a Src kinase. The specific kinase(s) involved in the phosphorylation of CD32a in neutrophils remains to be unambiguously identified although it is likely that Hck and/or Fgr may be implicated in this process (6, 7). The phosphorylated ITAM then becomes a docking site for SH2-containing proteins like Syk (7). PI3K, via its p85 subunit, is also recruited to the phospho-ITAM where it gets activated (7-9). These events most likely underly the accumulation of phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) observed at the phagocytic cup (10). PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, predominantly formed by 3'-phosphorylation of phosphatidylinositol(4,5)biphosphate, is essential for the formation of the phagocytic cup (8, 11) and regulates PH domain-containing proteins including the Tec family of tyrosine kinases (Btk, Bmx, Tec) and the pro-survival protein Akt/PKB (12, 13).

The lipid phosphatases PTEN and SHIP1 are known to regulate the level of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. SHIP1 is a 5'-phosphatase that hydrolyses Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> and

PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (14-16). It has been implicated by several groups in the responses to the BCR, TCR, Steel factor, IL-3, erythropoietin and growth factors and was originally described as a 145kDa protein associated with Shc (14-17). This p145 protein was later identified as SHIP1. *In vitro* associations of SHIP1 with many proteins including SHP-2 (18, 19), Gab family members (20, 21), Shc/Grb2 (14, 16, 22, 23), p85 (24), DOK1/CRKL (25) and DOK3 (26) have been reported. Its role in negative regulation by FcγRIIb in B cells has been well-characterized (27-31). SHIP1 has also been shown to be implicated in the regulation of FcεRI on mastocytes (32, 33) and of CD32a on monocytic cell lines (34). PTEN is a 3'-phosphatase that hydrolyses PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> and Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (35, 36). PTEN is known as a regulator of the PI3Ks pathway (37). PTEN also possesses a tyrosine phosphatase activity that has been implicated in the regulation of FAK (38). It is widely expressed and well-known as a tumour suppressor, a role that is likely to be linked to its negative regulation of the pro-survival protein Akt/PKB (37).

In view of the critical role of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in the control of the phagocytic process, the present studies were initiated with the aim of obtaining direct evidence, in human neutrophils, about the mechanisms involved in the regulation of the levels of this intermediate. The results obtained indicate that SHIP1, but not PTEN, is responsible for regulating the increase of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> observed upon CD32a engagement. A Src kinase-dependent recruitment of SHIP1 to the plasma membrane appears to underlie its mechanism of action.

## MATERIALS AND METHODS

*Reagents* - CHAPS was purchased from Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, U.S.A.). PP2, PP3 and Pansorbin were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, U.S.A.). Sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), soybean trypsin inhibitor, PMSF, wortmannin and DMSO were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Dextran T-500, Percoll and Protein A-Sepharose were purchased from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada). Aprotinin and leupeptin were purchased from Boehringer (Burlington, ON, Canada). Western lightning chemiluminescence plus was obtained from Perkin Elmer (Boston, MA, U.S.A.). Ficoll-Paque and  $\text{Mg}^{2+}$ -free Hank's balanced salt solution were obtained from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). DFP was purchased from Helixx Technologies (Scarborough, ON, Canada). Gelatin was obtained from Fisher (Nepean, ON, Canada).

*Antibodies* - The anti-CD32a monoclonal antibody IV.3 was purified from ascites of mice inoculated with hybridoma HB 217 obtained from the ATCC (Manassas, VA, U.S.A.).  $\text{F(ab')}_2$  IV.3 fragments were prepared as previously described (39). Anti-SHIP1 and anti-PTEN monoclonal antibodies (catalog no. SC-8425 and SC-7974 respectively) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.). Anti-phosphoSHIP1 and anti-phosphoPTEN polyclonal antibodies (catalog no. 3941 and 9554 respectively) were obtained from Cell Signaling (Beverly, MA, U.S.A.). Anti-flotillin1 monoclonal antibody (catalog no. 610820) was purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada). Goat anti-mouse  $\text{F(ab')}_2$  (anti-Fc, catalog no. 115-006-071 or anti- $\text{F(ab')}_2$ , catalog no. 115-006-072) and horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit IgGs (catalog no. 711-035-152) were purchased from Jackson Immuno-research Laboratories (West Grove, PA, U.S.A.). Horseradish peroxidase-labeled sheep anti-mouse IgGs (catalog no. NXA931) were obtained from Amersham Biosciences. Monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (4G10) (catalog no. 05-321) was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY,

U.S.A.). Anti-actin antibody (catalog no. A4700) was obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

*Neutrophil purification* - Neutrophils were collected from healthy adult volunteers and sterilely isolated as previously described (40). They were resuspended in  $Mg^{2+}$ -free HBSS containing 1.6 mM of  $CaCl_2$ .

*CD32a cross-linking* - Freshly purified human neutrophils were resuspended in HBSS at  $4 \times 10^7$  cells/ml (except where indicated) and were pre-incubated with 1 mM DFP for ten minutes at room temperature. The cells were then incubated with antibody IV.3 (2  $\mu$ g/ml) for five minutes and goat anti-mouse  $F(ab')_2$  (anti-Fc) (40  $\mu$ g/ml) (or HBSS for negative controls) was used to cross-link CD32a for the times and temperature indicated in the legends of the figures and in *Materials and Methods*. Note that in Figures 3A, 3B and 5,  $F(ab')_2$  IV.3 fragment (2  $\mu$ g/ml) and goat anti-mouse  $F(ab')_2$  (anti- $F(ab')_2$ ), 40  $\mu$ g/ml were used in order to avoid the overlap between the IgG heavy chains and PTEN as well as non-specific  $Fc\gamma$  receptors cross-linking. Stimulations were stopped at the indicated times by transferring aliquots of the cell suspensions directly in the same volume of 2x boiling Laemmli's sample buffer [composition of 1x: 62.5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 8.5% (v/v) glycerol, 2.5 mM orthovanadate, 10 mM para-nitrophenylphosphate, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin and 0.025% bromophenol blue] and boiled for 7 minutes. Where indicated, cells were incubated with PP2 (10  $\mu$ M), PP3 (10  $\mu$ M) or wortmannin (200 nM) (or DMSO for negative controls) for ten minutes before the addition of antibody IV.3.

*Plasma membrane isolation* - Neutrophils were incubated with DFP and CD32a was cross-linked (or not) at room temperature. The stimulations were stopped by transferring the cells to an ice bath. The cells were then quickly centrifuged and resuspended in modified RLB [relaxation buffer: 100 mM KCL, 3 mM NaCl, 10 mM Hepes (pH 7.4), 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 250  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, 1 mM PMSF, 3 mM DPF]. The cells were sonicated on ice for 22 seconds at power level 1 in

a Branson Sonifier 450 sonicator and then centrifuged at 400g for two minutes. 900  $\mu$ l of these supernatants were applied on top of a two-step Percoll gradient composed of 1.4 ml of a 1.12 g/ml solution layered beneath 1.4 ml of a 1.05 g/ml solution, as previously described by Kjeldsen *et al.* (41). The Percoll gradients were centrifuged for 30 minutes at 37,000g at 4°C in a fixed-angle rotor (Beckman TLA100.4). The plasma membranes were found on top of the gradients, under clear cytosol fractions. An aliquot of the cytosol fractions was collected and boiled for seven minutes in sample buffer 2x. The plasma membranes were collected and centrifuged at 100,000g for 45 minutes at 4°C to remove Percoll. Plasma membranes form a visible disc above the Percoll pellet. They were collected, resuspended in RLB and boiled for three minutes in sample buffer 2x.

*PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> formation* - PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> formation was measured as described before (42). Briefly, neutrophils ( $5 \times 10^7$  cells/ml) were incubated with 0.5 mCi/ml of [<sup>32</sup>P]orthophosphate (Perkin-Elmer, Norwalk, CT; 1000 Ci/mmol) for 1 h at 37°C in HBSS without Ca<sup>2+</sup>. Unincorporated radioactivity was discarded by washing twice the cells in HBSS which were resuspended at  $2 \times 10^7$  cells/ml in HBSS with Ca<sup>2+</sup> and incubated with antibody IV.3 (2  $\mu$ g/ml) at 37°C for five minutes. CD32a was then cross-linked by the addition of goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> (anti-F(ab')<sub>2</sub>, 40  $\mu$ g/ml) for the indicated times. Reactions were stopped by transferring 100  $\mu$ l of solution into 100  $\mu$ l of chloroform-methanol-HCl (1/1/0.1, v/v/v) and rapid vortexing (15–30 s). The samples were centrifuged for 5 min at 13,000g and the organic phase (lower phase) was transferred into borosilicate tubes. Samples were applied to oxalate-treated silica gel 60 plates (Merck, Rahway, NJ, U.S.A.), which were developed in chloroform-acetone-methanol-acetic acid-H<sub>2</sub>O (80/30/26/24/14, v/v/v/v/v) for 3 h. The plates were dried, and the products were visualized by exposure of x-ray films at -80°C or with a bioimaging analyzer (FujiFilm BAS-1800).

*Pansorbin preparation* - Antibody IV.3 linked to Pansorbin was prepared as described before by Löfgren *et al.* (43). Briefly, Pansorbin (10% w/v) aliquots were centrifuged and resuspended in the same volume of a solution of antibody IV.3 (2 mg/ml pH 7.4). The particles were incubated one hour at 4°C with gentle agitation then washed twice with PBS

and resuspended in Na-borate buffer (0.2M, pH 9.0). The antibodies were linked to the Pansorbin particles by the addition of dimethylpimelimidate (20 mM) for 30 minutes with gentle agitation. The Pansorbin particles were washed in PBS and incubated with ethanolamine (0.2M, pH 8.0) at room temperature with gentle agitation. The Pansorbin particles were washed next in PBS and resuspended in PBS containing 0.01% merthiolate. Pansorbin was conserved at 4°C for no more than 24 hours. Freshly purified neutrophils ( $2 \times 10^7$  cells/ml) were stimulated by adding IV.3 paired to Pansorbin at a concentration of 100 particles/cell at 37°C. Stimulation was stopped at the indicated times as described above by direct transfer to boiling Laemmli's buffer.

*Immunoprecipitations* - Freshly purified human neutrophils ( $3 \times 10^7$  cells/ml) were incubated with DFP (1 mM) for ten minutes at room temperature. The cells were then incubated in the presence of antibody IV.3 and CD32a was cross-linked (or not) with goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> (anti-Fc) at room temperature for twenty seconds. The stimulations were stopped by transfer to an ice bath followed by a ten seconds spin in a microcentrifuge. The pellets were resuspended in cold lysis buffer [10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.6% CHAPS, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 250 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 3 mM DFP, 1 mM PMSF]. After 5 minutes on ice, the cells were centrifuged at 400g for two minutes at 4°C. The supernatants were incubated in the presence of the anti-SHIP1 antibody (1.6 µg) at 4°C with gentle rotation for two hours. Prewashed beads were then added and incubated with gentle agitation at 4°C for one hour. Beads were collected by 400g centrifugation and washed three times with lysis buffer. Laemmli's sample buffer was added next to the beads, which were boiled for 7 minutes. An additional immunoprecipitation round was carried out on the supernatants of the first immunoprecipitation, under the same conditions but for the half the time of the previous immunoprecipitation. The two immunoprecipitates were pooled together and analyzed by SDS-PAGE.

*Electrophoresis and immunoblotting* - Proteins were separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels, except for the kinetics, SHIP1 immunoprecipitation and 4G10 Pansorbin immunoblots which were all done on 7.5-20% gradient acrylamide gels. The proteins were

then transferred to PVDF membranes (Immobilon-P membranes, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). Blocking agents and antibodies were diluted in a TBS-Tween solution (25 mM Tris/HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween 20). 5% (w/v) blotto solution was used to block membranes before anti-flotillin1, anti-PTEN, anti-actin, anti-phosphoSHIP1 and anti-phosphoPTEN immunoblotting. 2% (w/v) gelatin solution was used to block membranes before anti-SHIP1 and 4G10 immunoblotting. Anti-PTEN antibody was diluted 1:500 and anti-actin antibody was diluted 1:1000 in 1% (w/v) blotto solution. Anti-SHIP1 antibody was diluted 1:500 in 2% (w/v) gelatin solution. Anti-phosphoPTEN and anti-phosphoSHIP1 antibodies were diluted 1:1000 in 5% (w/v) BSA solution. 4G10 was diluted 1:4000 and anti-flotillin1 antibody was diluted 1:1000 in TBS-Tween solution. Horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit IgGs and horseradish peroxidase-labeled sheep anti-mouse IgGs were diluted 1:20,000 in TBS-Tween solution. Chemiluminescence reagents were used to detect antibodies, with a maximal exposure time of 5 minutes. Restore Western Blot Stripping Buffer solution was used for 15 minutes at room temperature (Pierce (Brockville, ON, Canada)) to strip previously blotted membranes.



## RESULTS

### Formation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in response to cross-linking of CD32a

PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> is an important lipidic second messenger which, albeit often indirectly, has been implicated in many cellular responses such as survival, chemotaxis and phagocytosis in multiple cells including neutrophils. We therefore set out to investigate the regulation of the levels of this messenger and its implication in signaling after CD32a cross-linking in human neutrophils.

