

Université du Québec

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Rôle de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1 dans la biogenèse du
phagolysosome

Par

Carolina Plazas-Gómez

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître en sciences
(M.Sc.) en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président de Jury

Denis Girard

Examineur externe

Michel J. Tremblay

Directeur de recherche

Albert Descoteaux

SOMMAIRE

Dû à son rôle dans l'immunité innée et à sa participation dans l'immunité acquise, le macrophage est une des cellules les plus étudiées dans le système immunitaire. Le phagosome est un organite fondamental à la réponse immunitaire chez plusieurs animaux, ainsi que pour l'acquisition de nutriments. La biogenèse et la maturation du phagolysosome ont été étudiées pendant plusieurs années, mais les mécanismes qui régulent la série d'évènements permettant une telle maturation ne sont pas tout à fait connus. Parmi les protéines impliquées dans la biogenèse du phagolysosome et dont les rôles sont encore inconnus, nous retrouvons plusieurs phosphatases, notamment la protéine tyrosine phosphatase contenant le domaine SH2 1 (SHP-1). Cette protéine tyrosine phosphatase, typique des cellules hématopoïétiques, est connue pour avoir un rôle dans la régulation de certaines voies de signalisation pertinentes à la réponse immunitaire, dont la voie des Janus kinases et le transducteur du signal de la transcription (JAK/STAT).

Pour évaluer le rôle de SHP-1 lors de la biogenèse du phagolysosome, nous avons travaillé avec des cellules déficientes en SHP-1. Ces cellules nous ont permis d'identifier les aspects de la formation du phagolysosome qui dépendent du rôle de SHP-1. Chez les cellules déficientes en SHP-1, les endosomes précoces ne semblent pas être affectés par l'absence de SHP-1. Nos travaux ont démontré que SHP-1 est nécessaire pour l'acquisition de certains marqueurs de maturation du phagosome, ainsi que pour l'acquisition de protéines impliquées dans l'acidification de cet organe, une des caractéristiques microbicides les plus importantes du phagosome. De plus, nos résultats démontrent que l'index de phagocytose est aussi altéré dans les cellules déficientes en SHP-1, suggérant un rôle pour SHP-1 dans l'internalisation de particules.

Nous proposons ici un modèle où SHP-1 joue un rôle de régulateur de la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes. Nos résultats suggèrent que SHP-1 régule l'acquisition des pompes protoniques et de petites GTPase qui sont nécessaires à la maturation du phagosome en phagolysosome. D'avantage d'expériences restent à être réalisées afin de déterminer si SHP-1 agit au niveau de la maturation du phagosome via son activité de phosphatase, ou plutôt comme protéine adaptatrice, tel que suggéré par des études antérieures.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier premièrement mon directeur de recherche, le Dr. Albert Descoteaux, qui m'a accepté dans son labo sans m'avoir connu en personne. Sa direction et la confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée à l'institut m'ont permis de me sentir à l'aise dans mon nouvel environnement de travail. Durant le développement de mon projet de maîtrise, ainsi que la rédaction de mon article et de ce mémoire, ses conseils et ses corrections m'ont beaucoup aidée à apprendre. Sa rigueur et détermination m'ont finalement permis de terminer mon projet de maîtrise en 2 ans, avec un article comme produit final.

Merci beaucoup à la Fondation Armand-Frappier pour le financement qu'elle m'a accordé pendant la durée de ma maîtrise, ainsi qu'au CHPI pour la bourse de voyage qu'il m'a été octroyé afin de participer à mon premier congrès hors Québec.

Merci à Marcel Desrosiers, qui avec patience m'a montré tout ce que j'avais besoin pour mon projet en microscopie confocale.

J'aimerai aussi remercier mes collègues au labo, en commençant avec Christine qui est devenue ma première amie au laboratoire; Je te remercie énormément pour ta patience et le support que tu m'as accordé pendant toutes ces années, et merci encore pour lire tous mes écrits. Merci à Neda, qui avec sa douce manière du voire le monde, me donne des espoirs et me fait croire que nous pouvons travailler en science sans devenir des machines à sarcasme. Merci aux membres passés du labo, Adrien (je te l'avais dit, j'ai fini en 2 ans!!), Christelle et Lydie (vous me manquez tellement souvent).

Je ne peux pas oublier les membres des autres labos, qui m'ont aidée soit à trouver une solution à mes problèmes (scientifiques ou pas) ou soit à parler jusqu'à que je les oublies, merci à vous (vous savez qui vous êtes ☺). Merci en particulier à deux membres du laboratoire Pearson, Alex qui me donne des forces quand je n'en trouve pas dans mon cerveau, et Caro qui m'aident à faire d'un appartement un « chez moi », je vous aime fort vous deux.

Mais surtout, j'aimerai remercier ma famille, et ici je prends la liberté d'écrire en espagnol : a mi familia, que me hace falta todos los días, y aún más en invierno, a ellos que hacen el esfuerzo de saber de que hablo y porqué estoy un sábado, un domingo o la víspera de Navidad en un laboratorio, a ustedes, gracias, estoy acá y soy quien soy gracias a ustedes.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	II
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	IX
INTRODUCTION.....	1
RÉVUE DE LITTÉRATURE	4
1. LE MACROPHAGE	5
2. IMMUNITÉ ADAPTATIVE ET INNÉE.....	5
2.1 <i>Immunité innée</i>	5
2.2 <i>Immunité adaptative</i>	6
2.3 <i>Phagocytose</i>	6
3. RÉCEPTEURS ET LIGANDS.....	7
3.1 <i>Récepteurs opsoniques</i>	7
3.2 <i>Récepteurs non opsoniques</i>	8
4. SIGNALISATION CELLULAIRE	11
4.1 <i>SFKs et Syk protéine tyrosine kinases</i>	12
4.2 <i>Les tyrosines phosphatases</i>	13
4.2.1 <i>Les PTPs classiques basée en cystéine (Classe I)</i>	13
4.2.2 <i>La protéine phosphatase contenant le domaine d'homologie SH2 (SHP-1)</i>	
14	
5. LA MATURATION DU PHAGOSOME	16
5.2 <i>Formation du phagosome</i>	16
5.2 <i>Le phagosome précoce</i>	17
5.3 <i>Le phagosome tardif et le phagolysosome</i>	18
5.4 <i>Le protéome et le phosphoprotéome du phagosome</i>	21
6. ÉCHAPPEMENT DE LA PHAGOCYTOSE ET DE LA MATURATION DU PHAGOSOME PAR DES AGENTS PATHOGÈNES.	24
6.1 <i>Échappement de la phagocytose</i>	24

6.2 Arrêt de la maturation du phagosome.	25
6.3 Redirection de la maturation du phagosome.	26
ARTICLE	31
ABSTRACT	33
INTRODUCTION	34
MATERIALS AND METHODS	36
RESULTS	40
DISCUSSION	44
ACKNOWLEDGEMENTS	47
FOOTNOTES	48
REFERENCES	49
FIGURE LEGENDS	58
DISCUSSION	62
1. LOCALISATION DE SHP-1	63
2. FONCTION DE LA PROTEINE LIEE A SA LOCALISATION	64
3. SHP-1 COMME REGULATEUR DES INTERACTIONS ENTRE LES ENDOSOMES ET LES LYSOSOMES	66
4. SHP-1 COMME PROTEINE ADAPTATRICE : L'IMPORTANCE DES DOMAINES D'HOMOLOGIES.	69
CONCLUSION	71
ANNEXE A	73
ANNEXE B	75
ANNEXE C	77
RÉFÉRENCES	79

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Structure fonctionnelle et tridimensionnel de la protéine SHP-1.....	15
Figure 2. Localisation subcellulaire des protéines Rab GTPases.	22
Figure 3. Schéma des évènements de fusion pendant la biogenèse du phagolysosome.	23
Figure 4. Le protéome du phagosome.	27
Figure 5. Le phosphoprotéome total de la cellule.....	28
Table 1. Résumé des récepteurs opsoniques et non opsoniques.....	10
Table 2. Quelques protéines tyrosines kinases et phosphatases impliquées dans la régulation de la phagocytose médiée par FcγR1	19
Table 3. Exemples des agents pathogènes intracellulaires qui échappent le processus de la maturation du phagosome.....	30

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- ADN** : acide désoxyribonucléique
- ADP** : adénosine diphosphate
- APLT** : aminophospholipide transférase
- ARF** : facteur de ribosylation avec ADP 1
- BMMs** : macrophages dérivés de la moelle osseuse
- CathD** : cathepsine D active
- CPA** : cellule présentatrice de l'antigène
- CpG** : —C—phosphate—G—
- CR** : récepteur du complément
- CSF** : facteur stimulateur de colonies
- dsPTP**: protéine tyrosine phosphatase avec double substrat
- EE** : endosome précoce
- EEA1** : antigène des endosomes précoces 1
- ESX**: "early secretory antigenic target 6 system"
- Flot1**: flotilline 1
- GH**: hormone de croissance
- GTP**: guanosine triphosphate
- IFN** : interféron
- ITAMs**: motif immunorécepteur d'activation basée en tyrosine
- IgG**: immunoglobuline G
- JAK**: Janus kinase
- LAD**: syndrome de déficience d'adhésion des leucocytes de type I
- LAMP-1**: protéine associée à la membrane lysosomale 1
- LE** : endosome tardif

LM: litter mate

LMPTP: protéine tyrosine phosphatase de faible poids moléculaire

LPG : lipophosphoglycan en surface

LPS : lipopolysaccharide

LY : lysosome

MØ : macrophage

MAPK : protéine kinase activée par des mitogènes

MptpB : protéine tyrosine phosphatase de *Mycobacterium tuberculosis* B

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF-κB : facteur nucléaire kappa des cellules B activées

NK : cellules “natural killer”

NRPTP : protéine tyrosine phosphatase de type non récepteur

NSF : facteur sensible au N-ethylmaleimide

OmpA : protéine de membrane externe A

PAMPs : patrons moléculaires associés aux agents pathogènes

PI : phosphatidylinositol

PIR-B: “paired Ig-like receptor”

PI3-K: phosphatidylinositol 3-kinase

PLC: phospholipase C

Pre CathD : précurseur de la cathepsine D

PRRs : récepteurs de reconnaissance des patrons

PS: phosphatidylserine

PTK: protéine tyrosine kinase

PTP: protéine tyrosine phosphatase

PTP-1B: protéine tyrosine phosphatase 1B

PTP-MEG2: protéine tyrosine phosphatase des mégacaryocytes 2

RE: réticulum endoplasmique

RPTP : protéine tyrosine phosphatase de type récepteur

SapM : phosphatase acide de *Mycobacterium tuberculosis*

SH2 : domaine d'homologie à Src 2

SH2-C : domaine SH2 du côté C-terminal

SH2-N : domaine SH2 du côté N-terminal

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

SNARs: protéine de type récepteur d'attachement au facteur sensible au N-ethylmaleimide

SR: récepteur de type « scavenger »

SRBC: globule rouge de mouton

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

STAT: transducteur du signal et activatuer de la transcription

SVF: sérum de veau foetal

TC-PTP: protéine tyrosine phosphatase des cellules T

TLR: récepteur de type Toll

TNF: facteur de nécrose tumorale

TTS : système de sécrétion de type III

v-ATPase: ATPase de type vacuolaire

INTRODUCTION

La phagocytose est un processus par lequel les cellules internalisent des particules ou des agents pathogènes présents dans le milieu extracellulaire. Cette internalisation est déclenchée par l'interaction de plusieurs ligands avec leurs récepteurs respectifs, présents à la surface des phagocytes. Les particules sont entourées par des pseudopodes et suite à l'internalisation, se retrouvent dans des phagosomes. Le phagosome formé mature rapidement pour devenir un phagolysosome où le matériel phagocyté est dégradé.

La biogenèse du phagolysosome est un processus dynamique, nécessitant l'action coordonnée de multiples molécules de signalisation qui vont réguler les interactions entre le phagosome et le cytosquelette, ainsi que les endosomes et les lysosomes (Jutras *et al.*, 2005; Ng Yan Hing, Desjardins et Descoteaux, 2004; Trost, M. *et al.*, 2010; Vieira, Botelho et Grinstein, 2002). Ces interactions sont transitoires et engendrent la formation de petits pores de fusion entre les organelles, ce qui permet l'échange membranes ainsi que de leur contenu (Desjardins, 1995). L'acidification du phagosome et l'acquisition séquentielle de plusieurs hydrolases culminent en la génération d'un environnement hautement hydrolytique (Garin *et al.*, 2001; Haas, 2007). Ce processus est très rapide, puisqu'entre 90 minutes et 2 heures, les phagosomes acquièrent les fonctions du phagolysosome.

La phosphorylation des tyrosines est un mécanisme important dans le contrôle de nombreux processus physiologiques chez les eucaryotes (Hunter, 2009) incluant les fonctions du cytosquelette, la transduction de signaux, le trafic intracellulaire et la réponse immunitaire (Hunter, 2009; Tonks et Neel, 1996). Récemment, une étude protéomique et phosphoprotéomique quantitative a démontré une accumulation marquée des résidus tyrosine phosphorylés au phagosome (Trost, Matthias *et al.*, 2009) en comparaison avec le phosphoprotéome global (Olsen *et al.*, 2006), ce qui suggère un rôle important de cette phosphorylation dans la signalisation au niveau des phagosomes. Ayant un rôle important dans le contrôle des niveaux de phosphorylation des résidus tyrosines (Tonks et Neel, 1996), les protéines tyrosines phosphatases (PTPs) pourraient alors jouer un rôle dans la régulation de la fonction phagosomale. C'est le cas de la protéine tyrosine phosphatase des mégacaryocytes 2 (PTP-MEG2), qui est présente dans le lumen des vésicules sécrétoires. Suite à la fusion de ces vésicules avec les phagosomes et des neutrophiles, PTP-MEG2 module la guanosine triphosphate (GTP)ase Rab28 et du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, et régule ainsi la maturation du phagosome (Kruger, J. M. *et al.*, 2002).

La protéine tyrosine phosphatase possédant un domaine d'homologie à SH2 1 (SHP-1) est hautement exprimée dans les cellules hématopoïétiques. Chez les macrophages, SHP-1 participe à de nombreux processus tels que les réponses inflammatoires et immunitaires (Abu-Dayyeh *et al.*, 2008; An *et al.*, 2008; Hardin *et al.*, 2006; Kant *et al.*, 2002). Il a été démontré que SHP-1 est associée aux phagosomes (Boulais *et al.*, 2010; Strzelecka-Kiliszek, Kwiatkowska et Sobota, 2002), ce qui permet de considérer un rôle pour cette protéine dans la biogenèse des phagolysosomes.

L'objectif général de cette étude était d'éclaircir le rôle de SHP-1 lors de la biogenèse du phagolysosome. Pour ce faire, nous avons entrepris de répondre aux objectifs spécifiques suivants:

1. Déterminer la cinétique de recrutement de SHP-1 dans les phagosomes de macrophages murins.
2. Déterminer l'impact de la protéine SHP-1 chez les macrophages murins dans la maturation du phagosome.

Le corps de cette dissertation débutera par une revue de la littérature concernant les principaux thèmes abordés dans le cadre de ce projet de recherche, soit le macrophage, la signalisation cellulaire, la maturation du phagosome et différents mécanismes d'évasion immunitaire par certains parasites ciblant la maturation du phagosome via les protéines tyrosines phosphatases. Un article scientifique englobant les principaux résultats obtenus lors de ce projet et ayant été soumis au *Journal of Immunology* suivra enfin la revue de littérature. Nos résultats montrent que SHP-1 joue un rôle dans la maturation du phagosome et qu'elle est nécessaire pour l'acidification de l'organelle.

RÉVUE DE LITTÉRATURE

1. Le macrophage

Les macrophages (du grec : « grand mangeur », *makros* = *grand*, *phagein* = *manger*) sont des cellules infiltrant les tissus, décrites pour la première fois par Elie Metchnikoff en 1883. Ils proviennent de la différenciation des monocytes, cellules qui occupent une place centrale dans l'homéostasie, la défense innée de l'hôte et l'induction de réponses adaptatives (Gordon, S. et Taylor, 2005). Aussi connues comme des phagocytes professionnels, ces cellules sont spécialisées dans l'élimination de débris cellulaires, de cellules apoptotiques, nécrotiques et sénescents, ainsi que de différents agents pathogènes. Cette élimination a lieu suite à l'activation des macrophages, leur offrant de puissants mécanismes microbicides. De plus, ces cellules sont aussi des cellules présentatrices d'antigène (CPA) exceptionnelles. Grâce à leurs diverses fonctions, les macrophages jouent un rôle primordial dans la destruction des agents pathogènes et le contrôle des infections. Cependant, malgré l'efficacité des macrophages à combattre les infections, plusieurs microorganismes pathogènes ont développé des stratégies visant à modifier l'activité des macrophages.

2. Immunité adaptative et innée

2.1 Immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Elle permet leur reconnaissance via des structures conservées, contrairement au système immunitaire adaptatif (Kawai et Akira, 2010). L'immunité innée humorale implique la voie du complément, ainsi que les anticorps naturels. L'immunité innée cellulaire implique différents types cellulaires tels que les phagocytes professionnels. Finalement, l'immunité innée intracellulaire implique la reconnaissance d'antigènes, induisant l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines, et impliquant la mort cellulaire par apoptose. Ces réponses sont rapides et ont pour but de limiter l'infection jusqu'à ce que les cellules effectrices de la réponse immunitaire adaptative puissent combattre l'infection. Chez les animaux, ainsi que chez les plantes, la présence de motifs conservés du système immunitaire inné démontre leur importance au niveau de la défense de l'hôte (Iwasaki et Medzhitov, 2010; Kawai et Akira, 2010; Medzhitov et Janeway, 2000; Medzhitov et Janeway, 2002).

2.2 Immunité adaptative

Les principaux protagonistes de l'immunité adaptative sont les lymphocytes B et T. Ces cellules possèdent des récepteurs de surface, générés de façon aléatoire, qui ont une spécificité unique pour des antigènes particuliers (Iwasaki et Medzhitov, 2010; Palm et Medzhitov, 2009). Une fois les antigènes reconnus par ces récepteurs, ces lymphocytes débutent une expansion de type clonale. Une population de cellules effectrices hautement spécifiques en résulte, menant à la résolution de l'infection. Finalement, la réponse immunitaire adaptative se termine par l'acquisition d'une population de lymphocytes mémoires, prêts à défendre l'organisme contre des infections futures. Ceci permet une réponse de longue durée envers des microorganismes pathogènes. Cependant, un délai ou une modulation de la présentation antigénique peut affecter de façon sévère la réponse adaptative. La modulation du système immunitaire par différents agents pathogènes peut mener, dans certains cas, à une maladie sévère chez l'hôte.

2.3 Phagocytose

La phagocytose joue un rôle primordial dans le processus de défense contre des microorganismes, et est considérée comme un des processus les plus dynamiques de la réponse innée (Aderem et Underhill, 1999a; Stuart, Lynda M. et Ezekowitz, 2008). Elle est définie comme le processus d'englobement d'un agent pathogène, de cellules apoptotiques, ou d'une particule avec une taille d'au moins 1 μm de diamètre, accompagnée par certains changements au niveau membranaire qui permettent la formation du phagosome. Une fois formée, cette organelle démontrera des changements de type biochimiques par lesquels le phagosome acquiert ses caractéristiques microbicides et hydrolytiques (Flannagan, Cosio et Grinstein, 2009; Greenberg, 1995). Les phagocytes professionnels, comme les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages, deviennent alors des acteurs très importants de la réponse immunitaire. En plus de servir comme une des premières lignes de défense contre plusieurs microorganismes pathogènes, la phagocytose joue un rôle crucial dans la dégradation des cellules apoptotiques et des débris cellulaires lors de la mort cellulaire.

3. Récepteurs et ligands

Il existe de multiples ligands de haute affinité capables d'induire la phagocytose, séparés en deux catégories principales : opsonisés et non opsonisés (Tableau 1). Ces derniers interagissent avec des ligands endogènes aux agents pathogènes (Ofek *et al.*, 1995). Ces interactions comprennent les liaisons avec des récepteurs de lectine, des récepteurs de type « scavenger » (SR), et des récepteurs de phosphatidylserine (Taylor *et al.*, 2005). D'un autre côté, les récepteurs opsoniques interagissent avec des composants solubles, nommés opsonines, tels que les immunoglobulines et le complément (Sobota *et al.*, 2005). La présence d'opsonines augmente l'index de phagocytose, c'est-à-dire la quantité de particules de microorganismes phagocytés par cellule. Certains microorganismes exploitent les opsonines afin d'être internalisés par les cellules phagocytiques, qui leur offrent ainsi une niche protégée de la réponse immune adaptative de l'hôte (Drecktrah *et al.*, 2006; Flannagan, Cosio et Grinstein, 2009; Underhill et Ozinsky, 2002).

3.1 Récepteurs opsoniques.

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

Les anticorps de type IgG sont attachés aux particules étrangères via le domaine Fab. La portion Fc demeure exposée, permettant sa reconnaissance par les récepteurs Fc (Fc R) présents à la surface des phagocytes en déclenchant la phagocytose. À ce jour, trois classes différentes de Fc R ont été décrites : Fc RI, Fc RII et Fc RIII. Fc RI est une

glycoprotéine de 72 kDa qui est capable de détecter des IgG de type monomérique ainsi que de type agrégé. Une caractéristique des FcγRI est la présence de domaines Ig extracellulaires et leur expression constitutive chez les monocytes et les macrophages (Ravetch et Bolland, 2001; Ravetch et Kinet, 1991; Strzelecka, Kwiatkowska et Sobota, 1997).

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

3.2 Récepteurs non opsoniques

Les récepteurs de mannose, les récepteurs de type SR, ainsi que les récepteurs de phosphatidylserine (PS) sont les récepteurs non opsoniques les mieux décrits à ce jour. En plus de les récepteurs mentionnées, presque toutes les cellules du système immunitaire présentent des récepteurs de reconnaissance de patrons (PRRs) (Kawai et Akira, 2010; Takeuchi et Akira, 2010), reconnaissant des patrons moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs) (Akira et Hemmi, 2003; Tsan et Baochong Gao, 2007).

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

2004). Elle a aussi été impliquée dans la production du facteur de nécrose tumorale (TNF) α , une cytokine pro-inflammatoire (Brown, 2006), et dans la phagocytose chez les macrophages (Herre, Gordon et Brown, 2004).

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

La phagocytose de cellules apoptotiques est effectuée à travers la reconnaissance de PS, normalement absente de la surface des cellules non-apoptotiques. Celle-ci est activement restreinte au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique grâce à l'aminophospholipide transférase (APLT). Lors de la phagocytose, la PS est exposée à la surface cellulaire suite à la régulation à la baisse de l'APLT et la régulation à la hausse d'une enzyme que permet la translocation de la PS du côté cytosolique au côté externe (Botto, 2004). Selon plusieurs études, la reconnaissance de la PS est faite à travers des récepteurs spécifiques et il était aussi démontré que ces récepteurs régulent la phagocytose des cellules nécrotiques et apoptotiques (Kuraishi *et al.*, 2007; Wu, Tibrewal et Birge, 2006; Fadok *et al.*, 2000; Verhoven, Schlegel et Williamson, 1995).

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

Tableau 1. Résumé des quelques récepteurs opsoniques et non opsoniques¹.

	Récepteur		Ligand
Récepteurs opsoniques	Fc	FcyRI (CD64)	IgG monomérique
		FcyRII (CD32)	IgG monomérique
		FcyRIII (CD16)	IgG monomérique
	Complément	CR1 (CD35)	Particules opsonisées avec: MBL, Clq, C4b, C3b
		CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18, Mac1)	Particules opsonisées avec iC3b
	Intégrines	$\alpha_5\beta_1$ (CD49e/CD29)	Particules opsonisées avec fibronectine ou vitronectine
		$\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29)	Particules opsonisées avec fibronectine ou vitronectine
		$\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61)	Particules opsonisées avec fibronectine ou vitronectine
	Récepteurs non opsoniques	Du type « scavenger »	SR-A I/II
MARCO			Bactéries Gram ^{+/} ; acide lipoteichoïque, ADN CpG, endotoxines.
Mannose			Hautes structures de mannose
Dectine-1			β 1,3- and β 1,6-glucan
Phosphatidylserine			Phosphatidylserine

¹ Adapté de (Aderem et Underhill, 1999b; Areschoug et Gordon, 2009; Ofek *et al.*, 1995; Underhill et Ozinsky, 2002).

N-terminale ciblé au réticulum endoplasmique pendant sa synthèse. Il a été démontré que TLR3 reconnaît l'ARN double-brin (un produit viral) ; TLR4 est un récepteur essentiel pour la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) ; TLR7 peut reconnaître des petites molécules qui modifient la réponse immunitaire, telles que l'imiquimod ainsi que les ARN simple-brin; TLR9 pour sa part, reconnaît des motifs CpG non méthyles de l'ADN, retrouvés fréquemment chez les bactéries et les virus (Akira et Hemmi, 2003; Kawai et Akira, 2010). Après l'internalisation des agents pathogènes, les TLRs induisent l'expression de gènes pro-inflammatoires. Plusieurs études ont démontré que les TLRs ne sont pas nécessaires à l'initiation de la phagocytose (Peiser *et al.*, 2002). Cependant, il est clair qu'ils sont nécessaires à la réponse post-phagocytose (Underhill et Ozinsky, 2002) et qu'ils peuvent moduler l'expression des autres récepteurs phagocytiques (Blander et Medzhitov, 2004).

4. Signalisation intracellulaire

Plusieurs voies de signalisation sont contrôlées par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation. Les différentes voies régulées par les récepteurs mentionnés auparavant n'y font pas exception. Cependant, nous nous concentrerons plutôt sur les voies liées aux récepteurs Fc γ R. Malgré que la régulation de la phosphorylation des résidus tyrosine se fasse autant par les kinases que les phosphatases, la plupart des études se sont concentrées sur les kinases impliquées dans la signalisation intracellulaire. La première protéine tyrosine phosphatase (PTP) a été purifiée et clonée environ dix ans après la découverte de la première protéine tyrosine kinase (PTK) (Alonso *et al.*, 2004). Néanmoins, plusieurs études récentes démontrent l'importance des PTPs au niveau de la signalisation intracellulaire (Neel et Tonks, 1997; Zhang, Jinyi, Somani et Siminovitch, 2000; Zhang, Zhong-Yin, 2005; Zhang, Zhong-Yin, Zhou et Xie, 2002). Cette revue de littérature sera focalisée sur les familles de PTKs de types Src et Syk, ainsi que sur la famille de PTPs de type non récepteur. Les phosphotyrosines représentent seulement 0.1% des acides aminés phosphorylés, mais jouent un rôle très important au niveau de la signalisation intracellulaire (Stoker, 2005). La phagocytose n'en fait pas exception, avec des kinases et des phosphatases régulatrices du cytosquelette d'actine chez les macrophages, ainsi que de la formation des pseudopodes (Baruzzi, Cavegion et Berton,

2008; Pixley et Stanley, 2004). Le tableau 2 présente un résumé des kinases et des phosphatases ayant des rôles démontrés au niveau de la phagocytose.

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

Suite à l'attachement de ligands et le recrutement de récepteurs, l'activation de ses derniers nécessite une phosphorylation spécifique au niveau des résidus de tyrosine contenus dans les motifs immunorécepteurs d'activation basées en tyrosine (ITAMs). La phosphorylation est initiée par le recrutement de la famille des kinases Src (SFKs) qui sont à proximité des récepteurs (Strzelecka-Kiliszek, Kwiatkowska et Sobota, 2002). L'importance de ces kinases dans la phagocytose médiée par les Fc γ R a été mise en évidence dans les études avec des souris déficientes en trois kinases. Les macrophages dérivés de souris déficientes en Fgr, Hck et Lyn montrent un problème majeur dans les réponses fonctionnelles et de signalisation, incluant une baisse de la phosphorylation des tyrosines et dans l'efficacité de la phagocytose (Fitzer-Attas *et al.*, 2000).

Normalement, les kinases Src demeurent inactives en raison d'interactions intramoléculaires entre leur tyrosine C-terminale phosphorylée et leur propre domaine SH2. Ceci permet à la protéine de se replier et de bloquer l'accès des substrats à son site catalytique (Garcia-Garcia et Rosales, 2002). L'activation de la famille Src implique la déphosphorylation de la tyrosine C-terminale pour sortir de son état inactif, et cette déphosphorylation est complétée par la phosphatase CD45 ainsi que des interactions protéine-protéine qui mènent à l'autophosphorylation. Cette dernière active certaines phosphatases qui complètent la déphosphorylation initiale (Garcia-Garcia et Rosales, 2002). Cette activation déclenche le recrutement d'autres protéines qui présentent des domaines SH2, comme la tyrosine kinase de la rate, Syk (Strzelecka-Kiliszek, Kwiatkowska et Sobota, 2002). La phagocytose médiée via Fc γ R a besoin de l'activation de Syk; il a été montré que les macrophages déficients en Syk présentent un défaut dans la phagocytose de particules opsonisées avec des IgG, ainsi qu'un défaut dans la signalisation par Fc γ R (Crowley *et al.*, 1997; Kiefer *et al.*, 1998). Les kinases Syk activées permettent au processus de phagocytose de continuer en interagissant avec d'autres molécules en aval, par exemple la phosphatidylinositol (PI) 3-kinase (PI3-K), la phospholipase C (PLC) et des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPKs).

4.2 Les tyrosines phosphatases

La famille des tyrosines phosphatases peut être divisée en 4 groupes : Les PTPs récepteurs classiques (RPTPs) (Andersen *et al.*, 2004); les PTPs non récepteurs classiques (NRPTPs); les PTPs de double spécificité (dsPTPs) et les PTPs de faible poids moléculaire (LMPTP) (Alonso *et al.*, 2004). Les RPTPs et les NRPTPs sont regroupés sous la classe I des PTPs et seront décrites plus en détails:

4.2.1 Les PTPs classiques basées en cystéine (classe I)

Chez l'humain, il existe 99 PTPs classiques, dont 38 appartenant à la classe I. Toutes ont des orthologues chez la souris. C'est à cause de la haute spécificité de substrat (résidu tyrosine) que chez PTPs sont reconnues comme des PTPs classiques. Toutes les phosphatases de classe I ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Lim et Pawson, 2010), basée sur des structures similaires. Selon la localisation intracellulaire, ces PTPs sont divisées en type récepteur, localisées surtout au niveau de la membrane plasmique, ou en type non récepteur, se retrouvant dans plusieurs compartiments cellulaires ainsi que dans le cytosol. Tel que mentionné auparavant, ces PTPs jouent un rôle au niveau de la phagocytose et du chimiotactisme chez les macrophages, mais aussi au niveau de l'adhésion cellulaire à d'autres cellules ou au substrat, et au niveau du développement cellulaire. PTP-1B, une protéine de 50 kDa et la première PTP à être isolée (Frangioni *et al.*, 1992), est connue pour son rôle dans la réponse à l'insuline, ainsi que dans la signalisation via les intégrines (Elchebly *et al.*, 1999). TC-PTP, une protéine de 45 kDa, est l'homologue le plus proche de PTP-1B. Tandis que PTP-1B est localisée dans le réticulum endoplasmique (RE), TC-PTP possède un signal de localisation intracellulaire, mais peut aussi s'attacher au RE et à la membrane plasmique selon le stimulus. Les deux enzymes reconnaissent des substrats différents mais régulent des voies similaires. C'est le cas de la voie de signalisation de l'interféron γ (IFN- γ), où PTP-1B et TC-PTP régulent l'activité des Janus kinases (JAK) Jak2 et Jak1, respectivement, ou de la réponse à l'hormone de croissance (GH), dont TC-PTP régule Jak2 ainsi que le transducteur du signal et activateur de la transcription 5 (STAT5) tandis que PTP-1B régule STAT1 (Bourdeau, Dube et Tremblay, 2005). Malgré le chevauchement des voies de signalisation que régulent ces phosphatases, il a été démontré que leurs rôles ne sont pas redondants au niveau de la voie de l'IFN- γ chez les macrophages. Leur absence simultanée confère un phénotype létal lors de l'embryogenèse. Chez un hétérozygote

pour une double déficience en PTP-1B et TC-PTP, les macrophages sont hautement sensibles à l'IFN- γ . Finalement, en cas d'absence d'une des deux enzymes, le développement de l'organisme est complètement normal (Heinonen *et al.*, 2009).