The formation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in response to CD32a cross-linking was first measured. Neutrophils were pre-labeled with <sup>32</sup>P and stimulated by cross-linking CD32a for varying times. The phospholipids were then extracted and analyzed by thin layer chromatography as described in *Materials and Methods*. The results from two separate cell preparations are shown in Figure 1A. Cross-linking of CD32a can be seen to induce time-dependent increases in the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> as well as of phosphatidic acid (as indicated by arrows). These data were quantified by densitometry and the average results of three experiments are presented in Figure 1B. Statistically significant increases in the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> were detectable within 15 seconds after cross-linking of CD32a while maximal levels were reached after 5 minutes following which a slow decline was observed. At its peak (300 seconds), the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> increased by about two folds. Incubation with antibody IV.3 alone did not induce an accumulation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (*data not shown*). These results indicate that cross-linking of CD32a results in an increase in the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in human neutrophils.

### SHIP1 and PTEN are present in human neutrophils

We then wanted to know which lipid phosphatases are involved in the regulation of the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> is formed by 3'-phosphorylation of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> by a PI3K. It can then be dephosphorylated by lipid phosphatases, at the position 3' by PTEN (35), or 5' position by SHIP1 (14). These lipid phosphatases are responsible for the stabilisation and decrease of the accumulation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> at the plasma membrane.

We first verified by immunoblotting which of these lipid phosphatases are expressed in human neutrophils. As shown in Figure 2, PTEN and SHIP1 are both present in human neutrophils. We did not observe any changes in the levels of expression of SHIP1 or PTEN following CD32a cross-linking (shown in Figure 3). These results indicate that either of SHIP1 or PTEN could be implicated in the regulation of the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> and in signaling through CD32a in human neutrophils.

### **CD32a cross-linking stimulates the phosphorylation of SHIP1 but not of PTEN**

It has been well documented that the tyrosine phosphorylation of SHIP1 correlates with its activation, although it does not increase its *in vitro* phosphatase activity (14, 44). PTEN, on the other hand, can be serine/threonine as well as tyrosine phosphorylated (45-47). Little is known, however, about PTEN activation, regulation and phosphorylation, although it has been proposed that its serine/threonine phosphorylation is involved (46, 47). We therefore examined the levels of SHIP1 and PTEN phosphorylation following CD32a cross-linking in human neutrophils. As shown in Figure 3A, upper row, cross-linking of CD32a led to a rapid and time-dependent increase in reactivity of an anti-phosphoSHIP1 antibody. The increase in tyrosine phosphorylation was evident as early as 30 seconds, lasted up to 120 seconds and then decreased back towards baseline by five minutes. It should be noted that some variability in the kinetics of dephosphorylation of SHIP1 was noted among individual experiments. The addition of F(ab')<sub>2</sub> IV.3 fragment alone (in the absence of cross-linking) did not result in detectable increases in SHIP1 phosphorylation (upper row, lanes 1-6). Immunoblots with anti-actin and anti-SHIP1 antibodies showed equal loading in all lanes (second and third row). As shown in Figure 3B, upper row, serine/threonine phosphorylation of PTEN was not modified in response to CD32a cross-linking. Reblotting with anti-PTEN and anti-actin antibodies showed equal loading. These results provide evidence that SHIP1 was activated in response to CD32a cross-linking.

To confirm the above observations obtained with the anti-phosphoSHIP1 polyclonal antibody, we immunoprecipitated SHIP1 and monitored its tyrosine phosphorylation with an anti-phosphotyrosine monoclonal antibody. As shown in Figure 3C, immunoprecipitated SHIP1 was tyrosine phosphorylated in response to CD32a cross-linking. Evidence for equal

loading of protein was derived from parallel immunoblotting with an anti-SHIP1 antibody. These data confirm the results obtained with the anti-phosphoSHIP1 antibody.

### **Antibody IV.3 linked to Pansorbin induced SHIP1 tyrosine phosphorylation**

We then confirmed the implication of SHIP1 in signaling through CD32a by presenting the antibody IV.3 coupled to killed *Staphylococcus aureus* particles (Pansorbin). Fc tail of antibody IV.3 interacts with high-affinity with bacterial protein A. This mode of presentation may be more physiologically relevant than generalized cross-linking as achieved with a secondary anti-F(ab')<sub>2</sub> antibody in that it mimics more closely the interaction between neutrophils and bacterial pathogens. Antibody IV.3 was thus linked to Pansorbin particles as described in *Materials and Methods*, and the cellular pattern of tyrosine phosphorylation as well as the levels of phosphoSHIP1 in neutrophils exposed to Pansorbin particles were then monitored. Preliminary experiments established the optimal cells/particles ratio (*data not shown*).

As shown in Figure 4, upper panel, antibody IV.3 linked to Pansorbin induced a time-dependent increase in the global tyrosine phosphorylation profile of human neutrophils. The maximum peak of tyrosine phosphorylation was observed at five minutes, and this was followed by a slow decline leaving diminished, although measurable, levels of phosphorylation even after 20 minutes of incubation with particles. Note that Pansorbin alone (in the absence of antibody IV.3) did not increase the profile of tyrosine phosphorylation (upper panel, lanes 1-5). The addition of Pansorbin linked to antibody IV.3, however, also increased the level of SHIP1 tyrosine phosphorylation as detected with the anti-phosphoSHIP1 antibody (middle row). The maximal phosphorylation of SHIP1 was observed at five minutes and was maintained for 20 minutes, which correlated with the maximal global tyrosine phosphorylation profile. Reblots with anti-SHIP1 antibody confirmed the equal loading of protein in all lanes. Thus, we observed tyrosine phosphorylation responses to antibody IV.3 linked to Pansorbin that were slower, longer-lasting and weaker (though still robust) than to cross-linked CD32a. These data further confirm that SHIP1 is tyrosine phosphorylated in response to CD32a engagement in human neutrophils.

### **CD32a cross-linking induces the translocation of SHIP1, but not of PTEN, to the plasma membrane**

It is thought that the localization of SHIP1 to the plasma membrane plays a critical role in the regulation of its physiological function (14, 15, 48). PTEN is also known to associate with phospholipids at the plasma membrane (49, 50). In light of these observations, we examined the translocation of SHIP1 and PTEN to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking in human neutrophils. Neutrophil plasma membranes derived from resting cells or from CD32a-stimulated cells were thus isolated as described in *Materials and Methods*. They were then immunoblotted with anti-SHIP1, anti-phosphoSHIP1, anti-PTEN and anti-flotillin1 antibodies. Flotillin1 is a plasma membrane marker (51, 52) that is not involved in CD32a signaling in human neutrophils (53). As shown in Figure 5A (lanes 1-4), little if any SHIP1, phosphoSHIP1 and PTEN were detectable in the plasma membranes derived from control cells. The addition of F(ab')<sub>2</sub> IV.3 fragment alone did not induce the translocation of SHIP1 and PTEN to the plasma membrane (*data not shown*). After CD32a cross-linking, we observed an increase in the levels of SHIP1 (first row, lanes 5-8) in the plasma membranes. This response was observed as early as 30 seconds after stimulation and was stable for at least 5 minutes. The appearance of SHIP1 at the plasma membrane correlated with its phosphorylation as determined by immunoblotting with anti-SHIP1 and anti-phosphoSHIP1 antibodies. The anti-flotillin1 immunoblot indicates that near equal amounts of membranes were loaded in each lane. In contrast to the observed stimulated movements of SHIP1, no translocation of PTEN was detectable following CD32a cross-linking (third row, lanes 5-8). These data provide additional evidence that SHIP1, but not PTEN, is involved in signaling through CD32a.

The stimulated movement of SHIP1 to the membrane is accompanied by a concomitant decrease in the amounts of SHIP1 in the cytosolic fraction of the cells (Figure 5B). The immunoblots with the anti-flotillin1 antibody indicate that little, if any, membrane material is present in the cytosolic fractions and that equal amounts of membranes were loaded in each lane. These data confirm that SHIP1 is recruited from the cytosol to plasma membrane after CD32a cross-linking.

### **PP2 inhibits the tyrosine phosphorylation and plasma membrane translocation of SHIP1 in response to CD32a cross-linking**

We next characterized the mechanisms responsible for the activation of SHIP1 following CD32a cross-linking. We first took advantage of the availability of PP2, a specific inhibitor of the Src tyrosine kinase family (54). It is generally agreed that when CD32a is cross-linked, one or more Src kinases (the nature of which remains to be rigorously identified) is rapidly recruited and phosphorylates the ITAM motif of CD32a (6, 7). These considerations led us to investigate whether the tyrosine phosphorylation and plasma membrane translocation of SHIP1 were similarly controlled by Src kinases.

To this end, neutrophils were preincubated with 10  $\mu$ M of PP2, 10  $\mu$ M of PP3 (an inactive analog of PP2) or with the appropriate concentration of diluent (DMSO) for ten minutes. The cells were then stimulated by cross-linking CD32a and processed for the monitoring of the level of SHIP1 tyrosine phosphorylation (Figure 6) and of the translocation of SHIP1 to the plasma membrane (Figure 7) as described in *Materials and Methods*.

As previously shown, CD32a induced the tyrosine phosphorylation of SHIP1, a response that was maximal at 30 seconds (first row, left column). The data illustrated in the middle column of the first row of Figure 6 show that PP2 inhibited the tyrosine phosphorylation of SHIP1 induced by CD32a cross-linking. This effect was not shared by PP3, the inactive analog of PP2. PP2, but not PP3, also inhibited the general increase in tyrosine phosphorylation induced by cross-linking of CD32a (*data not shown* and (55)). Immunoblots with an anti-actin antibody and reblots with the anti-SHIP1 antibody demonstrated equal loading (second and third rows). These results suggest that the tyrosine phosphorylation of SHIP1 is mediated by a (PP2-sensitive) Src kinase.

We then investigated the potential effects of PP2 on the stimulated translocation of SHIP1. As shown in Figure 7, the translocation of SHIP1 (first row) (and of phosphoSHIP1, second row) to the plasma membrane induced by CD32a cross-linking was inhibited by PP2, but not by PP3. Note also that the addition of antibody IV.3 alone did not induce the

translocation of SHIP1 and phosphoSHIP1 to the plasma membrane. Immunoblot with anti-flotillin1 antibody showed equal plasma membrane loading (third row). These results show that PP2 (presumably through its effect on Src kinases) inhibit the translocation of SHIP1 and of phosphoSHIP1 to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking in human neutrophils.

### **Wortmannin does not inhibit the phosphorylation of SHIP1 or its translocation to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking**

Finally, we investigated the potential role of the formation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (the preferred substrate of SHIP1) on the phosphorylation of SHIP1 and its translocation to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking. To this end, we used wortmannin, a PI3K inhibitor, which is known to inhibit the stimulated accumulation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (8).

As can be seen in Figure 8A, wortmannin did not inhibit the stimulation of the tyrosine phosphorylation of SHIP1 observed in response to CD32a cross-linking (first row). As shown above, the phosphorylation was observed as early as 15 seconds after cross-linking of CD32a, the maximum was reached at 30 seconds and the levels returned to baseline by 120 seconds. Near identical kinetics were observed in the wortmannin samples and the DMSO controls. Anti-actin immunoblots and anti-SHIP1 reblots showed equal protein loading in all lanes (second and third rows).

We then examined the effects of wortmannin on the translocation of SHIP1 to the plasma membrane. As shown in Figure 8B, wortmannin did not inhibit the translocation of SHIP1 to the plasma membrane (first row, lane 4), comparatively to a DMSO control (first row, lane 2). Anti-flotillin1 immunoblots showed equal plasma membrane loading (third row). The potency of the wortmannin samples utilized in these experiments was verified by looking at its inhibitory effects on the activation of the respiratory burst in response to fMet-Leu-Phe and CD32a cross-linking (*data not shown*). These results show that wortmannin does not inhibit the phosphorylation of SHIP1 or its translocation to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking.

## DISCUSSION

The ability of neutrophils to fulfill their critical roles in innate (and possibly also at the interface with acquired) immunity is critically dependent on their locomotory and phagocytic responses. These two cellular functions involve PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, the product of one or more PI3Ks. In the present study, we examined the implication of the two major lipid phosphatases, SHIP1 and PTEN, that are thought to provide the counterweight to PI3Ks and to be involved in the regulation of the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> formed upon cell stimulation. Our results provide multiple lines of evidence indicating that SHIP1, but not PTEN, is specifically called upon in a Src kinase-dependent manner subsequently to the engagement of CD32a in human neutrophils.

The formation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in chemoattractant-stimulated neutrophils has been well-documented (56-58). Evidence for the implication of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in response to engagement of Fcγ receptors has, on the other hand, been mostly indirect, *e.g.* accumulation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-sensitive PH domain-containing probes at the phagocytic cup detected by immunofluorescence (10) and recruitment and phosphorylation of the p85 subunit of PI3K (7). Our data indicate that cross-linking of CD32a leads to a rapid (detectable within 15 sec.), but self-limited formation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in human neutrophils. The accumulation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> reached a peak at 5 minutes and slowly decreased afterwards up to 15 minutes. Thus, the PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> response to cross-linking of CD32a is longer lasting than that observed in response to fMet-Leu-Phe or IL-8 (58). The identification of the specific PI3K involved was outside the scope of this study. However, in view of the dependence of the responses to CD32a engagement on tyrosine kinases, it is likely that one or more class 1A PI3Ks is involved.