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

SHP-1 est une protéine de 65 kDa qui est exprimée principalement, mais pas exclusivement, dans les cellules hématopoïétiques (Bouchard *et al.*, 1994; Neel et Tonks, 1997; Su, L. *et al.*, 1996). SHP-1 a la caractéristique d'avoir deux domaines d'homologie SH2, un des motifs de reconnaissance des tyrosines phosphorylés les plus importants. Les deux domaines sont localisés dans la partie N-terminale de la protéine (Figure 1). Normalement, les deux motifs SH2 induisent le repliement de la protéine, cachant le site catalytique de la protéine et la rendant inactive. Suite à un signal d'activation, la protéine subit des changements conformationnels qui exposent le site catalytique. La structure de la protéine SHP-1 a été étudiée par cristallographie par Yang et son équipe en 2003. Puis en 2011, Wang et son équipe ont réussi à produire un modèle par cristallographie dont le site catalytique est ouvert (Fig. 1) (Wang *et al.*, 2011; Yang, Jian *et al.*, 2003), et un modèle de la restructuration conformationnelle a été proposé. SHP-1 partage 60% d'identité avec la PTP SHP-2. Le domaine SH2 C-terminal (SH2-C) de ces protéines est hautement mobile, ce qui suggère que ce domaine est en charge de la recherche des phosphopeptides pour l'activation de l'enzyme lors des étapes initiales d'activation. Le domaine SH2 N-terminal (SH2-N) serait pour sa part en charge de la régulation de plusieurs événements de déphosphorylation, tel au niveau de la transduction de la signalisation, par exemple en aval du récepteur d'interleukine 3 (Paling et Welham, 2002) et de quelques immunorécepteurs (D'Ambrosio *et al.*, 1995). Finalement, SHP-1 joue un rôle au niveau de la différenciation des cellules gliales, au niveau de certaines fonctions des cellules dendritiques (Ramachandran *et al.*, 2011) ainsi que dans l'activation de la kinase Src et des (MAPK) dépendent de RAS (Frank *et al.*, 2004).

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

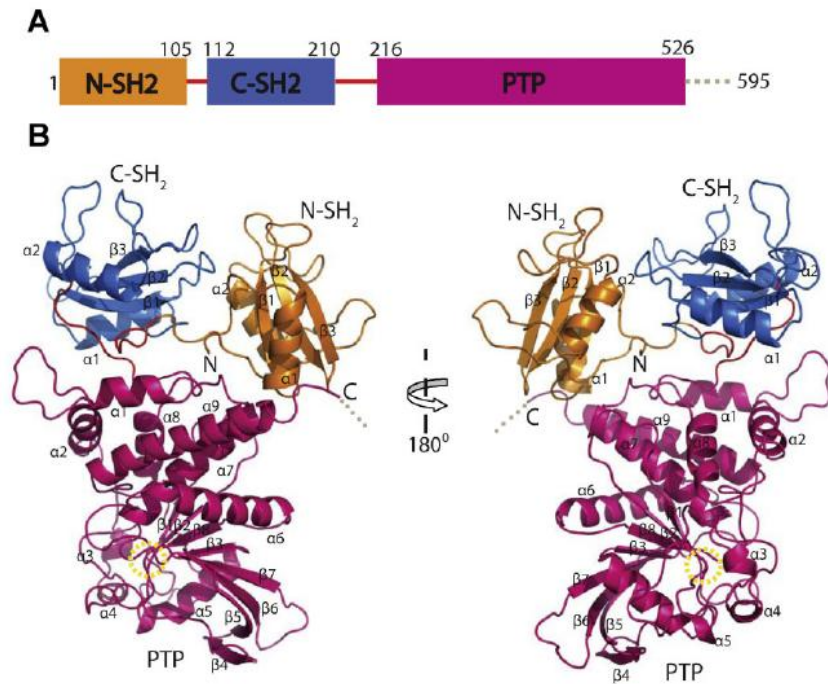


Figure 1. Structure fonctionnelle et tridimensionnelle de la protéine SHP-1. *A.* Les deux domaines SH2 sont représentés, avec le domaine SH2 N-terminal (SH2-N) en orange, le domaine SH2 interne (SH2-C) en bleu marin, et le domaine PTP en fuchsia. Les unions entre chaque domaine sont en rouge. La ligne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

Ces souris présentent des défauts au niveau du recrutement des prothymocytes, soit une réponse de cellules T et B défectueuse et un problème au niveau des cellules « natural killers » (NK) (Tsui *et al.*, 1993). De plus, ces souris montrent une réponse inflammatoire exacerbée ainsi qu'une espérance de vie courte (Shultz et Green, 1976). Malgré que la souris ^{me}/_{me} soit un modèle exceptionnel pour l'étude du rôle de SHP-1, les limites de ce modèle animal, ont mené à la production de multiples lignés immortalisées.

C'était le cas en 2001, quand Forget et collaborateurs (Forget, Geneviève *et al.*, 2001) ont immortalisé des lignées de macrophages dérivés de la moelle osseuse des souris ^{me}/_{me} ainsi que des souris de type sauvage, nommées respectivement *me* et litter mate *me* (LM*me*). Cette même équipe a démontré que l'activation de SHP-1 est induite par

l'infection avec *Leishmania* pour inactiver la voie JAK/STAT, via l'interaction avec JAK2 (Blanchette *et al.*, 1999). Ceci n'est pas la première étude montrant que SHP-1 est utilisée par des parasites pour moduler la réponse de l'hôte (Hauck *et al.*, 1999; Knutson *et al.*, 1998), démontrant que SHP-1 joue un rôle très important dans la réponse immunitaire de l'hôte. Cependant, à ce jour, son rôle dans la maturation des phagosomes n'a toujours pas été démontré. Comme mentionnée auparavant, des autres PTPs de la même classe de SHP-1 semblent exercer un rôle lors de l'acidification du phagosome.

5. La maturation du phagosome

5.2 Formation du phagosome

Le phagosome est formé lorsque le phagocyte reconnaît une particule et qu'une portion de sa membrane s'invagine au point de contact avec la particule. La membrane se referme autour de la particule, et le phagosome est formé. Bien sûr, ce processus demande un remodelage de la membrane. Normalement, les événements de fusion membranaire sont contrôlés par des protéines telles que les Rab GTPases et d'autres protéines de type récepteur d'attachement au facteur sensible à la N-éthylmaleimide (NSF) aussi connues comme des SNAREs.

Les Rab GTPases sont des protéines qui contiennent des domaines hypervariables à leur extrémité C-terminale et qui présentent des modifications lipidiques post-transcriptionnelles, processus essentiels pour l'interaction correcte entre les protéines Rab et les membranes des différentes organelles (Figure 2) (Pfeffer et Aivazian, 2004). La localisation de chaque Rab permet de les utiliser comme des marqueurs spécifiques de membranes (Desjardins *et al.*, 1994), comme nous en discuterons plus loin.

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

Plusieurs modèles proposent que la formation du phagosome est contrôlée primordialement par la polymérisation d'actine, impliquée dans l'invagination de la membrane autour de la particule à phagocyter (Harrison *et al.*, 2003), ainsi que dans le trafic des phagosomes (Bohdanowicz *et al.*, 2010). Les modèles les plus anciens mentionnent aussi une diminution de la superficie de la membrane plasmique des phagocytes, une fois la particule internalisée. Cependant, plusieurs groupes ont démontré que les phagocytes peuvent internaliser de grosses particules sans diminuer la superficie de leur membrane plasmique (Booth, Trimble et Grinstein, 2001), ce qui indique que la perte de membrane plasmique est compensée par l'apport de membranes par d'autres compartiments intracellulaires.

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

5.2 Le phagosome précoce

Le phagosome naissant à la membrane plasmique ne possède aucune propriété microbicide. Le processus de maturation de cette organelle permet de les acquérir. Pendant ce processus, le phagosome subira des changements au niveau du pH luminal ainsi qu'au niveau du contenu protéique (Figure 5), qui permettront la dégradation des particules ou des microorganismes pathogènes phagocytés. Brièvement, le processus comprend la fusion du phagosome naissant avec des endosomes précoces, des endosomes tardifs et des lysosomes, ainsi que divers événements de fissions vésiculaires qui permettent de se débarrasser de certains constituants (Desjardins *et al.*, 1994; Desjardins *et al.*, 1997; Imbuluzqueta *et al.*, 2010). Cette séquence d'interactions a pour conséquence des changements morphologiques et biochimiques du phagosome, incluant l'acquisition d'enzymes, de pompes vacuolaires de protons ATPases et de NADPH oxydases.

La voie de maturation phagosomale interagit avec la voie endocytique et partage diverses caractéristiques de cette voie (Vieira, Botelho et Grinstein, 2002). La voie endocytique

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

C'est Rab5 qui, une fois activée, recrute les effecteurs en aval d'EEA1. EEA1, quant à lui, est un homodimère qui présente deux domaines de liaison à Rab5 et qui sert de pont entre deux endosomes précoces qui présentent Rab5 (Dumas *et al.*, 2001). En même temps, la phosphatidylinositol (PI) 3-kinase (PI3-K) de type III est aussi cruciale pour la production du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P). Le PI3P est synthétisé après la fermeture du phagosome, et il a été démontré qu'il est essentiel pour les étapes subséquentes de la maturation (Bohdanowicz *et al.*, 2010; Fratti *et al.*, 2001). Parmi les effecteurs de PI3P se trouvent la NADPH et EEA1. En effet, l'interaction d'EEA1 avec la membrane endosomale semble dépendre de la présence de PI3P et de Rab5 (Fratti *et al.*, 2001).

5.3 Le phagosome tardif et le phagolysosome

En comparaison avec les phagosomes précoces, les phagosomes tardifs ont un pH luminal beaucoup plus acide (pH 5.5- 6.0) et ne contiennent pas Rab5. Par contre, ce sont des organelles enrichies en composantes d'endosomes tardifs, tels que Rab7 et des protéines

associées aux membranes des lysosomes (LAMPs) (Huynh, Cassidy K. *et al.*, 2007; Vieira, Botelho et Grinstein, 2002; Vieira *et al.*, 2003).

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

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

À ce jour, il n'est pas entièrement clair comment Rab7 est recruté au phagosome. Des études récentes ont montré que Rab5 est échangé pour Rab7 pendant l'endocytose, un processus connu comme la « conversion de Rab » (Rink *et al.*, 2005). Le recrutement de Rab7 indépendant de la fusion vésiculaire a aussi été montré dans l'élimination de cellules apoptotiques chez les nématodes (Yu, Lu et Zhou, 2008). Un candidat potentiel pour la régulation de ce processus est le complexe d'assortiment des protéines vacuolaires et de fusion homotypique (HOPS), impliqué dans le recrutement de Rab7 pendant l'endocytose (Rink *et al.*, 2005). Toutefois, son rôle dans la maturation du phagosome n'a cependant pas été élucidé (Kinchen et Ravichandran, 2008).

Les LAMPs sont des protéines transmembranaires hautement glycosylées, qui comptent parmi les composantes les plus abondantes des lysosomes. Dû aux événements de fusion décrits auparavant, elles sont aussi présentes dans les phagosomes tardifs ainsi que dans les phagolysosomes (Eskelinen, Tanaka et Saftig, 2003).

Table 2. Quelques PTKs et PTPs impliquées dans la régulation de la phagocytose médiée par FcγR²

	Effet		
Kinases (PTKs)	SFK	Hck	BMMs déficients en Hck montrent une phagocytose réduite
		Fgr	Régulation négative de la phagocytose en association avec le complexe SIRPα-SHP-1
		Lyn	BMMs déficients en Lyn montrent une phagocytose réduite
		Src	Phosphorylation de FcγRIIA <i>in vitro</i>
		Fyn	Phosphorylation de FcγRIIA <i>in vitro</i>
		Syk	BMMs déficients en Syk sont incapables d'ingérer des particules opsonisées avec des IgG La sous-unité g n'est pas phosphorylée en absence de Syk dans les BMMs
Phosphatases (PTPs)		SHP-1	Surexpression de SHP-1 a comme effet une réduction de la phagocytose En association avec FcγRIIA, semble être capable d'abolir toute la phosphorylation des tyrosines dans la cellule. Régulation négative de la phagocytose en association avec SIRPα
		CD148	Des BMMs doublement déficients en CD148 et CD45 montrent une phagocytose réduite

¹ Modifié de (Park, Ishihara et Cox, 2011)

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

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

5.4 Le protéome et le phosphoprotéome du phagosome

Récemment, plusieurs équipes se sont penchées sur l'étude de la composition protéique du phagosome, via différentes techniques de protéomique. Une schématisation des protéines identifiées, classées selon leur organelle d'origine se trouve dans la figure 4. De nouvelles techniques d'isolation du phagosome permettent d'obtenir des échantillons de pureté élevée (Stuart, L. M. *et al.*, 2007). Des protéines considérées *a priori* comme des impuretés ont été identifiées comme originaires de l'interaction du phagosome avec l'autophagosome, tel que des protéines ribosomales (Sanjuan *et al.*, 2007). Une étude a démontré que la plupart des protéines trouvées dans le phagosome sont hautement conservées chez les eucaryotes, avec plus de 70% du protéome étant conservé (Boulais *et al.*, 2010). De plus, l'étude a mis en évidence que les propriétés fonctionnelles du phagosome sont possiblement apparues via un remodelage des protéines présentes, par l'addition de nouvelles composantes et par la duplication de protéines déjà existantes, produisant des machineries très complexes et d'origine mixte.

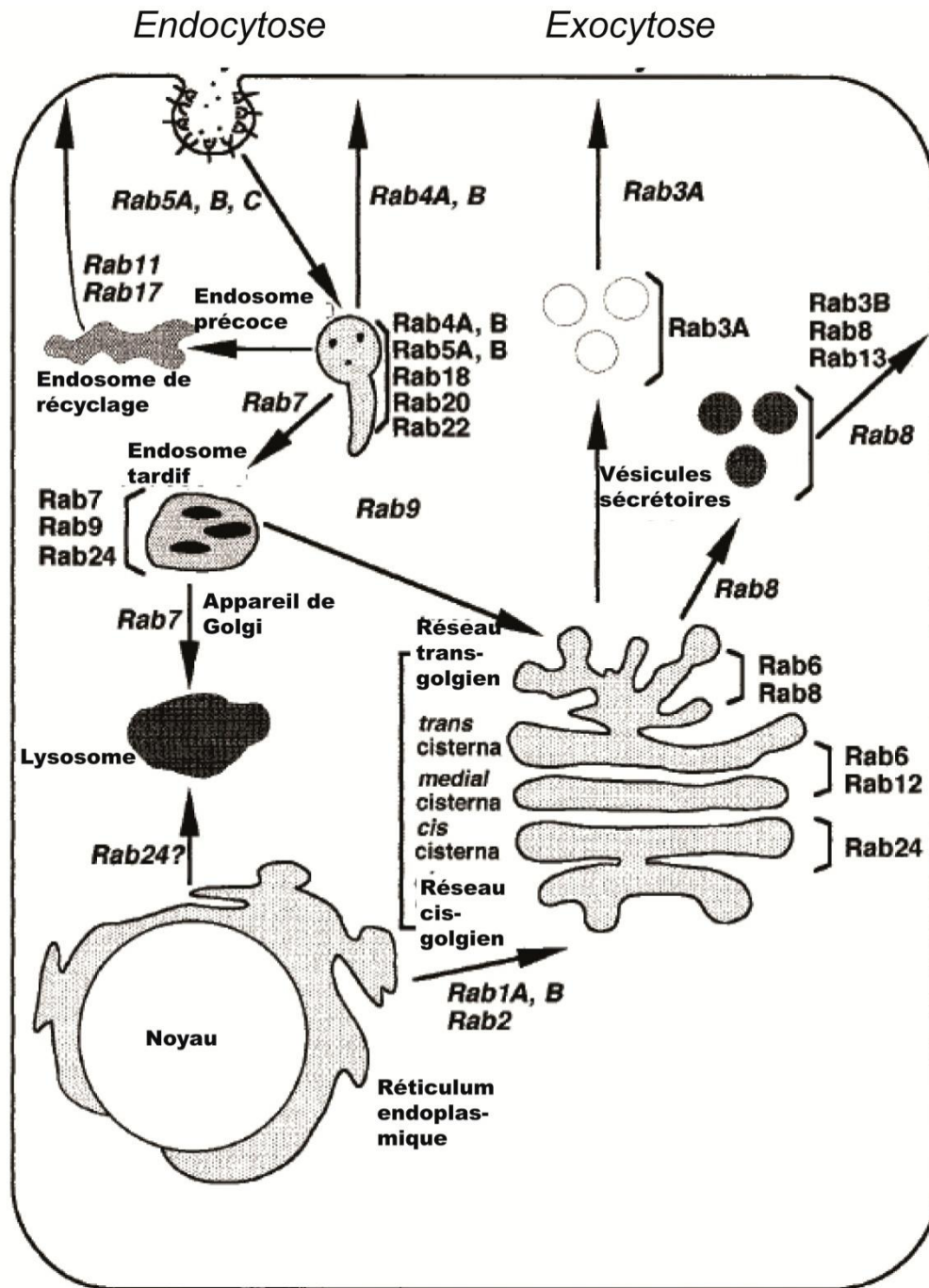


Figure 2. Localisation subcellulaire des protéines Rab GTPases.