In this study, we examined the potential involvement of two major lipid phosphatases, namely SHIP1 and PTEN, that have been shown in various other systems to be involved in the regulation of the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, in response to the signaling following CD32a engagement. We found that human neutrophils constitutively express

both lipid phosphatases. The most expressed SHIP1 isoform was p145 (16, 59). We did not detect other SHIP1 isoforms (p135 or p110) in human neutrophil. The expression of SHIP2 remains to be investigated. It is thought that the tyrosine phosphorylation level of SHIP1 does not directly influence its phosphatase activity (14, 15, 44, 48) which may be regulated more by its location in the cell rather than by its phosphorylation status (44, 48). Nevertheless, its phosphorylation may correlate with its activation possibly by influencing its interactions with protein partners. These considerations led us to look at the tyrosine phosphorylation as well as the plasma membrane translocation of SHIP1 in response to CD32a cross-linking in neutrophils. We found that SHIP1 is tyrosine phosphorylated and translocates to plasma membranes when CD32a is cross-linked. We also found a decrease of SHIP1 in the cytosol fraction upon CD32a cross-linking. These results provide direct evidence for the involvement of SHIP1 in the regulation of the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> following cross-linking of CD32a in neutrophils. Our results corroborate with previous observations indicating that SHIP1 is tyrosine phosphorylated in the responses of other Fc receptors such as ITIM-bearing FcγRIIb (28-31), ITAM-bearing FcεRI complex (32, 33) as well as CD32a in monocytes and monocytic cell lines (34, 60, 61). These data suggest an involvement of SHIP1 downstream these receptors. It should be noted that the membrane translocation of SHIP1 to the plasma membrane was not monitored in these studies. As we obtained the same results using the F(ab')<sub>2</sub> fragment, antibody IV.3 coupled to pansorbin by its Fc tails or the complete IV.3 antibody, which is specific for CD32a (34), our results most likely do not reflect non-specific Fc receptor cross-linking or the engagement of an inhibitory FcγR such as FcγRIIb (CD32b), but derive rather from CD32a cross-linking. Evidence for the tyrosine phosphorylation of SHIP1 was obtained using two experimentally independent detection methods (anti-phosphoSHIP1 immunoblots or anti-phosphotyrosine immunoblots of anti-SHIP1 immunoprecipitates) and two separate activation protocols (direct cross-linking of CD32a by antibodies or stimulation with antibody IV.3 linked to Pansorbin). The detection of similar responses under these various conditions adds weight to the physiological relevance of their occurrence.

We also looked at the potential involvement of PTEN. The mechanisms of regulation of the activity of PTEN remain unclear, but could involve serine/threonine



phosphorylation (46, 47, 49), oxidation (62, 63) and changes in its cellular localization (49, 50). We did not find any evidence for modifications in the phosphorylation level or the subcellular localization of PTEN after CD32a cross-linking in neutrophils. These results suggest that PTEN is not involved in the dephosphorylation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> following CD32a cross-linking in neutrophils, at least within the time frame examined. Our results contrast with those obtained in COS cells transfected with CD32a which indicated that PTEN could be a negative regulator of phagocytosis in these cells (64). The differences in the experimental systems may explain the discrepancies that underlie the need for direct investigation in primary cells. It is also noteworthy that the involvement of PTEN in the regulation of the locomotory behavior of neutrophils (deduced principally from studies carried out in *Dictyostelium discoideum* (65, 66)) has recently been questioned (67).

Having established that the engagement of CD32a led to the recruitment of SHIP1 in neutrophils, we attempted to delineate the signaling pathways involved in this response. To this end, we examined the effects of PP2, a Src kinase inhibitor, and wortmannin, which is a PI3K inhibitor, on the above two indices of SHIP1 activation. Our results indicate that PP2 inhibited SHIP1 tyrosine phosphorylation and plasma membrane translocation in response to CD32a cross-linking. These data suggest that phosphorylation events mediated by Src kinases are required for the recruitment to the plasma membrane of SHIP1 following CD32a cross-linking. Our results correlate with those obtained by Phee *et al.* who observed Src-dependent phosphorylation of SHIP1 in COS cells in response to Fc $\gamma$ RIIb activation (48). The exact nature of the phosphorylation step(s) involved in the recruitment of SHIP1 in response to CD32a cross-linking is presently unclear. Indirect evidence suggests that Shc may play a role in these events. Previous investigations have however also shown that SHIP1 and Shc can directly bind to the ITAM of CD32a when it is phosphorylated (34, 61). Furthermore, a dominant negative mutant of Shc inhibits the tyrosine phosphorylation of SHIP1 upon stimulation of CD32a in the human monocytic cell line THP-1 (61). Thus, Shc may act as a docking protein for SHIP1 although a direct binding of SHIP1 to the phosphorylated ITAM of CD32a cannot be excluded at present. The tyrosine phosphorylation of SHIP1 itself may also play a role in the fostering of protein association and possibly also in the stabilization of its translocation to the plasma membrane.

In sharp contrast to the inhibitory effects of PP2, wortmannin had no effect on the phosphorylation and plasma membrane translocation of SHIP1. These data indicate that the recruitment of SHIP1 occurs independently of, and through mechanisms parallel to those implicated in the formation of its substrate, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. These results are consistent with those obtained by Cameron and Allen with wortmannin and CD64 cross-linking (23). Because SHIP1 does not bear a PH domain (14), it appears that SHIP1 does not respond directly to PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> accumulation, but may link to other phosphorylated proteins or docking motifs via its SH2 and proline-rich domains. Note that the p85 subunit of PI3K itself could interact with SHIP1 (61). Our preliminary data indicate that CD32a cross-linking led to a wortmannin-insensitive translocation of p85 to the membranes (*data not shown*). The finding that the mobilization of SHIP1 was independent of the formation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> raises the possibility that SHIP1 may also subserve functions other than that of a lipid phosphatase (e.g., those of a docking protein).

In summary, we have provided evidence that SHIP1, in a Src-dependent manner is implicated in the regulation of the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in neutrophils stimulated through the engagement of CD32a. Although we cannot rigorously exclude a role for PTEN, the results obtained so far do not support its involvement in the responses to CD32a. Additional studies aimed at identifying the signaling components involved in the recruitment of SHIP1 as well as the examination of the involvement of SHIP1 during the phagocytic process (which is likely to simultaneously rely on multiple receptors (FcγR and others)) are warranted.

## REFERENCES

1. Looney, R. J., D. H. Ryan, K. Takahashi, H. B. Fleit, H. J. Cohen, G. N. Abraham, and C. L. Anderson. 1986. Identification of a second class of IgG Fc receptors on human neutrophils. A 40 kilodalton molecule also found on eosinophils. *J. Exp. Med.* 163: 826-836.
2. Anderson, C. L., L. Shen, D. M. Eicher, M. D. Wewers, and J. K. Gill. 1990. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J. Exp. Med.* 171: 1333-1345.
3. Cambier, J. C. 1995. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol. Today* 16: 110.
4. Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* 338: 383-384.
5. Chacko, G. W., J. T. Brandt, K. M. Coggeshall, and C. L. Anderson. 1996. Phosphoinositide 3-kinase and p72syk noncovalently associate with the low affinity Fc gamma receptor on human platelets through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif. Reconstitution with synthetic phosphopeptides. *J. Biol. Chem.* 271: 10775-10781.
6. Hamada, F., M. Aoki, T. Akiyama, and K. Toyoshima. 1993. Association of immunoglobulin G Fc receptor II with Src-like protein-tyrosine kinase Fgr in neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90: 6305-6309.
7. Ibarrola, I., P. J. Vossebeld, C. H. Homburg, M. Thelen, D. Roos, and A. J. Verhoeven. 1997. Influence of tyrosine phosphorylation on protein interaction with Fc gammaRIIa. *Biochim. Biophys. Acta* 1357: 348-358.
8. Ninomiya, N., K. Hazeki, Y. Fukui, T. Seya, T. Okada, O. Hazeki, and M. Ui. 1994. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 269: 22732-22737.
9. Vossebeld, P. J., C. H. Homburg, R. C. Schweizer, I. Ibarrola, J. Kessler, L. Koenderman, D. Roos, and A. J. Verhoeven. 1997. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase occurs upstream of Ca<sup>2+</sup>-signalling induced by Fc gamma receptor cross-linking in human neutrophils. *Biochem. J.* 323 ( Pt 1): 87-94.
10. 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: 1369-1380.
11. Cox, D., C. C. Tseng, G. Bjekic, and S. Greenberg. 1999. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 274: 1240-1247.
12. Chan, T. O., S. E. Rittenhouse, and P. N. Tsichlis. 1999. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 965-1014.
13. Klippel, A., W. M. Kavanaugh, D. Pot, and L. T. Williams. 1997. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol. Cell. Biol.* 17: 338-344.

14. Damen, J. E., L. Liu, P. Rosten, R. K. Humphries, A. B. Jefferson, P. W. Majerus, and G. Krystal. 1996. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1689-1693.
15. Lioubin, M. N., P. A. Algate, S. Tsai, K. Carlberg, A. Aebersold, and L. R. Rohrschneider. 1996. p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev.* 10: 1084-1095.
16. Kavanaugh, W. M., D. A. Pot, S. M. Chin, M. Deuter-Reinhard, A. B. Jefferson, F. A. Norris, F. R. Masiarz, L. S. Cousens, P. W. Majerus, and L. T. Williams. 1996. Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr. Biol.* 6: 438-445.
17. Liu, L., J. E. Damen, R. L. Cutler, and G. Krystal. 1994. Multiple cytokines stimulate the binding of a common 145-kilodalton protein to Shc at the Grb2 recognition site of Shc. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6926-6935.
18. Sattler, M., R. Salgia, G. Shrikhande, S. Verma, J. L. Choi, L. R. Rohrschneider, and J. D. Griffin. 1997. The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP and the protein tyrosine phosphatase SHP-2 form a complex in hematopoietic cells which can be regulated by BCR/ABL and growth factors. *Oncogene* 15: 2379-2384.
19. Liu, L., J. E. Damen, M. D. Ware, and G. Krystal. 1997. Interleukin-3 induces the association of the inositol 5-phosphatase SHIP with SHP2. *J. Biol. Chem.* 272: 10998-11001.
20. Lecoq-Lafon, C., F. Verdier, S. Fichelson, S. Chretien, S. Gisselbrecht, C. Lacombe, and P. Mayeux. 1999. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 93: 2578-2585.
21. Liu, Y., B. Jenkins, J. L. Shin, and L. R. Rohrschneider. 2001. Scaffolding protein Gab2 mediates differentiation signaling downstream of Fms receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3047-3056.
22. Lamkin, T. D., S. F. Walk, L. Liu, J. E. Damen, G. Krystal, and K. S. Ravichandran. 1997. Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol phosphatase (SHIP) in vivo requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. *J. Biol. Chem.* 272: 10396-10401.
23. Cameron, A. J., and J. M. Allen. 1999. The human high-affinity immunoglobulin G receptor activates SH2-containing inositol phosphatase (SHIP). *Immunology* 97: 641-647.
24. Gupta, N., A. M. Scharenberg, D. A. Fruman, L. C. Cantley, J. P. Kinet, and E. O. Long. 1999. The SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) recruits the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase during FcγRIIb1-mediated inhibition of B cell receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 274: 7489-7494.
25. Sattler, M., S. Verma, Y. B. Pride, R. Salgia, L. R. Rohrschneider, and J. D. Griffin. 2001. SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL. *J. Biol. Chem.* 276: 2451-2458.

26. Kashige, N., N. Carpino, and R. Kobayashi. 2000. Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 2093-2098.
27. Scharenberg, A. M., and J. P. Kinet. 1996. The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell* 87: 961-964.
28. Ono, M., S. Bolland, P. Tempst, and J. V. Ravetch. 1996. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 383: 263-266.
29. Tridandapani, S., T. Kelley, M. Pradhan, D. Cooney, L. B. Justement, and K. M. Coggeshall. 1997. Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4305-4311.
30. Gupta, N., A. M. Scharenberg, D. N. Burshtyn, N. Wagtmann, M. N. Lioubin, L. R. Rohrschneider, J. P. Kinet, and E. O. Long. 1997. Negative signaling pathways of the killer cell inhibitory receptor and Fc gamma RIIB1 require distinct phosphatases. *J. Exp. Med.* 186: 473-478.
31. Bruhns, P., F. Vely, O. Malbec, W. H. Fridman, E. Vivier, and M. Daeron. 2000. Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB. *J. Biol. Chem.* 275: 37357-37364.
32. Kimura, T., H. Sakamoto, E. Appella, and R. P. Siraganian. 1997. The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the tyrosine-phosphorylated beta subunit of the high affinity IgE receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 13991-13996.
33. Osborne, M. A., G. Zenner, M. Lubinus, X. Zhang, Z. Songyang, L. C. Cantley, P. Majerus, P. Burn, and J. P. Kochan. 1996. The inositol 5'-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. *J. Biol. Chem.* 271: 29271-29278.
34. Maresco, D. L., J. M. Osborne, D. Cooney, K. M. Coggeshall, and C. L. Anderson. 1999. The SH2-containing 5'-inositol phosphatase (SHIP) is tyrosine phosphorylated after Fc gamma receptor clustering in monocytes. *J. Immunol.* 162: 6458-6465.
35. Maehama, T., and J. E. Dixon. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 13375-13378.
36. Myers, M. P., I. Pass, I. H. Batty, J. Van der Kaay, J. P. Stolarov, B. A. Hemmings, M. H. Wigler, C. P. Downes, and N. K. Tonks. 1998. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95: 13513-13518.
37. Wu, X., K. Senechal, M. S. Neshat, Y. E. Whang, and C. L. Sawyers. 1998. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95: 15587-15591.
38. Tamura, M., J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons, and K. M. Yamada. 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280: 1614-1617.

39. Rollet-Labelle, E., C. Gilbert, and P. H. Naccache. 2000. Modulation of human neutrophil responses to CD32 cross-linking by serine/threonine phosphatase inhibitors: cross-talk between serine/threonine and tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.* 164: 1020-1028.
40. Rollet, E., A. C. Caon, C. J. Roberge, N. W. Liao, S. E. Malawista, S. R. McColl, and P. H. Naccache. 1994. Tyrosine phosphorylation in activated human neutrophils. Comparison of the effects of different classes of agonists and identification of the signaling pathways involved. *J. Immunol.* 153: 353-363.
41. Kjeldsen, L., H. Sengelov, and N. Borregaard. 1999. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients. *J. Immunol. Methods* 232: 131-143.
42. Gilbert, C., S. Levasseur, P. Desaulniers, A. A. Dusseault, N. Thibault, S. G. Bourgoin, and P. H. Naccache. 2003. Chemotactic factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils. II. Effects of LFM-A13, a specific Btk inhibitor. *J. Immunol.* 170: 5235-5243.
43. Lofgren, R., L. Serrander, M. Forsberg, A. Wilsson, A. Wasteson, and O. Stendahl. 1999. CR3, FcγRIIA and FcγRIIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca<sup>2+</sup>, phospholipase D and tyrosine phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1452: 46-59.
44. Giuriato, S., B. Payrastre, A. L. Drayer, M. Plantavid, R. Woscholski, P. Parker, C. Erneux, and H. Chap. 1997. Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 272: 26857-26863.
45. Lu, Y., Q. Yu, J. H. Liu, J. Zhang, H. Wang, D. Koul, J. S. McMurray, X. Fang, W. K. Yung, K. A. Siminovitch, and G. B. Mills. 2003. Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J. Biol. Chem.* 278: 40057-40066.
46. Vazquez, F., S. Ramaswamy, N. Nakamura, and W. R. Sellers. 2000. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol. Cell Biol.* 20: 5010-5018.
47. Vazquez, F., S. R. Grossman, Y. Takahashi, M. V. Rokas, N. Nakamura, and W. R. Sellers. 2001. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J. Biol. Chem.* 276: 48627-48630.
48. Phee, H., A. Jacob, and K. M. Coggeshall. 2000. Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J. Biol. Chem.* 275: 19090-19097.
49. Das, S., J. E. Dixon, and W. Cho. 2003. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100: 7491-7496.
50. McConnachie, G., I. Pass, S. M. Walker, and C. P. Downes. 2003. Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochem. J.* 371: 947-955.
51. Shao, D., A. W. Segal, and L. V. Dekker. 2003. Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett.* 550: 101-106.
52. Slaughter, N., I. Laux, X. Tu, J. Whitelegge, X. Zhu, R. Effros, P. Bickel, and A. Nel. 2003. The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation. *Clin. Immunol.* 108: 138-151.

53. Rollet-Labelle, E., S. Marois, K. Barbeau, S. E. Malawista, and P. H. Naccache. 2004. Recruitment of the cross-linked opsonic receptor CD32A (Fc $\gamma$ R1IA) to high-density detergent-resistant membrane domains in human neutrophils. *Biochem. J.* 381: 919-928.
54. Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok, and P. A. Connelly. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271: 695-701.
55. Barabe, F., E. Rollet-Labelle, C. Gilbert, M. J. Fernandes, S. N. Naccache, and P. H. Naccache. 2002. Early events in the activation of Fc  $\gamma$  R1IA in human neutrophils: stimulated insolubilization, translocation to detergent-resistant domains, and degradation of Fc  $\gamma$  R1IA. *J. Immunol.* 168: 4042-4049.
56. Stephens, L. R., K. T. Hughes, and R. F. Irvine. 1991. Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 351: 33-39.
57. Traynor-Kaplan, A. E., B. L. Thompson, A. L. Harris, P. Taylor, G. M. Omann, and L. A. Sklar. 1989. Transient increase in phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during activation of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264: 15668-15673.
58. Naccache, P. H., S. Levasseur, G. Lachance, S. Chakravarti, S. G. Bourgoin, and S. R. McColl. 2000. Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* 275: 23636-23641.
59. Damen, J. E., L. Liu, M. D. Ware, M. Ermolaeva, P. W. Majerus, and G. Krystal. 1998. Multiple forms of the SH2-containing inositol phosphatase, SHIP, are generated by C-terminal truncation. *Blood* 92: 1199-1205.
60. Nakamura, K., A. Malykhin, and K. M. Coggeshall. 2002. The Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase negatively regulates Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis through immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing phagocytic receptors. *Blood* 100: 3374-3382.
61. Tridandapani, S., Y. Wang, C. B. Marsh, and C. L. Anderson. 2002. Src homology 2 domain-containing inositol polyphosphate phosphatase regulates NF- $\kappa$ B-mediated gene transcription by phagocytic Fc  $\gamma$  R $s$  in human myeloid cells. *J. Immunol.* 169: 4370-4378.
62. Lee, S. R., K. S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong, and S. G. Rhee. 2002. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 277: 20336-20342.
63. Leslie, N. R., D. Bennett, Y. E. Lindsay, H. Stewart, A. Gray, and C. P. Downes. 2003. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *Embo J.* 22: 5501-5510.
64. Kim, J. S., X. Peng, P. K. De, R. L. Geahlen, and D. L. Durden. 2002. PTEN controls immunoreceptor (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) signaling and the activation of Rac. *Blood* 99: 694-697.
65. Iijima, M., and P. Devreotes. 2002. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* 109: 599-610.

66. Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R. A. Firtel. 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 109: 611-623.
67. Lacalle, R. A., C. Gomez-Mouton, D. F. Barber, S. Jimenez-Baranda, E. Mira, A. C. Martinez, A. C. Carrera, and S. Manes. 2004. PTEN regulates motility but not directionality during leukocyte chemotaxis. *J. Cell. Sci.* 117: 6207-6215.



## FOOTNOTES

<sup>1</sup>Supported in part by grants from the Canadian Institutes for Health Research and the Arthritis Society of Canada. PHN is the recipient of the Canada Research Chair on the Physiopathology of the Neutrophil.

<sup>2</sup>Corresponding author: Dr Paul H. Naccache, Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie du CHUL, Room T1-49, 2705, Boulevard Laurier, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2, Phone : 418-656-4141-46142, Fax : 418-654-2705, E-mail: [Paul.Naccache@crchul.ulaval.ca](mailto:Paul.Naccache@crchul.ulaval.ca)

<sup>3</sup>Abbreviations used: CD16b, Fc $\gamma$ RIIIb; CD32a, Fc $\gamma$ RIIa; DFP, diisopropylfluorophosphate; Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$  receptor; PP2, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7(t-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine; PP3, 4-amino-1-phenylpyrazol[3,4-*d*]pyrimidine; PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate; PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; RLB, relaxation buffer

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Cross-linking of CD32a leads to the accumulation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in human neutrophils.**

Following <sup>32</sup>P labeling and CD32a cross-linking, the levels of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> were measured as described in *Materials and Methods*. A: TLC plate of two independent experiments where radiolabeled PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> and phosphatidic acid are indicated by arrows. Stimulations were stopped at the indicated times. B: Average of densitometric values of radiolabeled PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. This graphic represents three independent experiments (mean ± SD).

### **Figure 2: SHIP1 and PTEN are present in human neutrophils.**

An aliquot of the neutrophil suspension (4x10<sup>7</sup> cells/ml) was transferred in the same volume of 2x boiling Laemmli's sample buffer. Immunoblotting with anti-SHIP1 and anti-PTEN antibodies was performed as described in *Materials and Methods*. SHIP1 and PTEN are indicated by arrows. This result is representative of three independent experiments.

### **Figure 3: SHIP1, but not PTEN, is phosphorylated in response to CD32a cross-linking in human neutrophils.**

CD32a was cross-linked (or not) at 37°C as described in *Materials and Methods*. Stimulation was stopped at the indicated times. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membrane which were then immunoblotted with anti-phosphoSHIP1, anti-SHIP1 and anti-actin antibodies (panel A) or with anti-phosphoPTEN, anti-PTEN and anti-actin antibodies (panel B). These results are representative of three independent experiments. C: CD32a was cross-linked and SHIP1 was then immunoprecipitated as described in *Materials and Methods*. Following SDS-PAGE, the proteins were transferred to duplicate PVDF membranes which were then immunoblotted in parallel with anti-SHIP1 or anti-phosphotyrosine antibodies. These results are representative of three independent experiments.

**Figure 4: Antibody IV.3 linked to Pansorbin induces SHIP1 tyrosine phosphorylation in human neutrophils.**

Neutrophils were exposed to antibody IV.3 linked to Pansorbin for the indicated times. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to separate PVDF membranes which were then immunoblotted with anti-phosphotyrosine or anti-phosphoSHIP1 antibodies. The latter was next stripped and reblotted with anti-SHIP1 antibody. These results are representative of two independent experiments.

**Figure 5: SHIP1 but not PTEN translocates to the plasma membrane of human neutrophils in response to CD32a cross-linking.**

A: CD32a was cross-linked for the times indicated and plasma membranes were isolated as described in *Materials and Methods*. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membranes. Membrane was immunoblotted with anti-SHIP1 and anti-flotillin1 antibodies or anti-PTEN and anti-phosphoSHIP1 antibodies. As an immunoblot control, whole cells were also monitored. These results are representative of four independent experiments. B: Aliquots of the membrane fractions (Mb) of the 300 seconds samples of panel A were analyzed beside aliquots of the cytosol fractions (Cyt) of the same samples. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to a PVDF membrane and were immunoblotted with anti-SHIP1 and anti-flotillin1 antibodies. These results are representative of two independent experiments.

**Figure 6: PP2 inhibits the tyrosine phosphorylation of SHIP1 observed in response to CD32a cross-linking.**

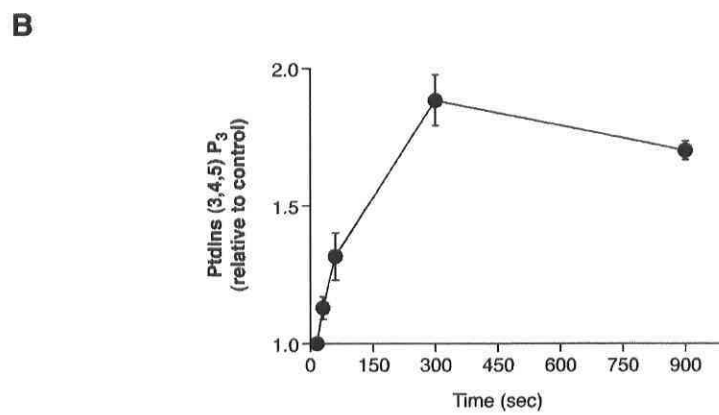
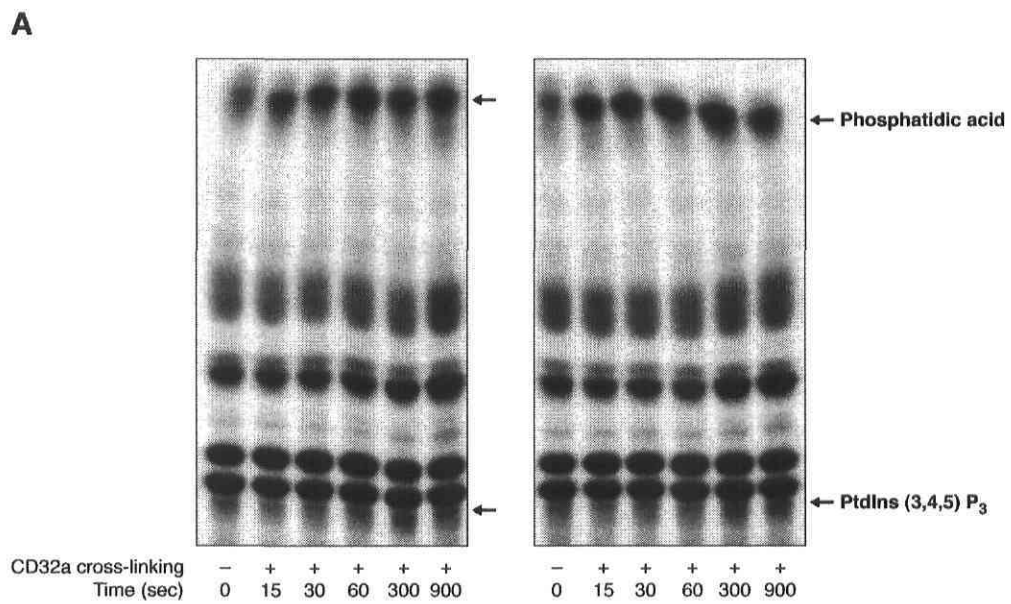
Neutrophils were resuspended in HBSS at  $3 \times 10^7$  cells/ml and incubated with PP2, PP3 (10  $\mu$ M, 10 minutes) or DMSO. CD32a was cross-linked (or not) at 37°C as described in *Materials and Methods*. The stimulations were stopped at indicated times. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with anti-phosphoSHIP1 and anti-actin antibodies. After stripping, the membrane was reblotted with anti-SHIP1 antibody. These results are representative of three independent experiments.