Schéma représentant les différents compartiments constitués par l'association de membranes de la cellule et la distribution des Rab GTPases. Les noms en italique dénotent que la GTPase est nécessaire pour l'interaction décrit par les flèches. (Modifié de (Takai, Sasaki et Matozaki, 2001).

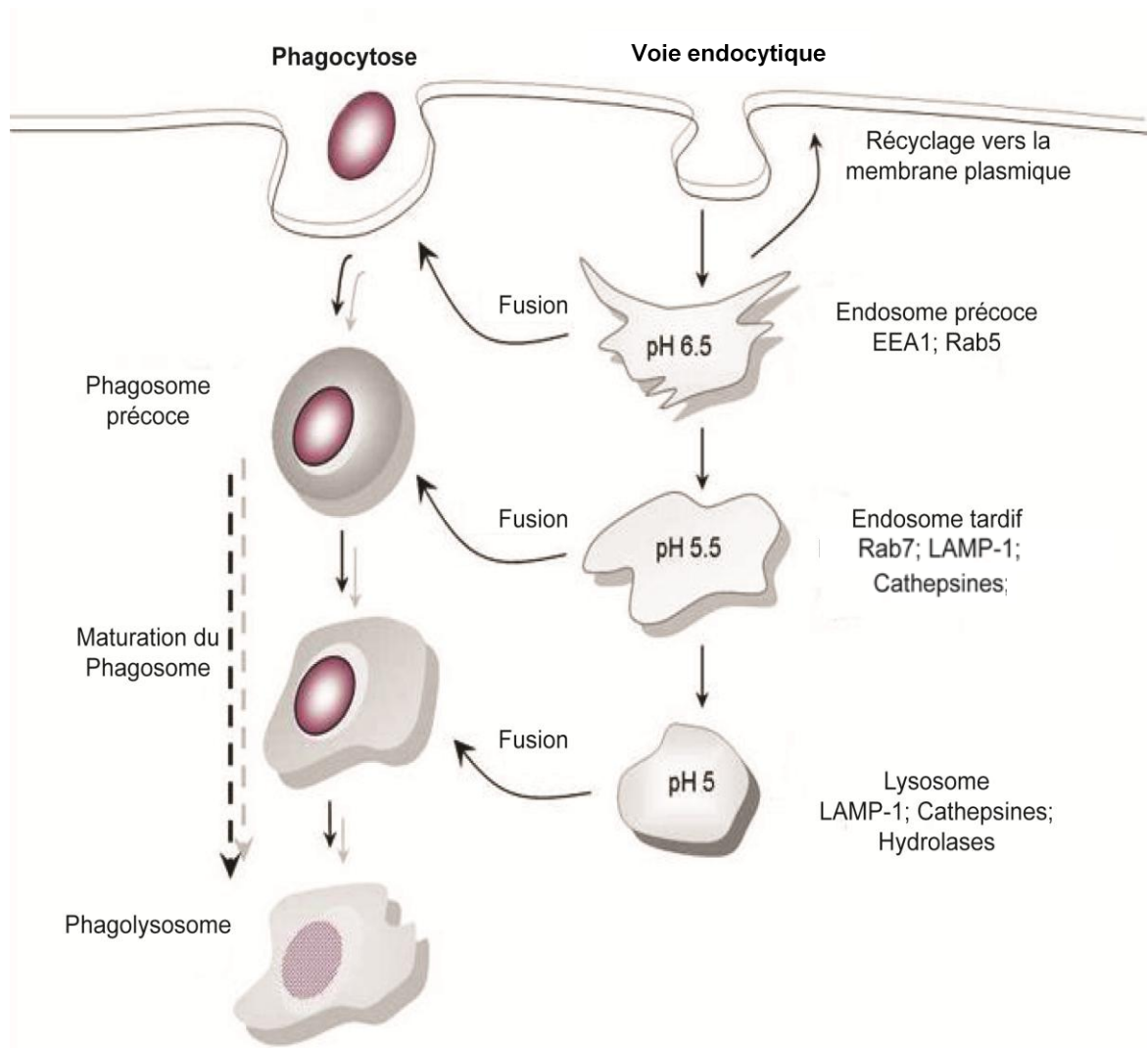


Figure 3. Schéma des évènements de fusion pendant la biogenèse du phagolysosome.

Après l'internalisation de la particule, le phagosome entre dans le processus de maturation phagosomale caractérisé par des fusions séquentielles avec des composantes de la voie endocytique tels que l'endosome précoce, l'endosome tardif et le lysosome. Chaque composante apporte au phagosome différentes protéines qui peuvent être utilisées comme des marqueurs vésiculaires des divers évènements de fusion. L'acidification augmente à mesure que la maturation du phagosome a lieu. Modifiée de (Imbuluzqueta *et al.*, 2010).

Étant donné de l'importance de la phosphorylation dans la régulation de la signalisation, ce n'est pas surprenant que diverses études se sont focalisées sur le phosphoprotéome global de la cellule, ainsi que sur celui de chaque organelle. Dans le cas du phagosome, on retrouve plus de 1000 protéines phosphorylées ainsi que presque 3000 sites de phosphorylation (Trost, Matthias *et al.*, 2009). Ces nombres deviennent encore plus étonnants quand nous les comparons avec le phosphoprotéome d'autres organelles. Par exemple, dans le cas du noyau cellulaire, nous nous attendrions à un phosphoprotéome considérablement plus grand vu le besoin d'une haute régulation des cascades de signalisation. Pourtant, avec une méthode similaire à celle utilisée avec le phagosome, nous ne trouvons que 580 protéines phosphorylées et presque 2000 sites de phosphorylation (Figure 5). C'est également le cas de plusieurs autres organelles (Trost, M. *et al.*, 2010).

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

Comme nous l'avons mentionné auparavant, la phagocytose sert de première ligne de défense contre une panoplie de microorganismes pathogènes intracellulaires. Ce n'est pas étonnant alors que plusieurs agents pathogènes aient développé des stratégies pour éviter la phagocytose ou pour modifier la maturation du phagosome à leur avantage. Nous discuterons en détail de quelques stratégies mentionnées dans le tableau 3.

6.1. Échappement de la phagocytose

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

L'échappement de la phagocytose peut aussi être faite par la modulation des voies de signalisation phagocytique. C'est le cas de *Yersinia* qui a un système de sécrétion de type III, aussi connu comme TTSS, qui produit différentes protéines effectrices pour empêcher la phagocytose (Ernst, 2000). Finalement, il existe des bactéries comme *Salmonella* qui sécrètent des protéines, dans ce cas-ci, une phosphatase, capable de perturber l'actine du cytosquelette (Fu et Galan, 1998).

Malgré le fait que quelques microorganismes pathogènes n'arrivent pas à échapper à la phagocytose, ils sont capables de s'évader du phagosome avant que celui-ci n'acquière des caractéristiques hydrolytiques. C'est le cas de *Listeria monocytogenes*, une bactérie Gram⁺ qui possède trois protéines effectrices pour échapper au phagosome, notamment la listeriolysine O, qui produit des pores dans la membrane phagosomale afin de perturber les gradients ioniques et faciliter l'échappement (Flannagan, Cosio et Grinstein, 2009). Une fois dans le cytoplasme du phagocyte, la bactérie se trouve dans un environnement riche en nutriments et protégé de la reconnaissance du système immunitaire, ce qui lui permet de proliférer et de continuer son infection. *Mycobacterium tuberculosis* est aussi capable d'échapper au phagosome grâce au système de sécrétion précoce de l'antigène nommé ESX (van der Wel *et al.*, 2007)

6.2 Arrêt de la maturation du phagosome.

Mycobacterium tuberculosis est un des agents pathogènes qui arrêtent la maturation du phagosome à l'aide de différentes stratégies. En premier lieu, nous avons la sécrétion de SapM, une phosphatase qui hydrolyse le PI3P, ce qui empêche la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs. Les phagosomes contenant *M. tuberculosis* possèdent Rab5A à leur surface, mais manquent des effecteurs tel que EEA1 (Vergne *et al.*, 2005). De même, la protéine MptpB a été montrée comme essentielle à la survie du parasite dans le phagosome, par la manipulation du métabolisme du PI de l'hôte (Beresford, N. *et al.*, 2007; Beresford, N. J. *et al.*, 2009). Aussi, les phagosomes contenant cette bactérie présentent un niveau d'acidité beaucoup plus bas, comparativement aux phagosomes typiques (Deretic et Fratti, 1999), ce qui pourrait être associé à un défaut au niveau du recrutement de la v-ATPase (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Dernièrement, il a été démontré que l'activation du facteur nucléaire kappa des cellules B activées (NF- κ B) est nécessaire pour la formation du phagolysosome (Gutierrez *et al.*, 2008).

Leishmania est un autre microorganisme pathogène connu pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Olivier, Gregory et Forget, 2005). Même si la plupart des études sur ce sujet se sont concentrées sur les mécanismes externes au phagosome (Gomez *et al.*, 2009), il existe des études récentes qui ont démontré que des mutants de *Leishmania donovani* qui n'expriment pas de lipophosphoglycan (LPG) en surface forment des phagolysosomes fonctionnels tandis que le parasite de type sauvage réside dans un phagosome non fusogénique (Desjardins et Descoteaux, 1997; Lodge et Descoteaux, 2005). Plus récemment, des travaux dans notre laboratoire ont démontré que le LPG chez *Leishmania* cause l'exclusion de la v-ATPase des phagosomes, en empêchant le recrutement de la synaptotagmine V et, par conséquent, les phagosomes n'acquièrent pas le niveau d'acidité typique des phagosomes matures (Vinet *et al.*, 2009).

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

6.3 Redirection de la maturation du phagosome.

Un exemple clair de ce type de modification est *Legionella pneumophila*, une bactérie Gram⁻. Les phagosomes qui contiennent cette bactérie la transportent vers le réticulum endoplasmique. *L. pneumophila* a un système de sécrétion Dot/Icm qui libère un signal d'inhibition de la fusion avec les organelles endocytiques (Roy, 2002). Après cette modulation, des vésicules couvertes de Sar1-COPII provenant du réticulum endoplasmique, fusionnent avec les phagosomes qui contiennent *L. pneumophila* (Flannagan, Cosio et Grinstein, 2009).

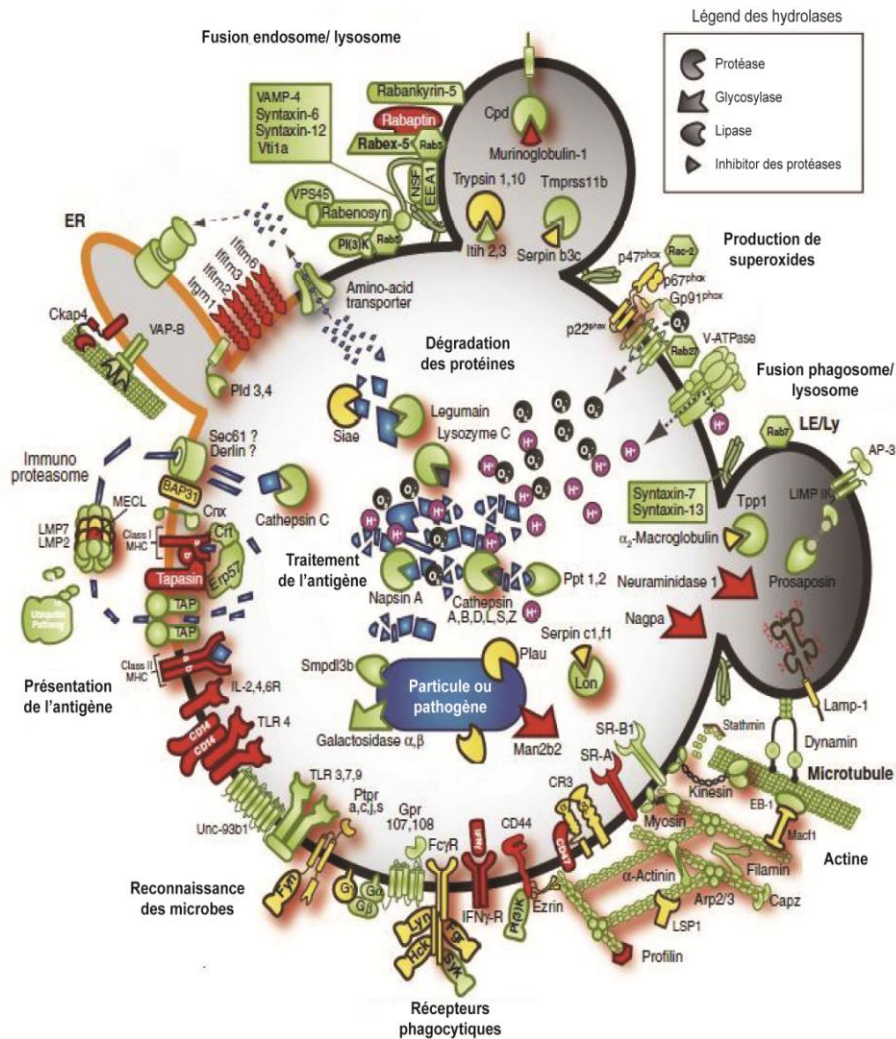


Figure 4. Le protéome du phagosome. Origine des protéines phagosomales et ses différents rôles. Endosome précoce (EE), endosome tardif (LE), lysosome (Ly), réticulum endoplasmique (ER). (Traduite de Boulais *et al.*, 2010).