**Figure 7: PP2 inhibits the translocation of SHIP1 to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking.**

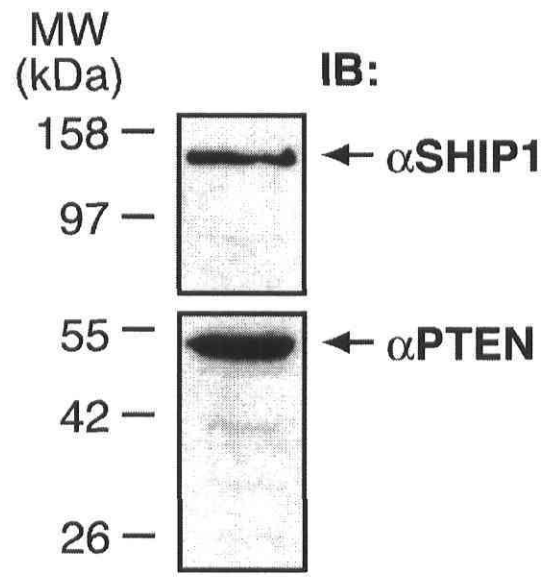
Neutrophils were incubated with DMSO, PP2 or its inactive analogue PP3 (10  $\mu$ M, 10 minutes) and then CD32a was cross-linked or not for 60 seconds at room temperature as described in *Materials and Methods*. The plasma membranes were isolated as described in *Materials and Methods*. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to two PVDF membranes which were then immunoblotted with anti-SHIP1 and anti-flotillin1 (one membrane) or anti-phosphoSHIP1 (the other membrane) antibodies. These results are representative of three independent experiments.

**Figure 8: Wortmannin does not inhibit SHIP1 tyrosine phosphorylation and translocation to the plasma membrane in response to CD32a cross-linking.**

Neutrophils were incubated with wortmannin (200 nM, 10 minutes) or DMSO as described in *Materials and Methods*. A: CD32a was cross-linked or not at 37°C and the stimulation was stopped at the indicated times as described in *Materials and Methods*. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to a PVDF membrane which was immunoblotted with anti-phosphoSHIP1 and anti-actin antibodies, stripped, and reblotted with anti-SHIP1 antibody. The results shown are representative of three independent experiments. B: CD32a was cross-linked or not for 60 seconds at room temperature and the plasma membranes were isolated as described in *Materials and Methods*. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to two separate PVDF membranes which were immunoblotted with anti-SHIP1 and anti-flotillin1 (one membrane) or anti-phosphoSHIP1 (the other membrane) antibodies. The results shown are representative of three independent experiments.



**Figure 1**



**Figure 2**

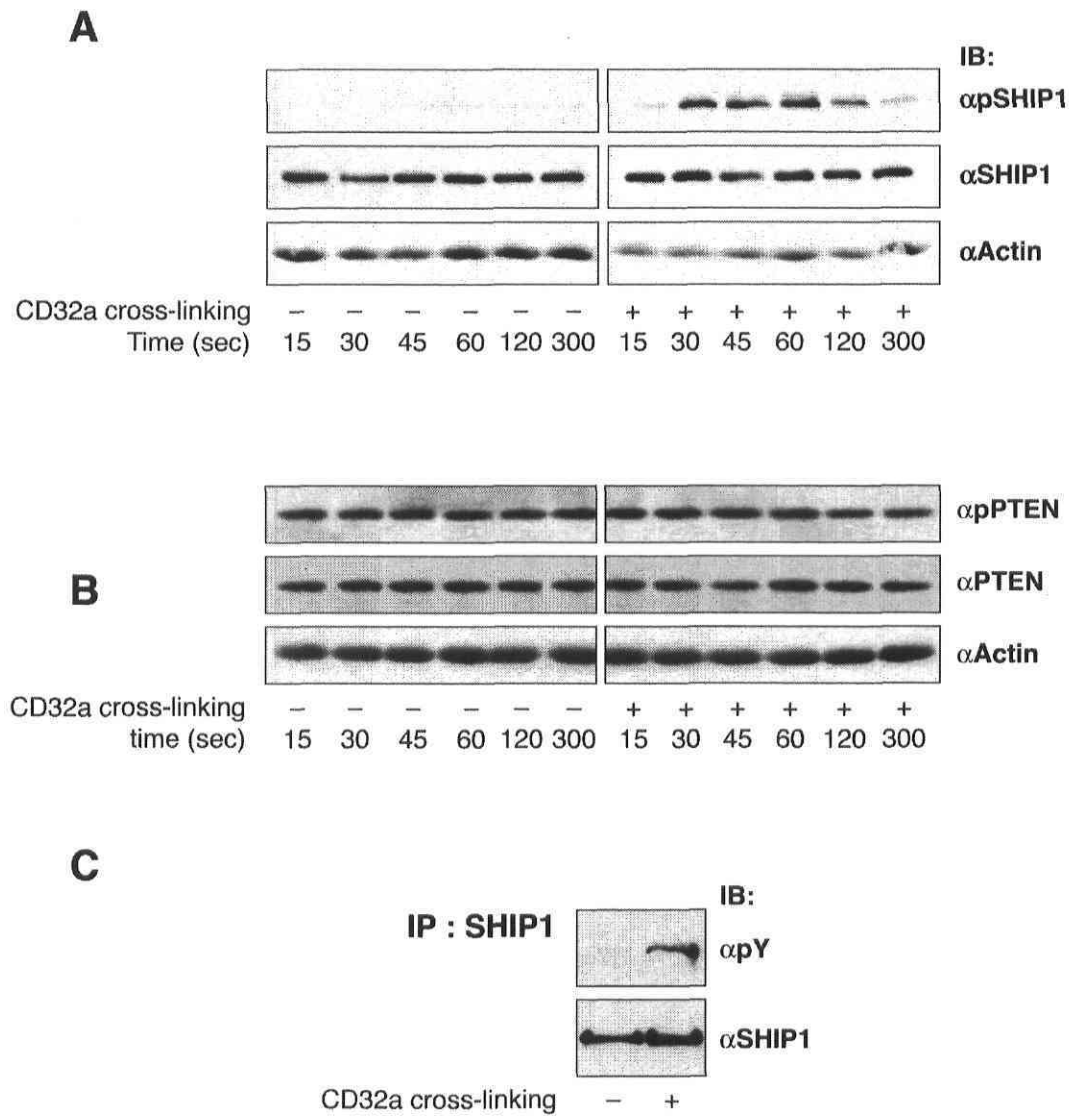
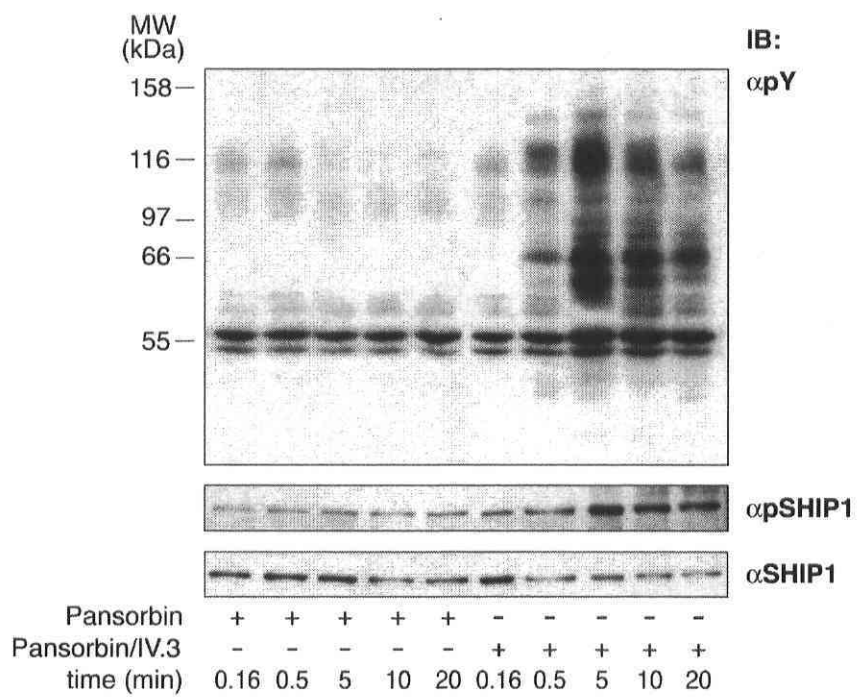
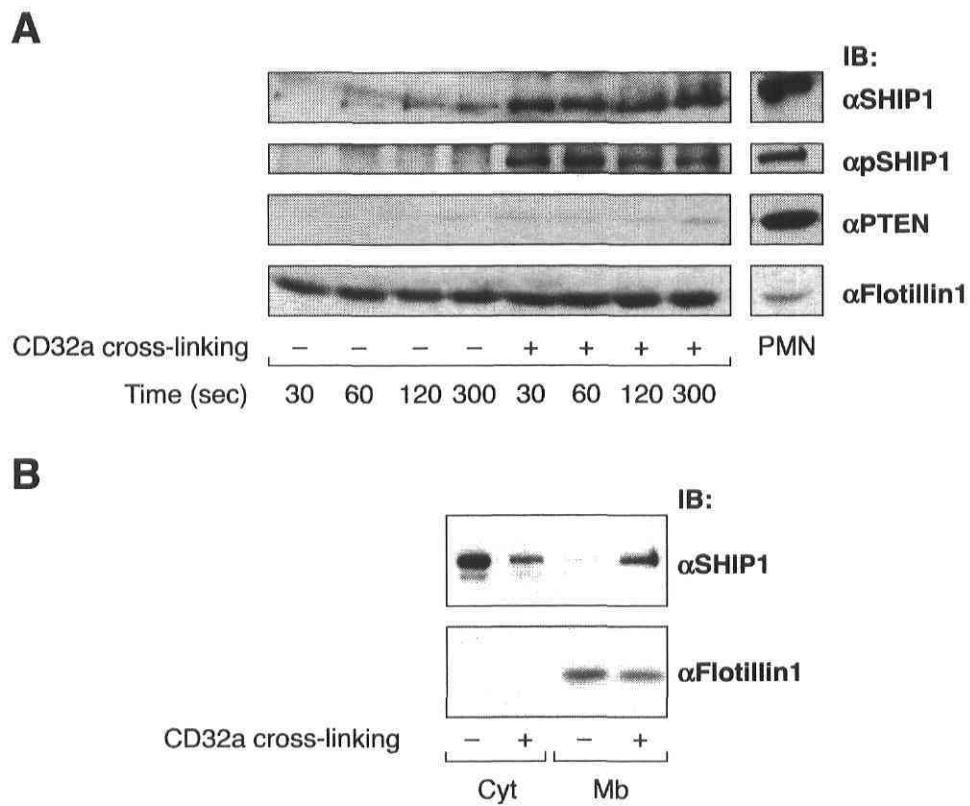


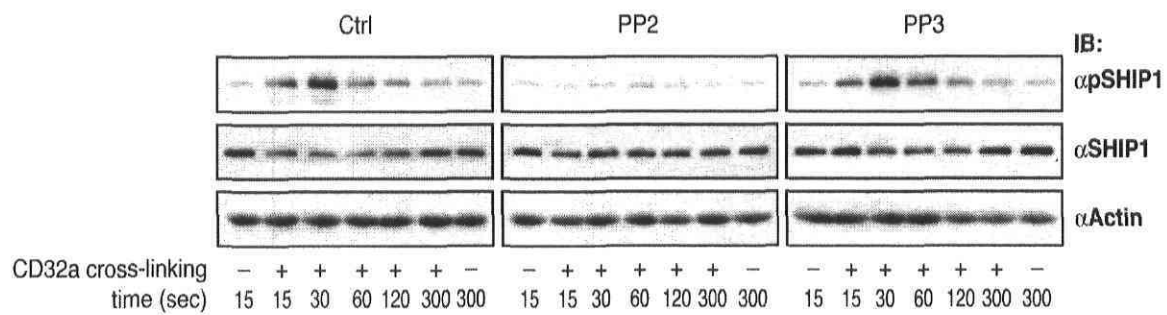
Figure 3

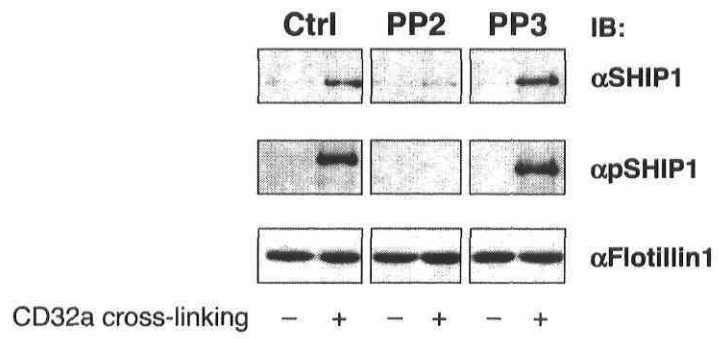


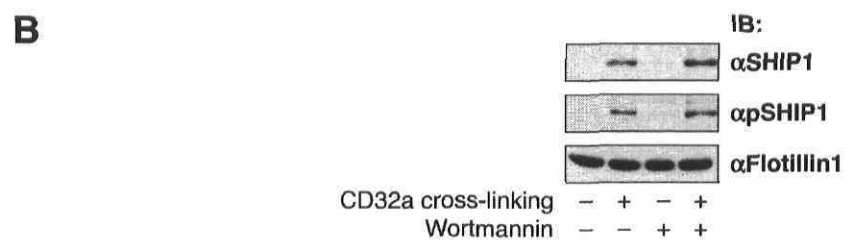
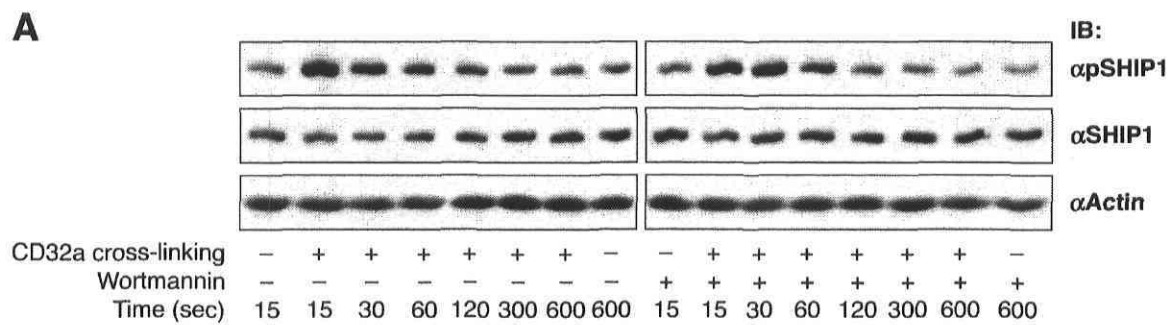
**Figure 4**



**Figure 5**

**Figure 6**

**Figure 7**



**Figure 8**

## Chapitre III

### Discussion

Le neutrophile est la première cellule du système immunitaire à parvenir au foyer inflammatoire. Il joue donc un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire et dans la résorption rapide de l'inflammation. Il est capable de détecter des molécules indicatrices d'une inflammation et de suivre leur gradient croissant, phénomène appelé chimiotaxie. Au site inflammatoire, il est capable de phagocyter des pathogènes et des débris cellulaires.

Plusieurs aspects des voies d'activation du neutrophile sont peu caractérisés aujourd'hui. De nombreuses études suggèrent une activation des PI3Ks. En réponse à plusieurs stimuli, elles phosphorylent le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, ce qui résulte en une accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> à la membrane plasmique<sup>80</sup>. La formation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est observée dans les phénomènes de chimiotaxie et de phagocytose dans le neutrophile humain. En effet, une accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> au front de migration des cellules en réponse à des agents chimiotactiques et à la coupe phagocytaire lors de la phagocytose via des récepteurs FcRs a été rapportée<sup>77,78</sup>. Le rôle des lipide phosphatases dans la régulation du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est peu caractérisé dans le neutrophile humain.

Deux lipide phosphatases peuvent déphosphoryler le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et ainsi contrôler son accumulation: SHIP1 et PTEN. SHIP1 est une 5'-phosphatase et produit du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub><sup>151</sup>. PTEN est une 3'-phosphatase et produit du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub><sup>126</sup>. Nous avons approfondi la caractérisation du rôle de SHIP1 et PTEN dans le neutrophile humain, plus particulièrement, dans la phagocytose. Pour ce faire, la stimulation du CD32a, un récepteur de la portion Fc des IgGs exclusivement exprimé dans le neutrophile humain, a été utilisée comme modèle.

Contrairement au neutrophile murin qui exprime le CD32b et le CD16a (FcγRIIIa), le neutrophile humain exprime le CD32a et le CD16b. Le neutrophile humain ne possède donc pas de motif ITIM capable de contrôler négativement la réponse à la liaison d'IgG. Il

doit donc exister dans cette cellule une ou des voies de signalisation responsables de ce contrôle. Les lipide phosphatases SHIP1 et PTEN sont des candidats puisque l'accumulation du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> joue un rôle dans la phagocytose.

Nous avons mesuré, à l'aide d'un marquage au <sup>32</sup>P, la formation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en réponse à la stimulation du CD32a. Nos résultats montrent, pour la première fois dans le neutrophile humain, une accumulation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en réponse à la stimulation du CD32a. Cette accumulation est rapide et se stabilise par la suite. Mais cette accumulation n'est pas aussi importante que celle induite par le fMet-Leu-Phe ou l'IL-8<sup>111</sup>.

Pour identifier les lipide phosphatases présentes dans le neutrophile humain, nous avons évalué, par immunobuvardage, l'expression de SHIP1 et PTEN. Elles sont constitutivement exprimées. La stimulation du CD32a n'influence pas leur expression. Il existe plusieurs isoformes de SHIP1<sup>153,156</sup>, mais celui qui est le plus exprimé dans le neutrophile humain est le p145.

Afin de déterminer quelle lipide phosphatase pouvait être impliquée dans la régulation du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> formé en réponse au CD32a, nous avons évalué les indices d'activation de SHIP1 et PTEN. SHIP1 est constitutivement active et devrait transloquer à la membrane plasmique pour accéder à son substrat. La phosphorylation sur des résidus tyrosine est un indice de translocation à la membrane plasmique mais ne change pas son activité enzymatique<sup>152,157,167</sup>. PTEN serait inactive et phosphorylée sur des résidus sérine/thréonine dans le cytosol. La diminution de son niveau de phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine serait un indice de son activation<sup>130,136,137</sup>. À l'aide d'anticorps dirigés contre les résidus tyrosine phosphorylés de SHIP1 et sérine/thréonine phosphorylés de PTEN, nous avons étudié les événements de phosphorylation de ces protéines suivant la stimulation du CD32a. Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de SHIP1, qui est un indice de sa translocation à la membrane plasmique. Cet indice laissait présager une implication de SHIP1, qui irait à la membrane plasmique pour trouver son substrat. Aucune diminution du niveau de phosphorylation de PTEN n'a pu être détectée, ce qui indiquait que PTEN n'était peut-être pas activée en réponse à la stimulation du CD32a.

L'augmentation de la phosphorylation sur des résidus tyrosine de SHIP1 en réponse à la stimulation du CD32a a été confirmée par deux méthodes différentes de stimulation. La première est l'incubation avec un anticorps spécifique dirigé contre le CD32a et ensuite avec un deuxième anticorps dirigé contre le premier. La deuxième est l'incubation avec des particules tuées de *Staphylococcus aureus* couplées avec un anticorps dirigé contre le CD32a. Une immunoprécipitation de la protéine SHIP1 et un immunobuvardage avec un anti-phosphotyrosine ont également confirmé les résultats obtenus avec l'anti-phosphoSHIP1.

La translocation à la membrane plasmique, où se trouve le  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ , est un indice d'activation des deux lipide phosphatases<sup>149,166</sup>. Nous avons donc étudié leur déplacement dans la cellule, à l'aide d'une méthode d'isolement de membranes plasmiques, en réponse à la stimulation du CD32a. Lorsque celui-ci est stimulé, nous avons observé que SHIP1 se dirigeait à la membrane plasmique. De plus, comme il est suggéré dans la littérature, nous avons détecté la forme phosphorylée sur des résidus tyrosine de SHIP1 en réponse à la stimulation du CD32a à la membrane plasmique. Nous n'avons pas observé de mouvement de PTEN vers la membrane plasmique en réponse à la stimulation du CD32a.

La translocation à la membrane plasmique et la phosphorylation sur des résidus tyrosine de SHIP1 nous portaient à croire que SHIP1, mais pas PTEN, était impliquée dans la régulation du  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  en réponse à la stimulation du CD32a. Afin de caractériser cette activation, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques. Les tyrosine kinases Src sont importantes dans plusieurs voies de signalisation, dont celles du CD32a, car elles phosphoryleraient son motif ITAM<sup>62,63</sup>. Nous avons donc étudié le rôle des tyrosine kinases Src, à l'aide de l'inhibiteur PP2, sur l'implication de SHIP1 dans les voies de signalisation du CD32a. Nous avons détecté une inhibition par le PP2 de la translocation à la membrane plasmique et de la phosphorylation sur des résidus tyrosine de SHIP1 en réponse à la stimulation du CD32a. Nous avons conclu que ces événements sont Src-dépendants.

Le rôle de l'activation des PI3Ks et de l'accumulation de  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  sur l'activation de SHIP1 a également été étudié. Nous n'avons pas détecté d'inhibition par la wortmannine, un inhibiteur de PI3Ks, de la translocation ni de la phosphorylation sur des

résidus tyrosine de SHIP1 en réponse à la stimulation du CD32a. Ceci est consistant avec la littérature, qui suggère que SHIP1 serait recrutée à la membrane plasmique via son domaine SH2, car elle ne peut se lier directement au PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, ne possédant pas de domaine PH<sup>157,207</sup>.



## Conclusion

### Perspectives et conclusion

En conclusion, nous avons évalué le rôle des lipide phosphatases SHIP1 et PTEN dans les voies de signalisation du CD32a dans le neutrophile humain. Nos résultats montrent que SHIP1 est activée d'une manière Src-dépendante en réponse à la stimulation du CD32a et joue probablement un rôle sur la régulation du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Elle est peut-être également une protéine adaptatrice. Aucun indice ne suggère une implication de PTEN. Cette étude nous permet de mieux comprendre les voies de signalisation d'une des fonctions premières du neutrophile, la phagocytose.

La suite logique du projet serait de mesurer la quantité de PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, qui est le produit de SHIP1, par immunofluorescence ou par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques, ou par HPLC (high pressure liquid chromatography). De plus, des études de co-immunoprécipitations permettraient d'identifier les protéines qui se lient à SHIP1. Plusieurs études suggèrent que le recrutement de SHIP1 à la membrane plasmique se fait via la protéine adaptatrice Shc<sup>157</sup>. Il serait intéressant de voir si c'est le cas dans le neutrophile humain.

D'autres indices d'activation de PTEN en réponse à la stimulation du CD32a pourraient être étudiés, par exemple sa phosphorylation sur des résidus tyrosine ou son degré d'oxydation, qui pourraient également être impliqués dans le contrôle de son activité<sup>139,143</sup>.

Le rôle des protéines SHIP1 et PTEN lors de la stimulation des autres FcγRs (CD16b et CD64) et des récepteurs de chimiotaxie (fMet-Leu-Phe, IL-8) devrait être évalué dans le neutrophile humain pour déterminer les différences entre les voies de signalisation de ces différents récepteurs. La présence et l'implication de SHIP2, qui se trouve dans la même famille que SHIP1 et qui utilise également le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, pourrait également être évaluée<sup>187</sup>.

Puisque le CD32a n'est pas exprimé dans le neutrophile murin, les modèles de souris knockout ne sont pas applicables pour poursuivre le travail. En revanche, l'inactivation de SHIP1 par des RNAi (RNA interference) pourrait aider à comprendre le rôle fonctionnel de l'activation de SHIP1 et de la régulation du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> dans la phagocytose et/ou dans la chimiotaxie dans des lignées cellulaires différenciées en neutrophiles, comme les PLB 985 ou les HL-60.