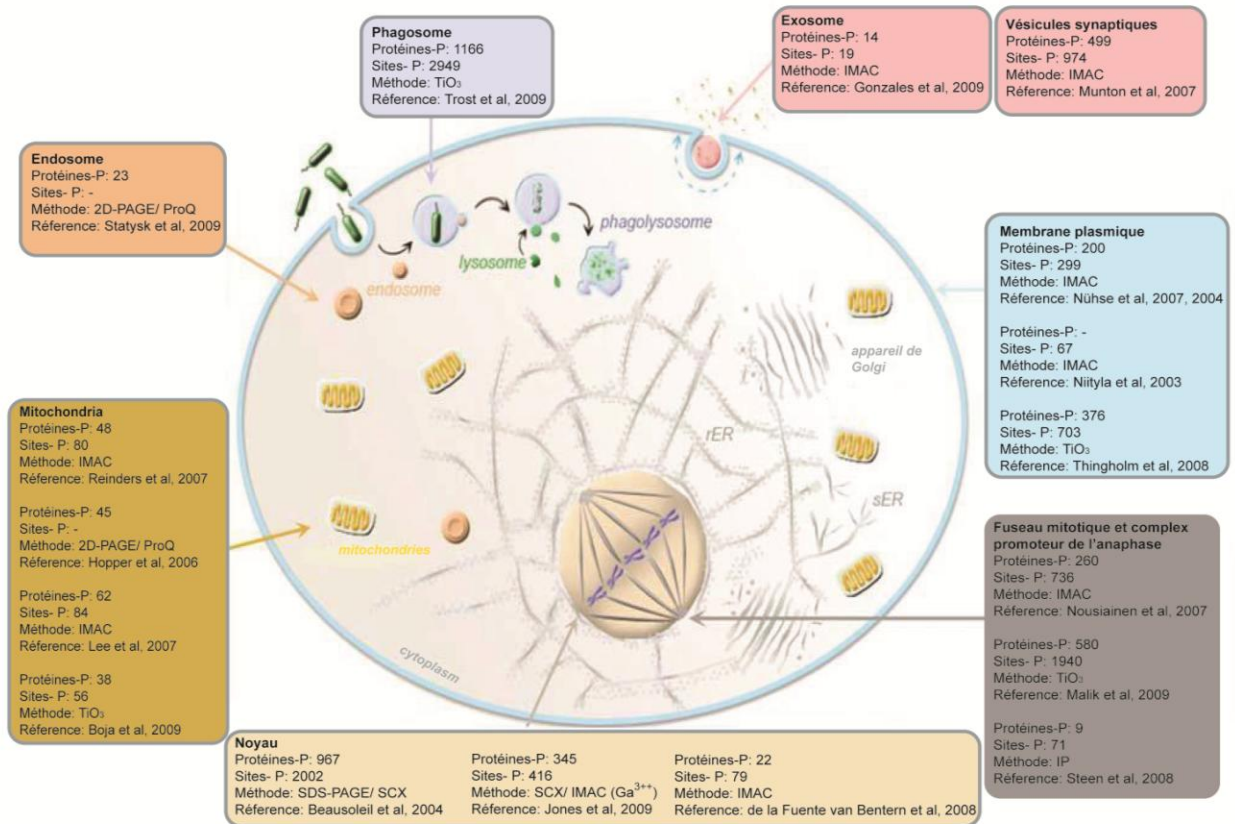


Figure 5. Le phosphoprotéome total de la cellule. B. Des exemples des analyses phosphoprotéomiques subcellulaires. Notez le nombre exacerbé de protéines phosphorylées (Protéines-P) et de sites de phosphorylation (Sites-P) dans le phagosome (carre mauve pale). (Traduite de Trost, M. *et al.*, 2010).

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

Table 3. Exemples des agents pathogènes intracellulaires qui échappent le processus de la maturation du phagosome ³		
Strategie	Microorganisme	Mécanisme de survie
Échappement de la phagocytose	<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibition de la reconnaissance par les FcR avec la protéine A
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Perméabilisation du phagosome par listeriolysin O
	<i>Escherichia coli</i>	Production de la protéine OmpA qui inhibe la réponse du complément
	<i>Yersinia sp.</i>	Production de protéines effectrices via le TTSS
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Expression de polysaccharides de surfaces qui inhibe la réponse du complément
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Lyse du phagosome par la sécrétion de Tc-TOX
Arrêt de la maturation du phagosome	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hydrolyse de PI3P par SapM Modulation de l'acquisition d'EEA1 et de v-ATPase
	<i>Leishmania donovani</i>	Modulation de la maturation par LPG, incluant l'acquisition de v-ATPase et de NADPH oxydase Défaut dans le recrutement de Rab7
	<i>Salmonella enterica</i>	Inhibition de fusion vésiculaire par SPI-2
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Arrêt de la biogenèse du phagolysosome
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Perméabilisation de la membrane phagosomale par la porine PorB
	Redirection de la maturation du phagosome	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>		Formation des vacuoles non fusogéniques associées aux mitochondries et au réticulum endoplasmique.

³ Modifié de (Haas, 2007; Scott, Botelho et Grinstein, 2003)

ARTICLE

The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates phagolysosome biogenesis¹

Carolina P. Gomez^{*†}, Marina Tiemi Shio^{§†}, Martin Olivier^{§†}, and Albert Descoteaux^{*†2}

*INRS- Institut Armand-Frappier and †Center for host-parasite interactions, Laval, QC, Canada H7V 1B7.

§Departments of Medicine, Microbiology and Immunology, Centre for the Study of Host Resistance, The Research Institute of the McGill University Health Centre, Montréal, QC, Canada

Running title: SHP-1 regulates phagolysosome biogenesis

Correspondence to: E-mail: albert.descoteaux@iaf.inrs.ca

Tel. (+1) 450-687-5010 ext. 4465

Fax (+1) 450-686-5501

Abstract

The process of phagocytosis and phagosome maturation involves the recruitment of effector proteins that participate in phagosome formation and in the acidification and/or fusion with various endocytic vesicles. In the present study, we investigated the role of the Src homology 2 domain-containing phosphatase 1, SHP-1, in phagolysosome biogenesis. To this end, we used immortalized bone marrow macrophages derived from SHP-1-deficient motheaten mice and their wild type littermates. We found that SHP-1 is recruited early and remains present on phagosomes for up to four hours post-phagocytosis. Using confocal immunofluorescence microscopy and Western blot analyses on purified phagosome extracts, we observed an impaired recruitment of LAMP-1 in SHP-1-deficient macrophages. Moreover, Western blot analyses revealed that whereas the 51 kDa pro-cathepsin D is recruited to phagosomes, it is not processed into the 46 kDa cathepsin D in the absence of SHP-1, suggesting a defect in acidification. Using the lysosomotropic agent LysoTracker red as an indicator of phagosomal pH, we obtained evidence that in the absence of SHP-1, phagosome acidification was impaired. Taken together, these results are consistent with a role for SHP-1 in the regulation of signaling or membrane fusion events involved in phagolysosome biogenesis.

Introduction

Phagocytosis is the process by which cells internalize large particulate materials from their milieu. In contrast to endocytosis, phagocytosis involves clathrin-independent mechanisms and requires actin polymerization. Internalization is triggered by the interaction of ligands on the target particles with surface receptors of phagocytic cells. The nascent phagosome is formed to a large extent by invagination of the plasma membrane (1). The particles are surrounded by pseudopods and following internalization, they end up in a vacuole, the phagosome. The newly formed phagosome rapidly matures into a phagolysosome where the internalized material is degraded. Phagolysosome biogenesis is a dynamic process, requiring the coordinated action of multiple signaling molecules which regulate the interactions between the phagosome and the cytoskeleton, and the endosomal/lysosomal compartments (2-5). These interactions are transient and are characterized by the formation of small fusion pores between the two organelles, allowing the exchange of membrane and contents (6). Through these interactions, phagosomes acidify and sequentially acquire an array of hydrolases culminating in the generation of a highly hydrolytic environment (7). This process takes place rapidly, as within a few hours, newly formed phagosomes acquire phagolysosomal functionality (8).

Tyrosine (Tyr) phosphorylation is a critical mechanism for the control of numerous physiological processes in eukaryotes (9), including cytoskeletal function, signal transduction, intracellular traffic, and immune defense (9, 10). Phosphotyrosine signaling is regulated by the dynamic interplay of three distinct functional modules: protein tyrosine kinases (PTK), protein tyrosine phosphatases (PTP), and Src homology 2 (SH2) domains (11). In metazoans, the multiple possible combinations of these modules illustrate the complexity of phosphotyrosine signaling, which can regulate cellular functions either positively or negatively. A recent large scale quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis revealed that Tyr phosphorylation sites are overrepresented in phagosomes (12), as compared to global phosphoproteome (13). This finding

suggested that Tyr phosphorylation plays an important role in phagosome signaling. Given their role in controlling Tyr phosphorylation levels (10, 11) PTPs are expected to participate in the regulation of phagosome function. Interestingly, characterization of the nonreceptor PTP MEG2 in neutrophils revealed that it is present on the cytoplasmic face of secretory vesicles, and is recruited to nascent phagosomes (14). A physiological substrate for PTP-MEG2 is the vesicle fusion protein *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), the dephosphorylation of which stimulates the homotypic fusion of secretory vesicles (15). Additional PTP-MEG2-interacting proteins are associated with vesicle traffic, small GTPases, and lipid interaction (16). However, a role for PTP-MEG2 or any other PTPs in the regulation of phagosome maturation remains to be demonstrated.

The non-receptor SH2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) is expressed at highest levels in hemopoietic cells. In macrophages, SHP-1 participates in the regulation of various processes including pro-inflammatory and innate immune responses (17-20). SHP-1 has previously been shown to associate with phagosomes (21, 22) thereby suggesting a role in the biogenesis of phagolysosomes. In this study, we present evidence that SHP-1 plays a role in phagosome maturation and that it is required for acidification of this organelle.

Materials and Methods

Cell culture

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the Canadian Council on Animal Care, and all animal work was approved by the Comité institutionnel de protection des animaux of INRS- Institut Armand-Frappier. Bone marrow-derived macrophages (BMM) were obtained by extracting the femur and tibias from 8 to 10 week-old female BALB/c mice (Charles River Laboratories, QC, Canada) at 37°C in 5% CO₂ for 7 days in Dulbecco Modified Eagle Medium with L-glutamine (Life Technologies, CA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT, USA), 10 mM Hepes (pH 7.4) and antibiotics (complete medium) in the presence of 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium as a source of colony stimulating factor-1. SHP-1-deficient (C3HeBFeJ *me/me*, *me-3* and *me-5*) and wild type (LM-1) immortalized bone marrow-derived macrophages were previously described (23) and were grown in complete medium at 37°C in 5% CO₂.

Phagosome preparation and isolation

Adherent macrophages (2×10^7 per 150 x 20 mm tissue culture dishes) were incubated with magnetic beads (3 mm average diameter, 2.5% w/v suspension, Spherotech, IL, USA) diluted in 1/50 in 10 ml complete medium at 37°C for 1, 2 or 4 h. Cells were then washed with cold PBS at 4°C and scrapped in cold PBS. Cells were resuspended in purification buffer (5 mM EDTA pH 8.0 and PBS, with a final pH of 7.2), lysed by aspirations through a 22 G needle, and then transferred into microfuge tubes. Phagosomes were isolated using magnets.

Western blots

Cells and purified phagosomes were lysed in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40) containing protease (cOmplete EASYpacks, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and phosphatase inhibitors (Na₃VO₄ and NaF). Phagosomal and total cell lysate proteins were

separated by SDS-PAGE, transferred onto Hybond-ECL membranes (Amersham Biosciences, QC, Canada), and immunodetection was achieved by chemiluminescence (Amersham Biosciences, QC, Canada). Unless specified otherwise, all western blots were performed with 15 μ g of either total cell lysates or phagosome lysates, and equal charge was verified by red Ponceau prior to blotting.

Antibodies

The rat monoclonal antibody against LAMP-1 developed by J. T. August (1D4B) was obtained through the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa, and the National Institute of Child Health and Human Development. The rabbit antibody against Flotillin-2 was from Cell Signaling (MA, USA), the mouse antibody against SHP-1 was from Millipore and the mouse antibody against EEA-1 was from BD Transduction Laboratories. The antibodies against PTP-1B and TC-PTP (rabbit and mouse, respectively) were kindly donated by Dr. Michel L. Tremblay (McGill University, QC, Canada). The rabbit antibody against Rab7 was from Santa Cruz Laboratories (CA, USA). The rabbit antiserum against Cathepsin D was from Upstate (MA, USA). Finally the rabbit antiserum against the 16 kDa *c* subunit from the V_0 sector of the v-ATPase was kindly donated by Dr. Mhairi Skinner (University of Guelph, ON, Canada) (24)

In gel PTP assay

Macrophages were lysed as described previously for phagosome isolation without addition of sodium orthovanadate to the lysis buffer. Cell lysate controls (25 μ g) were obtained using a PTP lysis buffer (50 mM Tris pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% β -mercaptoethanol, 1% Nonidet P-40, 1 mM Na_3VO_4 , and protease inhibitors). Samples were loaded on a gel containing a ^{32}P -labelled poly(Glu4Tyr) peptide (Sigma-Aldrich, ON, Canada) and the SHP-1 band was observed by in gel PTP assay as previously described (25)

Phagocytosis assays

Zymosan (Sigma-Aldrich, ON, Canada) and latex beads (3 μm ; Polyscience Inc., PA, USA) were opsonized with mouse serum. For synchronized phagocytosis assays, cells were incubated with particles at a particle-to-cell ratio of 5:1 for 10 min at 4°C. Excess particles were removed and phagocytosis was triggered by transferring the cells to 37°C for the indicated time points before proceeding for microscopy.

Microscopy and immunofluorescence

Macrophages were fixed, permeabilized using 0.1% Triton X-100, and non-specific surface Fc γ R binding were blocked using 1% BSA, 2% goat serum, 6% milk, and 50% FBS (26). Particle internalization was quantified by immunofluorescence microscopy. Results are based on at least 100 cells chosen by blinded scoring in triplicates. For distribution and colocalization experiments, anti-mouse AlexaFluor 488, anti-rabbit AlexaFluor 488, anti-rat AlexaFluor 488, or anti-rat AlexaFluor 568; (Molecular Probes, CA, USA). DRAQ5 (Biostatus, Leicestershire, UK) was used to visualize cells nuclei. All coverslips were mounted on slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, AL, USA). Detailed analysis of protein presence and localization on the phagosome was performed using an oil immersion Nikon Plan Apo 100 (N.A. 1.4) objective mounted on a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad, Zeiss, CA, USA). Images were obtained using appropriate filters with a Kalman filter of at least 3.

Phagosome acidification

Cells were preloaded with the lysosomotropic agent LysoTracker Red (Molecular Probes, CA, USA) diluted in DMEM (1:1000) for 2 h at 37°C. Cells were washed and synchronized phagocytosis was performed for indicated time points at 37°C as described above. Cells were then rinsed, fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min, washed and directly mounted for confocal analysis.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the statistical tools provided in GraphPad prism software.

Results

SHP-1 is recruited to nascent phagosomes and remains throughout the maturation process

SHP-1 has previously been shown to associate with phagosomes, raising the possibility that it participates in the biogenesis of phagolysosomes (21, 22). To investigate a potential role of SHP-1 in this process, we first performed confocal immunofluorescence experiments to visualize SHP-1 redistribution in murine BMM upon phagocytosis of serum-opsonized zymosan particles (27-29). As shown in Figure 1A, SHP-1 was detectable on nascent phagosomes (15 min) and remained associated to the phagosome throughout the maturation process (up to 4 h after the initiation of phagocytosis). Quantification of the kinetics of SHP-1 phagosomal association (Fig. 1B) revealed that by 30 min, 50% of phagosomes were positive for SHP-1. From 1 h post-phagocytosis, SHP-1 was present on over 80% of phagosomes (Fig. 1B). These results confirmed the early recruitment and presence of SHP-1 throughout the maturation process. To further analyze the phagosomal association/recruitment of SHP-1, we prepared purified phagosomes extracts at different time points after the initiation of phagocytosis (26, 30). To this end, we used immortalized bone marrow macrophages derived from SHP-1-deficient motheaten (me-3) mice and their control littermates (LM-1) (25). Purified phagosome extracts of various ages (1, 2, and 4 h) were isolated from the immortalized macrophage cell line LM-1 and were analysed by Western blot to detect the presence of SHP-1. In agreement with our confocal immunofluorescence data, we detected SHP-1 in phagosome extracts from 1 to 4 h after the initiation of phagocytosis (Fig. 2A). As expected, no SHP-1 was detected in SHP-1-deficient me-3 macrophage extracts (Fig. 2A), confirming the specificity of the antibody against SHP-1. Next, we performed an in-gel PTP activity assay (31) to monitor the presence of PTPs in phagosome extracts isolated from wild type LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages at 1, 2, and 4 h after the initiation of phagocytosis (Fig. 2B). Active SHP-1 was present in phagosome extracts from LM-1 cells at all time points tested and, as expected,

was not detected in phagosome extracts from SHP-1-deficient me-3 macrophages (upper band). Interestingly, our in-gel PTP activity assay revealed the presence of other PTPs in phagosome extracts which, based on their apparent molecular masses, corresponded to TC-PTP (Fig. 2B, lower band) and PTP-1B (Fig. 2B, middle band). The presence of both TC-PTP and PTP-1B was confirmed by Western blot analysis (Fig. 2C). Comparison of the patterns of tyrosine-phosphorylated proteins present in phagosome extracts from LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages revealed an increased tyrosine phosphorylation in the absence of SHP-1 (Fig. 2D). Together, these results indicate that SHP-1 is recruited early and remains associated to phagosomes, and suggest that it may participate in phagolysosome biogenesis by modulating phosphotyrosine signaling in phagosomes.