## Bibliographie

1. Gallin JI, Snyderman, R. Inflammation (ed Third edition). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1999
2. Murphy P. The neutrophil. New York: Plenum publishing corporation; 1976
3. Walker RI, Willemze R. Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. *Rev Infect Dis.* 1980;2:282-292
4. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* 1976;58:705-715
5. Goldsby R, Kindt, TJ., Osborne, BA. Immunologie (ed 4). Paris: Dunod; 2000
6. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 1995;128:661-671
7. Guyer DA, Moore KL, Lynam EB, Schammel CM, Rogelj S, McEver RP, Sklar LA. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation. *Blood.* 1996;88:2415-2421
8. Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest.* 2002;109:939-950
9. Simon SI, Cherapanov V, Nadra I, Waddell TK, Seo SM, Wang Q, Doerschuk CM, Downey GP. Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18. *J Immunol.* 1999;163:2891-2901

10. Jung U, Ramos CL, Bullard DC, Ley K. Gene-targeted mice reveal importance of L-selectin-dependent rolling for neutrophil adhesion. *Am J Physiol*. 1998;274:H1785-1791
11. Rainger GE, Rowley AF, Nash GB. Adhesion-dependent release of elastase from human neutrophils in a novel, flow-based model: specificity of different chemotactic agents. *Blood*. 1998;92:4819-4827
12. Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA, Samuelsson B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:3887-3891
13. Smith CW, Hollers JC, Patrick RA, Hassett C. Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effects of chemotactic factors. *J Clin Invest*. 1979;63:221-229
14. Detmers PA, Powell DE, Walz A, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Cohn ZA. Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis. *J Immunol*. 1991;147:4211-4217
15. Bjork J, Lindbom L, Gerdin B, Smedegard G, Arfors KE, Benveniste J. Paf-acether (platelet-activating factor) increases microvascular permeability and affects endothelium-granulocyte interaction in microvascular beds. *Acta Physiol Scand*. 1983;119:305-308
16. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-314
17. Davis GE. The Mac-1 and p150,95 beta 2 integrins bind denatured proteins to mediate leukocyte cell-substrate adhesion. *Exp Cell Res*. 1992;200:242-252
18. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11-25

19. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren, II, Thom SR, Jones ML, Ward PA, Albelda SM. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*. 1993;262:1580-1582
20. Phillips ML, Schwartz BR, Etzioni A, Bayer R, Ochs HD, Paulson JC, Harlan JM. Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2. *J Clin Invest*. 1995;96:2898-2906
21. Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med*. 1987;38:175-194
22. Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*. 2000;177:68-78
23. Marasco WA, Phan SH, Krutzsch H, Showell HJ, Feltner DE, Nairn R, Becker EL, Ward PA. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1984;259:5430-5439
24. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*. 2003;170:3233-3242
25. Gerard C, Gerard NP. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:140-145
26. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:593-633
27. Howard TH, Meyer WH. Chemotactic peptide modulation of actin assembly and locomotion in neutrophils. *J Cell Biol*. 1984;98:1265-1271

28. Coates TD, Watts RG, Hartman R, Howard TH. Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils. *J Cell Biol.* 1992;117:765-774
29. Paul W. *Fundamental Immunology* (ed Fourth edition). Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999
30. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003;102:2660-2669
31. Underhill DM, Gantner B. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect.* 2004;6:1368-1373
32. Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 2004;304:1014-1018
33. Daeron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:203-234
34. Shao D, Segal AW, Dekker LV. Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett.* 2003;550:101-106
35. Bretz U, Baggiolini M. Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol.* 1974;63:251-269
36. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol.* 1993;51:187-198
37. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89:3503-3521
38. Shi J, Fujieda H, Kokubo Y, Wake K. Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology.* 1996;24:1256-1263

39. Shi J, Gilbert GE, Kokubo Y, Ohashi T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood*. 2001;98:1226-1230
40. Oehler L, Majdic O, Pickl WF, Stockl J, Riedl E, Drach J, Rappersberger K, Geissler K, Knapp W. Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J Exp Med*. 1998;187:1019-1028
41. Radsak M, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*. 2000;101:521-530
42. Iking-Konert C, Cseko C, Wagner C, Stegmaier S, Andrassy K, Hansch GM. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med*. 2001;79:464-474
43. Stevens AaL, J. Pathology (ed Second edition). London: Mosby; 2000
44. Iking-Konert C, Vogt S, Radsak M, Wagner C, Hansch GM, Andrassy K. Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Int*. 2001;60:2247-2262
45. Iking-Konert C, Wagner C, Deneleh B, Hug F, Schneider M, Andrassy K, Hansch GM. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin Exp Immunol*. 2002;130:501-508
46. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 2000;177:195-203

47. Looney RJ, Ryan DH, Takahashi K, Fleit HB, Cohen HJ, Abraham GN, Anderson CL. Identification of a second class of IgG Fc receptors on human neutrophils. A 40 kilodalton molecule also found on eosinophils. *J Exp Med.* 1986;163:826-836
48. Fleit HB, Wright SD, Unkeless JC. Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79:3275-3279
49. Selvaraj P, Rosse WF, Silber R, Springer TA. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature.* 1988;333:565-567
50. Nagarajan S, Venkiteswaran K, Anderson M, Sayed U, Zhu C, Selvaraj P. Cell-specific, activation-dependent regulation of neutrophil CD32A ligand-binding function. *Blood.* 2000;95:1069-1077
51. Nagarajan S, Fifadara NH, Selvaraj P. Signal-Specific Activation and Regulation of Human Neutrophil Fc{gamma} Receptors. *J Immunol.* 2005;174:5423-5432
52. Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J Exp Med.* 1990;171:1333-1345
53. Cohen-Solal JF, Cassard L, Fridman WH, Sautes-Fridman C. Fc gamma receptors. *Immunol Lett.* 2004;92:199-205
54. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature.* 1989;338:383-384
55. Cambier JC. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today.* 1995;16:110



56. Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC, Ravetch JV. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature*. 1994;369:340
57. Petty HR, Todd RF, 3rd. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today*. 1996;17:209-212
58. Vossebeld PJ, Homburg CH, Roos D, Verhoeven AJ. The anti-Fc gamma RIII mAb 3G8 induces neutrophil activation via a cooperative action of Fc gamma RIIIb and Fc gamma RIIIa. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29:465-473
59. Chuang FY, Sassaroli M, Unkeless JC. Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol*. 2000;164:350-360
60. Lofgren R, Serrander L, Forsberg M, Wilsson A, Wasteson A, Stendahl O. CR3, Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca<sup>2+</sup>, phospholipase D and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1452:46-59
61. Rollet-Labelle E, Gilbert C, Naccache PH. Modulation of human neutrophil responses to CD32 cross-linking by serine/threonine phosphatase inhibitors: cross-talk between serine/threonine and tyrosine phosphorylation. *J Immunol*. 2000;164:1020-1028
62. Hamada F, Aoki M, Akiyama T, Toyoshima K. Association of immunoglobulin G Fc receptor II with Src-like protein-tyrosine kinase Fgr in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:6305-6309

63. Ibarrola I, Vosseveld PJ, Homburg CH, Thelen M, Roos D, Verhoeven AJ. Influence of tyrosine phosphorylation on protein interaction with Fc gamma RIIa. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1357:348-358
64. Barabe F, Rollet-Labelle E, Gilbert C, Fernandes MJ, Naccache SN, Naccache PH. Early events in the activation of Fc gamma RIIA in human neutrophils: stimulated insolubilization, translocation to detergent-resistant domains, and degradation of Fc gamma RIIA. *J Immunol*. 2002;168:4042-4049
65. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*. 1996;271:695-701
66. Mitchell MA, Huang MM, Chien P, Indik ZK, Pan XQ, Schreiber AD. Substitutions and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc gamma RIIA: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis. *Blood*. 1994;84:1753-1759
67. Cooney DS, Phee H, Jacob A, Coggeshall KM. Signal transduction by human-restricted Fc gamma RIIa involves three distinct cytoplasmic kinase families leading to phagocytosis. *J Immunol*. 2001;167:844-854
68. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pawson T. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol*. 1998;18:4209-4220
69. Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J Exp Med*. 1997;186:1027-1039

70. Edidin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2003;32:257-283
71. Rollet-Labelle E, Marois S, Barbeau K, Malawista SE, Naccache PH. Recruitment of the cross-linked opsonic receptor CD32A (FcγRIIA) to high-density detergent-resistant membrane domains in human neutrophils. *Biochem J.* 2004;381:919-928
72. Vossebeld PJ, Homburg CH, Schweizer RC, Ibarrola I, Kessler J, Koenderman L, Roos D, Verhoeven AJ. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase occurs upstream of Ca<sup>2+</sup>-signalling induced by Fcγ receptor cross-linking in human neutrophils. *Biochem J.* 1997;323 ( Pt 1):87-94
73. Zhang X, Majerus PW. Phosphatidylinositol signalling reactions. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;9:153-160
74. Stephens LR, Hughes KT, Irvine RF. Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature.* 1991;351:33-39
75. Traynor-Kaplan AE, Thompson BL, Harris AL, Taylor P, Omann GM, Sklar LA. Transient increase in phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during activation of human neutrophils. *J Biol Chem.* 1989;264:15668-15673
76. Okada T, Sakuma L, Fukui Y, Hazeki O, Ui M. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1994;269:3563-3567
77. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science.* 2000;287:1037-1040

78. Marshall JG, Booth JW, Stambolic V, Mak T, Balla T, Schreiber AD, Meyer T, Grinstein S. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol.* 2001;153:1369-1380
79. Cox D, Tseng CC, Bjekic G, Greenberg S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem.* 1999;274:1240-1247
80. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:535-602
81. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res.* 1999;253:239-254
82. Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1436:127-150
83. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:615-675
84. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:251-337
85. Kapeller R, Prasad KV, Janssen O, Hou W, Schaffhausen BS, Rudd CE, Cantley LC. Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1994;269:1927-1933
86. Harrison-Findik D, Susa M, Varticovski L. Association of phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene.* 1995;10:1385-1391

87. Pleiman CM, Hertz WM, Cambier JC. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science*. 1994;263:1609-1612
88. Gout I, Dhand R, Hiles ID, Fry MJ, Panayotou G, Das P, Truong O, Totty NF, Hsuan J, Booker GW, et al. The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell*. 1993;75:25-36
89. Cuevas BD, Lu Y, Mao M, Zhang J, LaPushin R, Siminovitch K, Mills GB. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 2001;276:27455-27461
90. Fruman DA, Snapper SB, Yballe CM, Davidson L, Yu JY, Alt FW, Cantley LC. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science*. 1999;283:393-397
91. Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4330-4335
92. Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A, Nussbaum RL. Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 1999;274:10963-10968
93. Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell*. 1997;89:105-114

94. Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis CT, Walker EH, Hawkins PT, Stephens L, Eccleston JF, Williams RL. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell*. 2000;103:931-943
95. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*. 2000;287:1049-1053
96. Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. 2000;287:1040-1046
97. Arcaro A, Volinia S, Zvelebil MJ, Stein R, Watton SJ, Layton MJ, Gout I, Ahmadi K, Downward J, Waterfield MD. Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J Biol Chem*. 1998;273:33082-33090
98. Prior IA, Clague MJ. Localization of a class II phosphatidylinositol 3-kinase, PI3KC2alpha, to clathrin-coated vesicles. *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999;1:162-166
99. Arcaro A, Zvelebil MJ, Wallasch C, Ullrich A, Waterfield MD, Domin J. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol Cell Biol*. 2000;20:3817-3830
100. Brown RA, Domin J, Arcaro A, Waterfield MD, Shepherd PR. Insulin activates the alpha isoform of class II phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 1999;274:14529-14532
101. Zhang J, Banfic H, Straforini F, Tosi L, Volinia S, Rittenhouse SE. A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. A source of phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem*. 1998;273:14081-14084

102. Turner SJ, Domin J, Waterfield MD, Ward SG, Westwick J. The CC chemokine monocyte chemoattractant peptide-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2alpha. *J Biol Chem.* 1998;273:25987-25995
103. Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science.* 1993;260:88-91
104. Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y, Seya T, Okada T, Hazeki O, Ui M. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem.* 1994;269:22732-22737
105. Tilton B, Andjelkovic M, Didichenko SA, Hemmings BA, Thelen M. G-Protein-coupled receptors and Fc gamma-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:28096-28101
106. 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
107. Cox D, Dale BM, Kashiwada M, Helgason CD, Greenberg S. A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (alpha(M)beta(2); CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2001;193:61-71
108. Vieira OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A, Backer JM, Cantley LC, Grinstein S. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol.* 2001;155:19-25

109. Leverrier Y, Okkenhaug K, Sawyer C, Bilancio A, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ. Class I phosphoinositide 3-kinase p110beta is required for apoptotic cell and Fcgamma receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278:38437-38442
110. Lowry MB, Duchemin AM, Coggeshall KM, Robinson JM, Anderson CL. Chimeric receptors composed of phosphoinositide 3-kinase domains and Fcgamma receptor ligand-binding domains mediate phagocytosis in COS fibroblasts. *J Biol Chem.* 1998;273:24513-24520
111. Naccache PH, Levasseur S, Lachance G, Chakravarti S, Bourgoin SG, McColl SR. Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. *J Biol Chem.* 2000;275:23636-23641
112. Hannigan M, Zhan L, Li Z, Ai Y, Wu D, Huang CK. Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:3603-3608
113. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275:1943-1947
114. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 1997;15:356-362



115. Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 1997;57:2124-2129
116. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet.* 1997;16:64-67
117. Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, Eng C. Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet.* 1997;16:333-334
118. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell.* 1999;99:323-334
119. McConnachie G, Pass I, Walker SM, Downes CP. Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochem J.* 2003;371:947-955
120. Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, Wood J, Ross C, Sawyers CL, Whang YE. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4233-4238
121. Tolkacheva T, Boddapati M, Sanfiz A, Tsuchida K, Kimmelman AC, Chan AM. Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383. *Cancer Res.* 2001;61:4985-4989

122. Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem.* 2001;276:48627-48630
123. Wu Y, Dowbenko D, Spencer S, Laura R, Lee J, Gu Q, Lasky LA. Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem.* 2000;275:21477-21485
124. Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol.* 1998;8:1169-1178
125. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet.* 1998;19:348-355
126. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 1998;273:13375-13378
127. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:13513-13518
128. Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:15587-15591

129. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998;95:29-39
130. Miller SJ, Lou DY, Seldin DC, Lane WS, Neel BG. Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS Lett*. 2002;528:145-153
131. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:9052-9057
132. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 1998;280:1614-1617
133. Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 1999;274:20693-20703
134. Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol*. 1998;143:1375-1383
135. Gu J, Tamura M, Pankov R, Danen EH, Takino T, Matsumoto K, Yamada KM. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol*. 1999;146:389-403
136. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol*. 2000;20:5010-5018

137. Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7491-7496
138. Torres J, Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem*. 2001;276:993-998
139. Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 2002;277:20336-20342
140. Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *Embo J*. 2003;22:5501-5510
141. Meuillet EJ, Mahadevan D, Berggren M, Coon A, Powis G. Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. *Arch Biochem Biophys*. 2004;429:123-133
142. Campbell RB, Liu F, Ross AH. Allosteric activation of PTEN phosphatase by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*. 2003;278:33617-33620
143. Lu Y, Yu Q, Liu JH, Zhang J, Wang H, Koul D, McMurray JS, Fang X, Yung WK, Siminovitch KA, Mills GB. Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J Biol Chem*. 2003;278:40057-40066
144. Koul D, Jasser SA, Lu Y, Davies MA, Shen R, Shi Y, Mills GB, Yung WK. Motif analysis of the tumor suppressor gene MMAC/PTEN identifies tyrosines critical for tumor suppression and lipid phosphatase activity. *Oncogene*. 2002;21:2357-2364

145. Kim JS, Peng X, De PK, Geahlen RL, Durden DL. PTEN controls immunoreceptor (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) signaling and the activation of Rac. *Blood*. 2002;99:694-697
146. Cao X, Wei G, Fang H, Guo J, Weinstein M, Marsh CB, Ostrowski MC, Tridandapani S. The inositol 3-phosphatase PTEN negatively regulates Fc gamma receptor signaling, but supports Toll-like receptor 4 signaling in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*. 2004;172:4851-4857
147. Iijima M, Devreotes P. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell*. 2002;109:599-610
148. Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel RA. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell*. 2002;109:611-623
149. Li Z, Hannigan M, Mo Z, Liu B, Lu W, Wu Y, Smrcka AV, Wu G, Li L, Liu M, Huang CK, Wu D. Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell*. 2003;114:215-227
150. Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Barber DF, Jimenez-Baranda S, Mira E, Martinez AC, Carrera AC, Manes S. PTEN regulates motility but not directionality during leukocyte chemotaxis. *J Cell Sci*. 2004;117:6207-6215
151. Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, Krystal G. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:1689-1693

152. Lioubin MN, Algate PA, Tsai S, Carlberg K, Aebersold A, Rohrschneider LR. p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev.* 1996;10:1084-1095
153. Kavanaugh WM, Pot DA, Chin SM, Deuter-Reinhard M, Jefferson AB, Norris FA, Masiarz FR, Cousens LS, Majerus PW, Williams LT. Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr Biol.* 1996;6:438-445
154. Liu L, Damen JE, Cutler RL, Krystal G. Multiple cytokines stimulate the binding of a common 145-kilodalton protein to Shc at the Grb2 recognition site of Shc. *Mol Cell Biol.* 1994;14:6926-6935
155. Ravichandran KS, Lee KK, Songyang Z, Cantley LC, Burn P, Burakoff SJ. Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science.* 1993;262:902-905
156. Damen JE, Liu L, Ware MD, Ermolaeva M, Majerus PW, Krystal G. Multiple forms of the SH2-containing inositol phosphatase, SHIP, are generated by C-terminal truncation. *Blood.* 1998;92:1199-1205
157. Tridandapani S, Wang Y, Marsh CB, Anderson CL. Src homology 2 domain-containing inositol polyphosphate phosphatase regulates NF-kappa B-mediated gene transcription by phagocytic Fc gamma Rs in human myeloid cells. *J Immunol.* 2002;169:4370-4378
158. Lamkin TD, Walk SF, Liu L, Damen JE, Krystal G, Ravichandran KS. Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol phosphatase (SHIP) in vivo

requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. *J Biol Chem.* 1997;272:10396-10401

159. Bolland S, Pearse RN, Kurosaki T, Ravetch JV. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity.* 1998;8:509-516

160. Scharenberg AM, El-Hillal O, Fruman DA, Beitz LO, Li Z, Lin S, Gout I, Cantley LC, Rawlings DJ, Kinet JP. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *Embo J.* 1998;17:1961-1972

161. Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM. SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev.* 1999;13:786-791

162. Carver DJ, Aman MJ, Ravichandran KS. SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization. *Blood.* 2000;96:1449-1456

163. Damen JE, Ware MD, Kalesnikoff J, Hughes MR, Krystal G. SHIP's C-terminus is essential for its hydrolysis of PIP3 and inhibition of mast cell degranulation. *Blood.* 2001;97:1343-1351

164. Helgason CD, Damen JE, Rosten P, Grewal R, Sorensen P, Chappel SM, Borowski A, Jirik F, Krystal G, Humphries RK. Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev.* 1998;12:1610-1620

165. Gardai S, Whitlock BB, Helgason C, Ambruso D, Fadok V, Bratton D, Henson PM. Activation of SHIP by NADPH oxidase-stimulated Lyn leads to enhanced apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem.* 2002;277:5236-5246

166. Phee H, Jacob A, Coggeshall KM. Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J Biol Chem.* 2000;275:19090-19097
167. Maresco DL, Osborne JM, Cooney D, Coggeshall KM, Anderson CL. The SH2-containing 5'-inositol phosphatase (SHIP) is tyrosine phosphorylated after Fc gamma receptor clustering in monocytes. *J Immunol.* 1999;162:6458-6465
168. Giuriato S, Payrastre B, Drayer AL, Plantavid M, Woscholski R, Parker P, Erneux C, Chap H. Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. *J Biol Chem.* 1997;272:26857-26863
169. Cameron AJ, Allen JM. The human high-affinity immunoglobulin G receptor activates SH2-containing inositol phosphatase (SHIP). *Immunology.* 1999;97:641-647
170. Liu L, Damen JE, Ware MD, Krystal G. Interleukin-3 induces the association of the inositol 5-phosphatase SHIP with SHP2. *J Biol Chem.* 1997;272:10998-11001
171. Sattler M, Salgia R, Shrikhande G, Verma S, Choi JL, Rohrschneider LR, Griffin JD. The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP and the protein tyrosine phosphatase SHP-2 form a complex in hematopoietic cells which can be regulated by BCR/ABL and growth factors. *Oncogene.* 1997;15:2379-2384
172. Gupta N, Scharenberg AM, Fruman DA, Cantley LC, Kinet JP, Long EO. The SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) recruits the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase during Fc gamma RIIb1-mediated inhibition of B cell receptor signaling. *J Biol Chem.* 1999;274:7489-7494
173. Lecoq-Lafon C, Verdier F, Fichelson S, Chretien S, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its



association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood*.

1999;93:2578-2585

174. Sattler M, Verma S, Pride YB, Salgia R, Rohrschneider LR, Griffin JD. SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL. *J Biol Chem*. 2001;276:2451-2458

175. Tamir I, Stolpa JC, Helgason CD, Nakamura K, Bruhns P, Daeron M, Cambier JC. The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity*. 2000;12:347-358

176. Dunant NM, Wisniewski D, Strife A, Clarkson B, Resh MD. The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP1 associates with the dok1 phosphoprotein in bcr-Abl transformed cells. *Cell Signal*. 2000;12:317-326

177. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(γ)RIIB. *Nature*. 1996;383:263-266

178. Tridandapani S, Kelley T, Pradhan M, Cooney D, Justement LB, Coggeshall KM. Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc γ immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol Cell Biol*. 1997;17:4305-4311

179. Osborne MA, Zenner G, Lubinus M, Zhang X, Songyang Z, Cantley LC, Majerus P, Burn P, Kochan JP. The inositol 5'-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. *J Biol Chem*. 1996;271:29271-29278

180. Kimura T, Sakamoto H, Appella E, Siraganian RP. The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the tyrosine-phosphorylated beta subunit of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:13991-13996
181. Huber M, Helgason CD, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:11330-11335
182. Nakamura K, Malykhin A, Coggeshall KM. The Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase negatively regulates Fcgamma receptor-mediated phagocytosis through immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing phagocytic receptors. *Blood.* 2002;100:3374-3382
183. Kim CH, Hangoc G, Cooper S, Helgason CD, Yew S, Humphries RK, Krystal G, Broxmeyer HE. Altered responsiveness to chemokines due to targeted disruption of SHIP. *J Clin Invest.* 1999;104:1751-1759
184. Pesesse X, Deleu S, De Smedt F, Drayer L, Erneux C. Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;239:697-700
185. Guilherme A, Klarlund JK, Krystal G, Czech MP. Regulation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5'-phosphatase activity by insulin. *J Biol Chem.* 1996;271:29533-29536
186. Muraille E, Pesesse X, Kuntz C, Erneux C. Distribution of the src-homology-2-domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP-2 in both non-haemopoietic and haemopoietic cells and possible involvement of SHIP-2 in negative signalling of B-cells. *Biochem J.* 1999;342 Pt 3:697-705

187. Pesesse X, Moreau C, Drayer AL, Woscholski R, Parker P, Erneux C. The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 displays phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase activity. *FEBS Lett.* 1998;437:301-303
188. Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L, Schurmans S. The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature.* 2001;409:92-97
189. Marion E, Kaisaki PJ, Pouillon V, Gueydan C, Levy JC, Bodson A, Krzentowski G, Daubresse JC, Mockel J, Behrends J, Servais G, Szpirer C, Kruys V, Gauguier D, Schurmans S. The gene INPPL1, encoding the lipid phosphatase SHIP2, is a candidate for type 2 diabetes in rat and man. *Diabetes.* 2002;51:2012-2017
190. Giuriato S, Blero D, Robaye B, Bruyns C, Payrastre B, Erneux C. SHIP2 overexpression strongly reduces the proliferation rate of K562 erythroleukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296:106-110
191. Prasad N, Topping RS, Decker SJ. Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 5'-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I. *J Cell Sci.* 2002;115:3807-3815
192. Habib T, Hejna JA, Moses RE, Decker SJ. Growth factors and insulin stimulate tyrosine phosphorylation of the 51C/SHIP2 protein. *J Biol Chem.* 1998;273:18605-18609
193. Taylor V, Wong M, Brandts C, Reilly L, Dean NM, Cowsert LM, Moodie S, Stokoe D. 5' phospholipid phosphatase SHIP-2 causes protein kinase B inactivation and cell cycle arrest in glioblastoma cells. *Mol Cell Biol.* 2000;20:6860-6871

194. Muraille E, Bruhns P, Pesesse X, Daeron M, Erneux C. The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 associates to the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif of Fc gammaRIIB in B cells under negative signaling. *Immunol Lett.* 2000;72:7-15
195. Chacko GW, Brandt JT, Coggeshall KM, Anderson CL. Phosphoinositide 3-kinase and p72syk noncovalently associate with the low affinity Fc gamma receptor on human platelets through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif. Reconstitution with synthetic phosphopeptides. *J Biol Chem.* 1996;271:10775-10781
196. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:965-1014
197. Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol.* 1997;17:338-344
198. Liu Y, Jenkins B, Shin JL, Rohrschneider LR. Scaffolding protein Gab2 mediates differentiation signaling downstream of Fms receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3047-3056
199. Kashige N, Carpino N, Kobayashi R. Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2093-2098
200. Scharenberg AM, Kinet JP. The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell.* 1996;87:961-964
201. Gupta N, Scharenberg AM, Burshtyn DN, Wagtman N, Lioubin MN, Rohrschneider LR, Kinet JP, Long EO. Negative signaling pathways of the killer cell inhibitory receptor and Fc gamma RIIB1 require distinct phosphatases. *J Exp Med.* 1997;186:473-478

202. Bruhns P, Vely F, Malbec O, Fridman WH, Vivier E, Daeron M. Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB. *J Biol Chem.* 2000;275:37357-37364
203. Rollet E, Caon AC, Roberge CJ, Liao NW, Malawista SE, McColl SR, Naccache PH. Tyrosine phosphorylation in activated human neutrophils. Comparison of the effects of different classes of agonists and identification of the signaling pathways involved. *J Immunol.* 1994;153:353-363
204. Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients. *J Immunol Methods.* 1999;232:131-143
205. Gilbert C, Levasseur S, Desaulniers P, Dusseault AA, Thibault N, Bourgoin SG, Naccache PH. Chemotactic factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils. II. Effects of LFM-A13, a specific Btk inhibitor. *J Immunol.* 2003;170:5235-5243
206. Slaughter N, Laux I, Tu X, Whitelegge J, Zhu X, Effros R, Bickel P, Nel A. The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation. *Clin Immunol.* 2003;108:138-151
207. March ME, Ravichandran K. Regulation of the immune response by SHIP. *Semin Immunol.* 2002;14:37-47