Impaired recruitment of lysosomal markers in the absence of SHP-1

As they mature, phagosomes interact with various endosomal populations to acquire lysosomal features (2). To evaluate the potential impact of SHP-1 on the maturation process, we fed LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages with serum-opsonized zymozan, and at the indicated time points we assessed the phagosomal association of endosomal markers by confocal immunofluorescence microscopy. In the case of the early endosomal marker EEA1, phagosomal recruitment occurred with similar kinetics in LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages (Fig. 3A). In the case of the late endosomal marker Rab7 (32, 33), we observed no major difference in its recruitment at early time points post phagocytosis (Fig. 3B). However, at 1 h post phagocytosis, whereas approximately 60% of phagosomes in LM-1 cells were positive for Rab7, less than 40% of phagosomes were positive in me-3 macrophages. For LAMP-1 approximately 90% of phagosomes were positive at 2 h after the initiation of phagocytosis by LM-1 cells (Fig. 4A and B). In contrast, the phagosomal recruitment of LAMP-1 was reduced and delayed in me-3 macrophages, with less than 60% of phagosomes being positive at the same time point. At 4 h after the

start of phagocytosis, we observed that approximately 80% of phagosomes were positive for LAMP-1 in me-3 macrophages (Fig. 4A and B). We next assessed by Western blot the presence of LAMP-1 in purified phagosome extracts isolated at various time points from LM-1 and me-3 macrophages (Fig. 4C, upper panel). Consistent with the results obtained by confocal immunofluorescence microscopy, we found reduced levels of LAMP-1 in me-3 phagosome extracts at all time points tested. Flotillin is recruited to phagosomes from compartments distinct from those bearing LAMP-1 (34). As shown in Figure 4C (middle panel), flotillin-2 levels were slightly reduced in phagosome extracts isolated from SHP-1-deficient me-3 macrophages with respect to LM-1 macrophages. The aspartic protease cathepsin D is delivered to phagosomes as a 51 kDa pro-cathepsin D and is processed into an active 46 kDa form (35, 36). As shown in Figure 4C, lower panel, the 51 kDa pro-cathepsin D was present in purified phagosome lysates isolated at 1, 2, and 4 h from both LM-1 and me-3 macrophages. In contrast, the 46 kDa mature form of cathepsin D which gradually appeared in purified phagosome lysates from LM-1 macrophages, was absent from SHP-1-deficient me-3 phagosomes lysates. These results indicate that phagosomal acquisition and processing of late endosomal/lysosomal markers is impaired in cells lacking SHP-1, suggesting that this protein tyrosine phosphatase participates regulation of signaling or membrane fusion events involved in phagolysosome biogenesis. Impaired processing of pro-cathepsin D also raised the possibility that phagosomal acidification may be defective in the absence of SHP-1 (36).

SHP-1 regulates phagosomal acidification

Phagosome acidification is essential for the acquisition of microbicidal properties, as most lysosomal hydrolases are optimally active at acidic pH (37, 38). To assess the impact of SHP-1 deficiency on acidification, we used the lysosomotropic agent LysoTracker red (LT) as an indicator of phagosome acidity. LM-1 macrophages and two independent SHP-1-deficient clones (me-3 and me-5) were preloaded with LT prior to being fed with either latex beads or zymosan for

various time points (Fig 5A). Quantification of the number of phagosomes positive for LT showed that in LM-1 macrophages, approximately 80% of phagosomes containing latex beads were acidified after 1 h. In the absence of SHP-1, there was a significant reduction in the percentage of phagosomes positive for LT (Fig. 5A, B and C). Hence, in me-3 macrophages, 35% of phagosomes containing latex beads were positive for LT even 4 h after the initiation of phagocytosis. In the case of me-5 macrophages, less than 20% of phagosomes were positive for LT. We obtained similar results when phagocytosis was performed with zymosan (Fig. 5C). The absence of SHP-1 did not affect the overall staining and distribution of LT (Fig. 5A), indicating that the defective accumulation of LT to phagosomes is not the consequence of a generalized lysosomal acidification defect in SHP-1-deficient macrophages. To further investigate the potential role of SHP-1 in phagosomal acidification, we performed confocal immunofluorescence experiments to visualize the distribution of the *c* subunit of the v-ATPase in LM-1 and me-3 macrophages following the phagocytosis of latex beads. As shown in Figure 5D, the *c* subunit of the v-ATPase was present on a majority of phagosomes in LM-1 macrophages. In contrast, barely 20% of phagosomes were positive for the *c* subunit of the v-ATPase in me-3 macrophages. These data suggest that SHP-1 is involved in the phagosome acidification process.

Discussion

The present study was aimed at investigating the role of the PTP SHP-1 in the regulation of phagolysosome biogenesis. We report that SHP-1 is recruited early to phagosomes and that it is required for the acquisition of lysosomal features and acidification. Previous studies established that particle internalization is accompanied by the tyrosine phosphorylation of numerous proteins, through the action of Syk and Src family kinases (39-43). Investigation by Strzelecka-Kiliszek and colleagues (21) showed that binding of IgG-coated particles to the surface of macrophages induces rapid and transient tyrosine phosphorylation of several proteins. In contrast, when particle internalization starts, most proteins are dephosphorylated. The observation that tyrosine dephosphorylation coincides with the phagosomal association of SHP-1 is consistent with this PTP being an important modulator of tyrosine phosphorylation-dependent signaling during Fc γ R-mediated phagocytosis (20, 44).

Our observation that active SHP-1 is present on phagosomes at all time points analyzed suggested that the role of this PTP extends beyond the modulation of tyrosine phosphorylation during the internalization process. Indeed, characterization of the phagosome phosphoproteome and molecular analysis of the evolution of phagosomes highlighted the importance of phosphorylation in the regulation of phagolysosome biogenesis (4, 12, 22). This process is accomplished through transient, highly regulated interactions between the phagosome and the cytoskeleton, as well as the early, late, and recycling endocytic compartments (45-47) Through these interactions, phagosomes acidify and sequentially acquire an array of hydrolases, culminating in the generation of an hydrolytic, microbicidal environment (36, 48, 49). Our results unveiled an important role for SHP-1 in this process, as acquisition of lysosomal features was clearly impaired in the absence of this PTP. Hence, whereas the absence of SHP-1 had no noticeable effect on the phagosomal association of the early endosomal marker EEA1, it impaired the recruitment of the late endosomal marker Rab7. We also found that phagosomal association of both flotillin and LAMP-1 was reduced in the absence of SHP-1.

Most noticeable was the impairment of phagosome acidification in SHP-1-deficient macrophages. Collectively, those results indicated that SHP-1 is involved in the regulation of phagolysosome biogenesis.

Phagosomal acidification is mediated by the vesicular proton-ATPase (v-ATPase), which is present on various endocytic organelles (50). The v-ATPase is a multimeric complex consisting in the multi-subunit cytoplasmic V_1 -sector that is responsible for ATP hydrolysis, and of the multi-subunit transmembrane V_0 -sector that pumps protons across the bilayer (51). Little is known concerning the mechanism(s) regulating the phagosomal recruitment of the v-ATPase as well as the regulation of its activity. Previous studies revealed that phagosomal acidification starts early during phagosome formation, before acquisition of lysosomal features such as LAMP-1 and cathepsins (8, 52, 53), which are recruited to phagosomes through distinct kinetics and mechanisms (7, 34, 54). Recently, it was shown that early recruitment of the α_3 subunit of the v-ATPase to young phagosomes occurs via tubular structures extending from the perinuclear lysosomes along microtubules (55). This finding is consistent with previous studies showing that phagosomes acquire lysosomal features through a microtubule-dependent mechanism (46, 49). The identification of Syt V as an important regulator of the recruitment of the v-ATPase to the phagosome membrane (26) provided additional insights into the mechanism regulating phagosome acidification. How SHP-1 contributes to the phagosomal acidification process remains to be established. The observation that there was no generalized defect in lysosomal acidification in the absence of SHP-1 suggests that the defect in phagosome acidification in SHP-1-deficient cells is not due to an impaired activity of the v-ATPase. Rather, one may envision that SHP-1 is involved in the phagosomal recruitment of the v-ATPase, by regulating membrane fusion events, a function previously reported for other protein phosphatases. This is the case for the yeast protein phosphatase 1 (PP1) which was shown to control the terminal step of membrane fusion, after the SNARE docking stage and the early priming

reaction involving NSF α -SNAP (56). This finding led the authors of that study to propose that PP1 may be part of a system other than SNARE complexes and NSF α -SNAP, that catalyzes bilayer mixing. Similarly, PTP-MEG2 was shown to dephosphorylate NSF, thereby stimulating the homotypic fusion of secretory vesicles (15). Alternatively, SHP-1 may be recruited to phagosomes as a molecular complex which contains regulators of phagosome maturation. In the absence of SHP-1, these effectors may not associate with phagosomes.

Exclusion of the v-ATPase from phagosomes may have an important consequence on the maturation process, since earlier studies revealed that phagosomal acidification is an important element in controlling phagosome maturation (8, 36, 57). Indeed, further studies revealed that the $\alpha 1$ subunit of the V_0 sector is a crucial factor in vacuole fusion, acting downstream of trans-SNARE pairing (58, 59). Consistently, the V_0 sector was involved in vesicle fusion during exocytosis in neurons (60, 61). More recently, studies with zebrafish microglia established that the $\alpha 1$ subunit mediates fusion independently of its proton pump activity (62). Further studies will be required to determine whether the lack of phagosome acidification observed in SHP-1-deficient macrophages is the consequence of a defective phagosome maturation process, or one of the contributing factors. Similarly, impaired phagosomal recruitment of LAMP-1 may contribute to the inhibition of phagolysosomal biogenesis in SHP-1-deficient macrophages. Indeed, it has been demonstrated that LAMPs are essential for successful completion of phagosome maturation, specifically, for the transition from early to late phagosomes (38). Acidification is also an important characteristic of the phagosome and directly impacts its enzymatic activities. In this regard, Ullrich and colleagues (36) showed that inhibition of the v-ATPase with Bafilomycin A impairs the conversion of the 51 kDa pro-cathepsin D into the 46 kDa mature form. Given the role of SHP-1 in phagosomal acidification, our observation that processing of pro-cathepsin D into the 46 kDa form requires SHP-1 is consistent with the work Ullrich and colleagues.

To date, several SHP-1 binding proteins and substrates have been identified (63). Many are expressed in macrophages, including PIR-B, SIRP α , p62^{Dok}, SLP-76, Syk, Vav1, and BLK. Some of those proteins are intermediates in signaling pathways initiated from Fc γ receptors and participate in the regulation of particulate internalization (44). Several of those SHP-1 substrates were identified in recent proteomic analyses of latex bead phagosomes (22), but their potential contribution to phagolysosome biogenesis/function remains poorly understood. Clearly, a better understanding of the role(s) of those known phagosomal SHP-1 binding proteins and substrates will be crucial to understand how SHP-1 modulates phagolysosomal biogenesis. In addition to SHP-1, we found that two other PTPs, namely TC-PTP and PTP-1C, were present in phagosome extracts. Previous studies indicated that TC-PTP and PTP-1C play a cooperative but non-redundant role in signalling pathways associated to macrophage development and activation (64, 65). The possibility that these PTPs both regulate phagolysosome biogenesis and/or phagosome function is a scenario that remains to be experimentally addressed.

Acknowledgements

We are grateful to Marcel Desrosiers for his expert assistance with confocal immunofluorescence microscopy, and to Dr Michel L. Tremblay (McGill University, Canada) and Dr Mhairi Skinner (University of Guelph, Canada) for kindly providing the antibodies to PTP-1B and TC-PTP, and a rabbit antiserum against the *c* subunit of the V-ATPase, respectively.

Footnotes

1. This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (AD) and by a New Initiative Fund from the Center for host-parasite interactions (to AD and MO). AD is the holder of a Canada Research Chair and CPG was partly supported by a studentship from the Fondation Armand-Frappier.

2. Address correspondence and reprint requests to Dr. Albert Descoteaux, Institut National de la Recherche Scientifique- Institut Armand-Frappier, 531 boul des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7. E-mail address: albert.descoteaux@iaf.inrs.ca

3. Abbreviations used in this paper:

BMMs, bone marrow derived macrophages; CathD, cathepsin D; EEA1, early endosome antigen 1; Flot2, flotillin 2; LAMP-1, Lysosomal-associated membrane protein 1; LM, littermate; LT, LysoTracker; *me*, motheaten; pro-CathD, precursor of cathepsin D; PTP, protein tyrosine phosphatase; PTP-1B, protein tyrosine phosphatase 1B; SHP-1, SH2 domain-containing phosphatase 1; TC-PTP, T cells protein tyrosine phosphatase; Tyr, tyrosine; v-ATPase, vacuolar-type H⁺-ATPase

References

1. Silverstein, S. C. 1977. Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and the penetration of obligate intracellular parasites. *Am J Trop Med Hyg* 26:161-169.
2. Vieira, O. V., R. J. Botelho, and S. Grinstein. 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* 366:689-704.
3. Jutras, I., A. Laplante, J. Boulais, S. Brunet, G. Thinakaran, and M. Desjardins. 2005. Gamma-secretase is a functional component of phagosomes. *J Biol Chem* 280:36310-36317.
4. Trost, M., G. Bridon, M. Desjardins, and P. Thibault. 2010. Subcellular phosphoproteomics. *Mass Spectrom Rev* 29:962-990.
5. Ng Yan Hing, J. D., M. Desjardins, and A. Descoteaux. 2004. Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C- α in phagosome maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 319:810-816.
6. Desjardins, M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* 5:183-186.
7. Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J. F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau, and M. Desjardins. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152:165-180.
8. Yates, R. M., A. Hermetter, and D. G. Russell. 2005. The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic* 6:413-420.
9. Hunter, T. 2009. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current Opinion in Cell Biology* 21:140-146.
10. Tonks, N. K., and B. G. Neel. 1996. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* 87:365-368.
11. Lim, W. A., and T. Pawson. 2010. Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell* 142:661-667.
12. Trost, M., L. English, S. Lemieux, M. Courcelles, M. Desjardins, and P. Thibault. 2009. The phagosomal proteome in interferon- γ -activated macrophages. *Immunity* 30:143-154.
13. Olsen, J. V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann. 2006. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127:635-648.
14. Kruger, J. M., T. Fukushima, V. Cherepanov, N. Borregaard, C. Loeve, C. Shek, K. Sharma, A. K. Tanswell, C. W. Chow, and G. P. Downey. 2002. Protein-tyrosine phosphatase MEG2 is expressed by human neutrophils. Localization to the phagosome and activation by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 277:2620-2628.
15. Huynh, H., N. Bottini, S. Williams, V. Cherepanov, L. Musumeci, K. Saito, S. Bruckner, E. Vachon, X. Wang, J. Kruger, C.-W. Chow, M. Pellicchia, E. Monosov, P. A. Greer, W. Trimble, G. P. Downey, and T. Mustelin. 2004. Control of vesicle fusion by a tyrosine phosphatase. *Nat Cell Biol* 6:831-839.
16. Saito, K., S. Williams, A. Bulankina, S. Honing, and T. Mustelin. 2007. Association of protein-tyrosine phosphatase MEG2 via its Sec14p homology domain with vesicle-trafficking proteins. *J Biol Chem* 282:15170-15178.

17. Abu-Dayyeh, I., M. T. Shio, S. Sato, S. Akira, B. Cousineau, and M. Olivier. 2008. *Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e305.
18. An, H., J. Hou, J. Zhou, W. Zhao, H. Xu, Y. Zheng, Y. Yu, S. Liu, and X. Cao. 2008. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat Immunol* 9:542-550.
19. Hardin, A. O., E. A. Meals, T. Yi, K. M. Knapp, and B. K. English. 2006. SHP-1 inhibits LPS-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342:547-555.
20. Kant, A. M., P. De, X. Peng, T. Yi, D. J. Rawlings, J. S. Kim, and D. L. Durden. 2002. SHP-1 regulates Fc γ receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC. *Blood* 100:1852-1859.
21. Strzelecka-Kiliszek, A., K. Kwiatkowska, and A. Sobota. 2002. Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by Fc γ R. *J Immunol* 169:6787-6794.
22. Boulais, J., M. Trost, C. R. Landry, R. Dieckmann, E. D. Levy, T. Soldati, S. W. Michnick, P. Thibault, and M. Desjardins. 2010. Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* 6:423.
23. Forget, G., Katherine A. Siminovitch, S. Brochu, S. Rivest, D. Radzioch, and M. Olivier. 2001. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *European Journal of Immunology* 31:3185-3196.
24. Skinner, M. A., L. A. MacLaren, and A. G. Wildeman. 1999. Stage-dependent redistribution of the v-ATPase during bovine implantation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47:1247-1254.
25. Forget, G., D. J. Gregory, L. A. Whitcombe, and M. Olivier. 2006. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect. Immun.* 74:6272-6279.
26. Vinet, A. F., M. Fukuda, S. J. Turco, and A. Descoteaux. 2009. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog* 5:e1000628.
27. Beaven, A. E., and K. T. Paynter. 1999. Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zymosan. *Biol Bull* 196:26-33.
28. Rathman, M., M. D. Sjaastad, and S. Falkow. 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun* 64:2765-2773.
29. Bjerknes, R., O. D. Laerum, and W. Knapp. 1984. Inhibition of phagocytosis by monoclonal antibodies to human myeloid differentiation antigens. *Exp Hematol* 12:856-862.
30. Vinet, A. F., M. Fukuda, and A. Descoteaux. 2008. The exocytosis regulator synaptotagmin V controls phagocytosis in macrophages. *the Journal of Immunology* 181:5289-5295.
31. Gomez, M. A., I. Contreras, M. Halle, M. L. Tremblay, R. W. McMaster, and M. Olivier. 2009. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* 2:ra58.
32. Vieira, O. V., C. Bucci, R. E. Harrison, W. S. Trimble, L. Lanzetti, J. Gruenberg, A. D. Schreiber, P. D. Stahl, and S. Grinstein. 2003. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 23:2501-2514.

33. Saxena, S., C. Bucci, J. Weis, and A. Kruttgen. 2005. The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neurotogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci* 25:10930-10940.
34. Dermine, J. F., S. Duclos, J. Garin, F. St-Louis, S. Rea, R. G. Parton, and M. Desjardins. 2001. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* 276:18507-18512.
35. Alvarez-Dominguez, C., R. Roberts, and P. D. Stahl. 1997. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J Cell Sci* 110 (Pt 6):731-743.
36. Ullrich, H. J., W. L. Beatty, and D. G. Russell. 1999. Direct delivery of procathepsin D to phagosomes: implications for phagosome biogenesis and parasitism by *Mycobacterium*. *Eur J Cell Biol* 78:739-748.
37. Haas, A. 2007. The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* 8:311-330.
38. Huynh, K. K., E.-L. Eskelinen, C. C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig, and S. Grinstein. 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *Embo J* 26:313-324.
39. Majeed, M., E. Cavegion, C. A. Lowell, and G. Berton. 2001. Role of Src kinases and Syk in Fc γ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *Journal of Leukocyte Biology* 70:801-811.
40. Greenberg, S., P. Chang, and S. Silverstein. 1993. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 177:529-534.
41. Greenberg, S., P. Chang, D. C. Wang, R. Xavier, and B. Seed. 1996. Clustered Syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1103-1107.
42. Kiefer, F., J. Brumell, N. Al-Alawi, S. Latour, A. Cheng, A. Veillette, S. Grinstein, and T. Pawson. 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 18:4209-4220.
43. Cox, D., B. M. Dale, M. Kashiwada, C. D. Helgason, and S. Greenberg. 2001. A regulatory role for Src Homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc γ receptors and complement receptor 3 (α M β 2; Cd11b/Cd18). *J. Exp. Med.* 193:11.
44. Garcia-Garcia, E., and C. Rosales. 2002. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72:1092-1108.
45. Luzio, J. P., V. Poupon, M. R. Lindsay, B. M. Mullock, R. C. Piper, and P. R. Pryor. 2003. Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* 20:141-154.
46. Desjardins, M., L. A. Huber, R. G. Parton, and G. Griffiths. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124:677-688.
47. Rogers, L. D., and L. J. Foster. 2007. The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:18520-18525.
48. Duclos, S., R. Diez, J. Garin, B. Papadopoulou, A. Descoteaux, H. Stenmark, and M. Desjardins. 2000. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Cell Science* 113:3531-3541.
49. Harrison, R. E., C. Bucci, O. V. Vieira, T. A. Schroer, and S. Grinstein. 2003. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of

- membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23:6494-6506.
50. Flannagan, R. S., G. Cosio, and S. Grinstein. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Micro* 7:355-366.
 51. Marshansky, V., and M. Futai. 2008. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* 20:415-426.
 52. Yates, R. M., and D. G. Russell. 2005. Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity* 23:409-417.
 53. Lukacs, G. L., O. D. Rotstein, and S. Grinstein. 1990. Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPase in murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 265:21099-21107.
 54. Yates, R. M., A. Hermetter, G. A. Taylor, and D. G. Russell. 2007. Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* 8:241-250.
 55. Sun-Wada, G. H., H. Tabata, N. Kawamura, M. Aoyama, and Y. Wada. 2009. Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci* 122:2504-2513.
 56. Peters, C., P. D. Andrews, M. J. Stark, S. Cesaro-Tadic, A. Glatz, A. Podtelejnikov, M. Mann, and A. Mayer. 1999. Control of the terminal step of intracellular membrane fusion by protein phosphatase 1. *Science* 285:1084-1087.
 57. Sandvig, K., and B. van Deurs. 1996. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* 76:949-966.
 58. Muller, J. M., J. Shorter, R. Newman, K. Deinhardt, Y. Sagiv, Z. Elazar, G. Warren, and D. T. Shima. 2002. Sequential SNARE disassembly and GATE-16-GOS-28 complex assembly mediated by distinct NSF activities drives Golgi membrane fusion. *J Cell Biol* 157:1161-1173.
 59. Bayer, M. J., C. Reese, S. Bühler, C. Peters, and A. Mayer. 2003. Vacuole membrane fusion. *The Journal of Cell Biology* 162:211-222.
 60. Hiesinger, P. R., A. Fayyazuddin, S. Q. Mehta, T. Rosenmund, K. L. Schulze, R. G. Zhai, P. Verstreken, Y. Cao, Y. Zhou, J. Kunz, and H. J. Bellen. 2005. The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* 121:607-620.
 61. Liegeois, S., A. Benedetto, J. M. Garnier, Y. Schwab, and M. Labouesse. 2006. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 173:949-961.
 62. Peri, F., and C. Nusslein-Volhard. 2008. Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. *Cell* 133:916-927.
 63. Ren, L., X. Chen, R. Luechapanichkul, N. G. Selner, T. M. Meyer, A.-S. Wavreille, R. Chan, C. Iorio, X. Zhou, B. G. Neel, and D. Pei. 2011. Substrate specificity of protein tyrosine phosphatases 1B, RPTP α , SHP-1, and SHP-2. *Biochemistry*:null-null.
 64. Heinonen, K. M., A. Bourdeau, K. M. Doody, and M. L. Tremblay. 2009. Protein tyrosine phosphatases PTP-1B and TC-PTP play nonredundant roles in macrophage development and IFN- γ signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9368-9372.
 65. Dupuis, M., M. De Jesus Ibarra-Sanchez, M. L. Tremblay, and P. Duplay. 2003. Gr-1⁺ myeloid cells lacking T cell protein tyrosine phosphatase inhibit lymphocyte proliferation by an IFN- γ - and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 171:726-732.

Figure 1. SHP-1 is recruited to phagosomes.

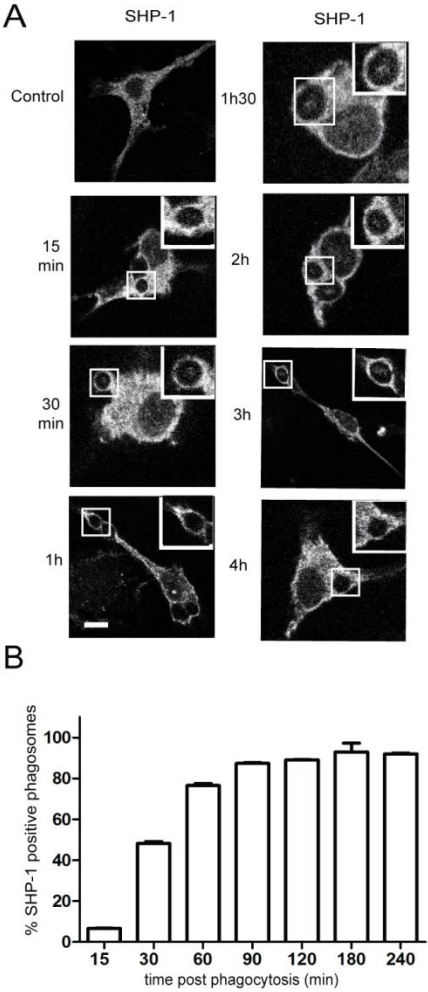


Figure 2. Active PTPs are present in phagosome extracts.

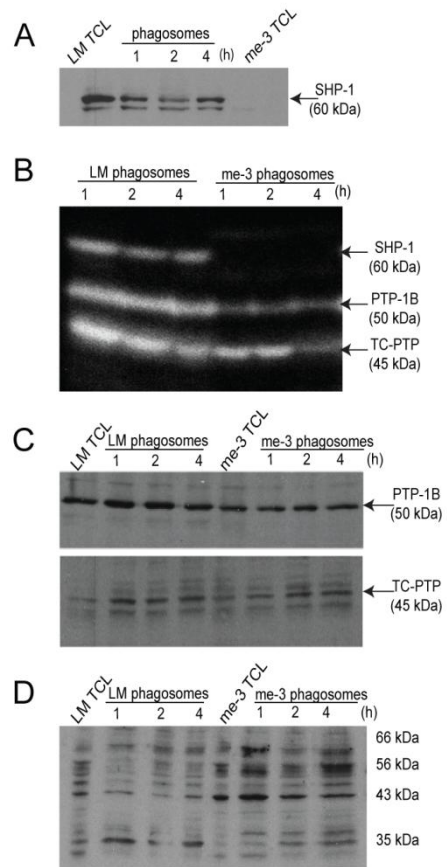


Figure 3. Recruitment of early and late phagosome markers in SHP-1 deficient cells.

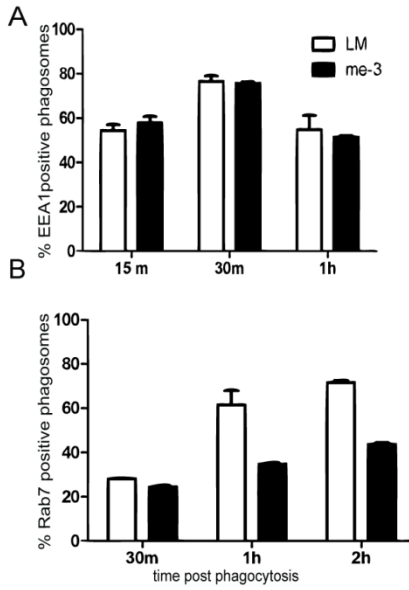


Figure 4. Acquisition of phagolysosomal features is impaired in SHP-1-defective macrophages

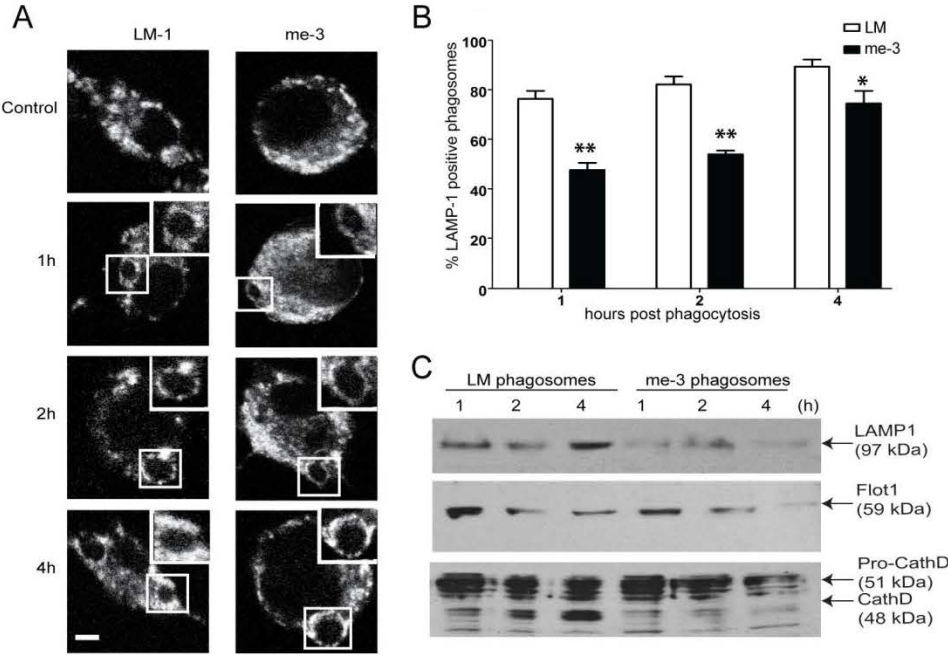


Figure 5. Phagosome acidification is impaired in SHP-1-deficient macrophages.

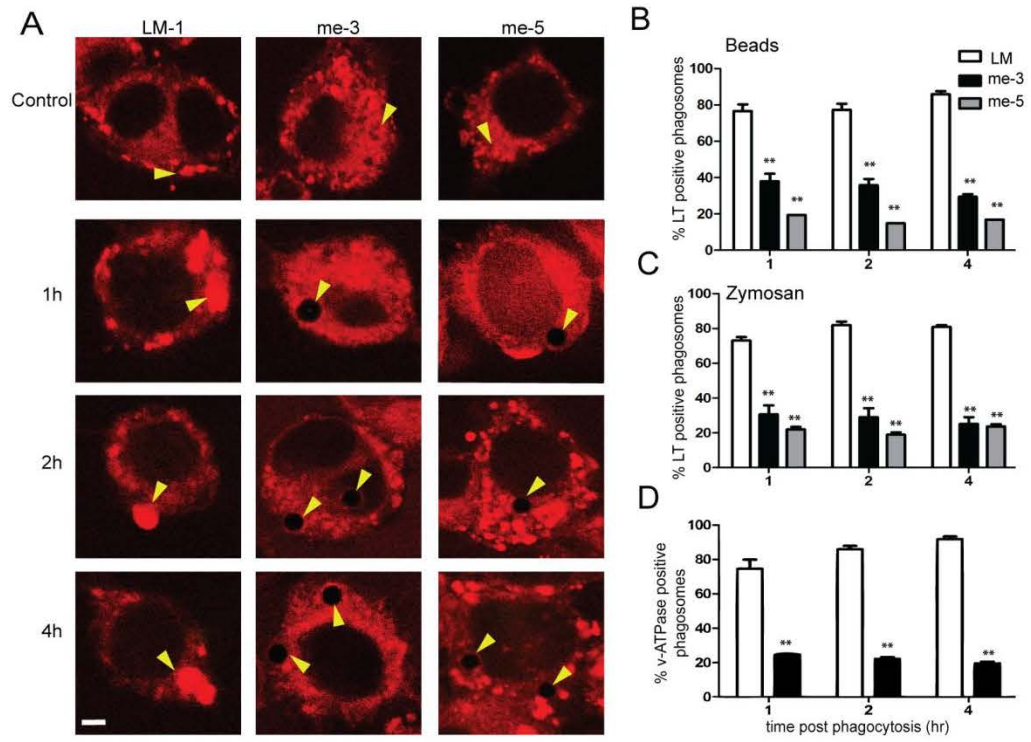


Figure legends

Figure 1. SHP-1 is recruited to phagosomes. *A*, BMM were allowed to internalize serum-opsonized zymosan, fixed, and stained for SHP-1 at different time points after the initiation of internalization. Bar 3 μ m. *B*. SHP-1 acquisition was determined on at least 100 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations of one representative triplicate.

Figure 2. Active PTPs are present in phagosome extracts. *A*. SHP-1 is present in LM-1 phagosome extracts isolated from LM-1 cells at various time points after the start of internalization. Western blot analysis was performed on total cell and phagosomes lysates. SHP-1-deficient me-3 cell lysates were used as a control. The arrow indicates the position of SHP-1. *B*. Active SHP-1, TC-PTP, and PTP-1B are present in phagosome extracts. In-gel PTP assay analysis was performed on phagosomes lysates isolated from LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages at various time points after the start of internalization. Top arrow indicates the position of SHP-1, middle arrow indicates the position of PTP-1B, and bottom arrow indicates the position of TC-PTP. *C*. TC-PTP and PTP-1B are present in phagosome extracts. Western blot analysis was performed on total cell and phagosomes lysates isolated from LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages at various time points after the start of internalization. *D*. Increased tyrosine phosphorylation in phagosome extracts from SHP-1-deficient me-3 macrophages. Western blot analysis was performed on total cell and phagosomes lysates isolated from LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages at various time points after the start of internalization. Similar results were obtained in three independent experiments.

Figure 3. Recruitment of early and late phagosome markers in SHP-1 deficient cells. LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages were allowed to internalize zymosan, and at various time points after the start of internalization, were fixed and stained for either EEA1 or Rab7. EEA1 (A) and Rab7 (B) acquisition are expressed as a percentage of positive phagosomes. At least 100 phagosomes for each condition were assessed. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations of one representative triplicate.

Figure 4. Acquisition of phagolysosomal features is impaired in SHP-1-defective macrophages. A. LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages were allowed to internalize zymosan, and recruitment of LAMP-1 to phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy. Bar, 2 μ m. B. Presence of LAMP-1 was determined on at least 100 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations of one representative triplicate. P value obtained using a two-way Anova ($\alpha=0.05$). C. Bead-phagosomes were isolated from LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages at the indicated time points after the initiation of internalization, and presence of LAMP1, flotillin, and cathepsin D in phagosome extracts was assessed by Western blot analyses. Similar results were obtained in three independent experiments.

Figure 5. Phagosome acidification is impaired in SHP-1-deficient macrophages. LM-1 and SHP-1-deficient me-3 and me-5 macrophages were incubated 2 h with LT prior to internalization of either latex beads (A, B) or serum-opsonized zymosan (C) for the indicated time points and then fixed. A. Presence of LT in latex bead-phagosomes was assessed by confocal immunofluorescence microscopy. Bar, 2 μ m. B, C. Presence of LT was

determined on at least 100 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations of one representative triplicate. *D.* LM-1 and SHP-1-deficient me-3 macrophages were allowed to internalize latex beads for the indicated time points, fixed, and stained for the v-ATPase. v-ATPase acquisition was determined on at least 100 phagosomes for each condition and expressed as a percentage of recruitment. Three independent experiments were performed and the bars show the standard deviations of one representative triplicate.

From: infoji@aai.org [infoji@aai.org]
To: PlazasGomez, Carolina
Cc:
Subject: 11-03021-FL Approved MS Receive
Attachments:

Sent: Wed 19/10/2011 11:52

CC: Dr. Descoteaux

Dear Dr. Gomez:

This e-mail is to notify you that you are listed as a co-author on a manuscript, titled "The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates phagolysosome biogenesis," submitted by Dr. Descoteaux for consideration for publication in The Journal of Immunology. The manuscript has been assigned the manuscript identification number 11-03021-FL.

Regards,

Journal Staff
The Journal of Immunology

DISCUSSION

Nos résultats amènent différentes hypothèses quant à la fonction de SHP-1 chez le macrophage. Dans cette section, nous discuterons de la présence de la protéine tout au long du processus de la phagocytose, ainsi que dans la biogenèse du phagolysosome; les implications de cette présence au niveau de la maturation de cette organelle, et les différentes fonctions que SHP-1 peut avoir selon sa localisation au niveau de la cellule.

1. Localisation de SHP-1

Jusqu'à présent, nous ne savions pas si SHP-1 était présente au niveau des phagosomes, ou si elle était impliquée dans la biologie de cette organelle. Nos travaux démontrent qu'en effet, SHP-1 est recrutée au phagosome dans les temps précoces de la biogenèse du phagosome, soit à 15 minutes post-phagocytose. Nous avons observé par microscopie confocale un marquage cytoplasmique et diffus de SHP-1, accentué au niveau de la coupe phagocytique. Ce recrutement atteint un plateau à 2h post-phagocytose lorsque 80% des cellules présentent des phagosomes positifs pour cette protéine. Normalement, à ce temps, les phagosomes sont considérés matures. L'association de la protéine avec des phagosomes a été vérifiée par immunobuvardage de type Western. Tel qu'attendu, la protéine est présente dans les lysats de macrophages de souris de lignée sauvage (LM), mais aussi dans des extraits de phagosomes isolés, à différents temps post-phagocytose. Comme témoin négatif, nous avons utilisé des extraits de macrophages déficients en SHP-1 (SHP-1^{-/-} me3). L'anticorps utilisé dans cette étude a déjà donné des doublets de bandes lors de la stimulation des macrophages avec du LPS (Zhou *et al.*, 2010), tel qu'observé dans nos immunobuvardages.

Nous avons aussi réalisé des expériences de co-localisation de SHP-1 avec LAMP-1 (Annexe A). Nous avons observé une co-localisation de ces deux protéines chez les macrophages en état de repos. À 1h post-phagocytose, cette co-localisation était présente chez 70% des phagosomes. Bien entendu, ces expériences ne prouvent pas la présence d'une interaction entre ces protéines, mais nous donnent un indice quant au rôle de SHP-1 lors de la phagocytose. Aucune autre protéine pouvant co-localiser avec SHP-1 au niveau du phagosome n'a encore été identifiée.

2. Fonction de la protéine liée à sa localisation

La localisation cellulaire d'une protéine peut être un excellent indice de sa fonction. Nos résultats suggèrent que SHP-1 agit effectivement au niveau du phagosome. Il est intéressant de souligner que SHP-1 possède des fonctions « contradictoires » selon le type de cellule. Toutefois, sa localisation varie aussi selon le type cellulaire étudiée. Généralement, nous retrouvons la protéine au niveau du cytoplasme, mais SHP-1 démontre des localisations intracellulaires aussi diverses que ses rôles au sein d'une cellule. Dans des cellules non hématopoïétiques, SHP-1 régule la transcription de gènes liés à la modulation positive des voies de signalisation en réponse à des mitogènes, ainsi que des gènes de réponse précoce, ce qui explique sa translocation au noyau (Su, L. *et al.*, 1996). Cependant, chez les lymphocytes T, SHP-1 agit en tant que régulateur négatif de la voie de signalisation du récepteur des cellules T (TCR). Dans des hybridomes de lymphocyte T, la fraction de SHP-1 qui se retrouve dans les microdomaines lipidiques (5%) et la fraction restante dans le cytoplasme semblent posséder des différences physiques et fonctionnelles (Fawcett et Lorenz, 2005). Egalement dans les cellules T, une surexpression de SHP-1 sauvage engendre une diminution de l'activation du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT). L'inhibition de l'activité de SHP-1 aura alors comme effet le déclenchement des voies biochimiques en charge de la production de IL-2 en diminuant le seuil d'activation des cellules T (Fortin *et al.*, 2001). Ce n'est pas la première fois qu'une tyrosine phosphatase possède un rôle de régulateur de NFAT: c'est le cas de CD45, qui régule de manière négatif ce facteur (Barbeau *et al.*, 2001). Il est intéressant de souligner que ces dernières études ont démontré l'effet de protéines tyrosine phosphatases lors de l'infection par le VIH, suggérant de cibler les voies régulées par SHP-1 et par d'autres PTPs pour restaurer les fonctions immunitaires normales.

SHP-1 est aussi un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes B. Son importance chez ces cellules est soulignée par sa régulation à la baisse dans le lymphome de Burkitt (Delibrias *et al.*, 1997). Selon cette étude, le rôle de SHP-1 est encore plus controversé chez les mastocytes. Généralement, SHP-1 est considérée comme un régulateur négatif de l'activation de ces cellules. Des mastocytes provenant de souris déficientes en SHP-1 (*me*) démontrent une augmentation de la production de cytokines. Toutefois, suite à une surexpression de SHP-1 chez ces cellules, la production de cytokines augmente aussi (Nakata *et al.*, 2008; Xie, Zhang et Siraganian, 2000). Récemment, une étude avec la

phospholipase C- 3 a démontré que l'activation des mastocytes nécessite le recrutement de SHP-1 (Xiao *et al.*, 2011). Finalement, dans le cas des neutrophiles provenant de souris avec une mutation en SHP-1, diminuant son activité de 80 à 90%, nous retrouvons une hyperactivation de la population de granulocytes caractérisée par une surproduction d'oxydants, une expression de CD18, une augmentation de l'adhésion à la surface cellulaire et de la migration des cellules. Ce phénotype suggère un rôle important de la protéine dans l'activité microbicide des neutrophiles (Kruger, Joshua *et al.*, 2000). Par contre, chez le neutrophile, l'absence de SHP1 n'a aucun effet au niveau de la phagocytose comme tel. En fait, l'étude de Kruger et son équipe en 2000 (Kruger, Joshua *et al.*, 2000) montre des index et des taux de phagocytose semblables entre les macrophages qui expriment SHP-1 et ceux qui n'expriment pas la protéine, contrairement à ce que l'on a observé chez les macrophages (Annexe C). Il faut souligner que souvent, des différents types cellulaires provenant d'un même organisme peuvent présenter des phénotypes très différents. De plus, en ce qui concerne les macrophages, leur provenance au sein d'un organisme (i.e macrophages provenant de la moelle osseuse vs alvéolaires) peuvent démontrer des phénotypes différents. Comme nous pouvons l'apprécier, les rôles de SHP-1 varient selon le type cellulaire étudié, en plus de sa localisation intracellulaire. Nous pouvons apprécier d'avantage la complexité de biologie de SHP-1 puisque dans certains des cas mentionnés, le domaine C-terminal et non la partie catalytique est responsable de la translocation de la protéine au sein de la cellule. Le rôle de protéines adaptatrices et l'importance du domaine C-terminal seront discutés plus loin.

Notre étude est la première à évaluer le recrutement de la protéine SHP-1 lors de la biogenèse du phagolysosome, lors de la phagocytose médiée par les récepteurs Fc, et à démontrer une localisation de SHP-1 au niveau de la coupe phagocytaire. Nous avons vu que les effets de l'hyper phosphorylation de protéines provenant des cellules me3 n'étaient pas compensées par d'autres PTPs, tels que PTP-1B ou TC-PTP (article). Dans le cas de TC-PTP, nous n'avons pas réussi à enlever les bandes non spécifiques, mais nous savons que la bande enrichie dans nos extraits correspond au poids moléculaire de TC-PTP, et nous montrons un résultat typique parmi plusieurs immunobuvardages contre cette protéine.

3. SHP-1 comme régulateur des interactions entre les endosomes et les lysosomes

Considérant la co-localisation de SHP-1 avec LAMP-1, nous nous sommes demandé si SHP-1 joue un rôle dans l'acquisition de ce marqueur de maturation. Nos résultats montrent qu'en absence de SHP-1, le recrutement de LAMP-1 est retardé. Dans le cas de macrophages primaires provenant de souris BALB/c (BMM), ainsi que dans une lignée immortalisée de macrophage provenant de souris LM, le recrutement de LAMP-1 est évident à 1h post phagocytose dans près de 80% des cellules. Ce recrutement atteint un maximum à 2h post-phagocytose, ce qui concorde avec les étapes tardives de la biogenèse du phagolysosome. Par contre, dans une lignée cellulaire provenant de souris déficientes en SHP-1 (*me3*), la cinétique de recrutement de LAMP-1 est altérée. À 1h post-phagocytose, moins de 60% des cellules démontrent un recrutement de LAMP-1 et ce n'est qu'à 4 h post-phagocytose que le recrutement de LAMP-1 au phagosome atteint un niveau « typique » en comparaison avec les cellules LM.

Il a été démontré que l'activité de certaines kinases de la famille Src est essentielle pour la fusion des phagosomes avec les lysosomes (Majeed *et al.*, 2001). Les Fc γ R sont séquestrés, activant 6 membres de cette famille, et l'inhibition des Src bloquent la phagocytose dépendante des IgG ainsi que la génération de coupes phagocytiques riches en actine. En plus, l'inhibition de la famille des Src kinases avec le piceatannol et le 4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*t*-butyl) pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (PP1) bloque la fusion des phagosomes avec les lysosomes suite à l'internalisation des particules de levures non opsonisées. Nous savons aussi que l'activité des Src kinases est régulée par SHP-1. SHP-1 est capable de déphosphoryler le résidu tyrosine de régulation négative de la portion C-terminale des Src kinases, ce qui confère à SHP-1 un rôle important dans la régulation des voies contrôlées par cette famille de kinases (Somani *et al.*, 1997). Il est donc possible que le défaut de recrutement de LAMP-1 soit dû à une absence de l'activation de certaines kinases Src, ce qui affecterait la fusion des phagosomes avec les lysosomes, ainsi que l'acquisition des marqueurs lysosomaux tels que LAMP-1.

D'autres marqueurs précoces de maturation semblent ne pas être affectés par l'absence de SHP-1. C'est le cas de l'antigène endosomal précoce 1 (EEA1). Cette protéine, nécessaire pour l'interaction avec la phosphatidylinositol 3-phosphatase et donc pour la fusion homotypique des endosomes précoces, démontre une distribution cellulaire et un recrutement aux phagosomes indépendant de SHP-1 (Article et Annexe B), similaire

entre les cellules LM et *me*. Dans le cas de la GTPase Rab7, un régulateur du trafic tardif endocytaire, nous n'avons pas observé de grande différence entre les cellules LM *ote* à 30 minutes post-phagocytoses. Par contre, à 1h post-phagocytose, les cellules SHP^{-/-} *me3* démontrent un défaut au niveau du recrutement de Rab7 aux phagosomes, ce qui semblent s'exacerber à 2 h post-phagocytose. Il a été établi que Rab7 est importante pour la formation des lysosomes ainsi que pour leur interaction avec des phagosomes pour la formation finale du phagolysosome (Bucci *et al.*, 2000). Ceci nous a fait questionner quant au rôle potentiel de SHP-1 au niveau de la régulation de cette fusion.

En mûrissant, le phagosome acquiert une acidité plus élevée. Plusieurs protéines mûrissent suite à la baisse du pH dans le phagosome. Deux formes de la cathepsine D sont présentes dans le phagosome, son précurseur (pre cathepsine D) qui, en pH acide, est transformé en forme active (cathepsine D). Malgré que nous observions de nombreuses bandes lors d'immunobuvardages contre cette protéine, les bandes spécifiques à l'anticorps sont celles indiquées par des flèches dans la figure 4 de l'article. Nous avons trouvé que le recrutement phagosomal du précurseur de cathepsine D est similaire chez les cellules LM et *me*. Cependant, les cellules *me* ont démontré une déficience en l'acquisition de la forme active de la cathepsine D dans les extraits de phagosomes. Normalement, suite à la phagocytose, la forme active de la cathepsine D prend graduellement la place de son précurseur, un effet observé dans les extraits de phagosomes provenant de LM. Des études précédentes ont démontré que la pré cathepsine D est présente dans les phagosomes dès 7 minutes post phagocytose, et qu'elle est complètement transformée en sa forme active vers 1h post-phagocytose (Ullrich, Beatty et Russell, 1999). La bafilomycine est un antibiotique qui inhibe spécifiquement les pompes à proton-ATPases des vacuoles lysosomales, empêchant ainsi l'acidification, et donc l'activation des enzymes lysosomales (Porcaro *et al.*, 2002). De manière intéressante, en diminuant l'acidité du phagolysosome avec la bafilomycine nous avons obtenu des résultats similaires à ceux des expériences effectuées avec les cellules SHP^{-/-} *me3*. Il est encore plus intéressant de noter le fait qu'en utilisant cet antibiotique, Ullrich et son équipe ont observé la même tendance que nous quant au recrutement de LAMP-1, ce qui nous indique que les différences observées sont possiblement liées à un défaut d'acidification des phagolysosomes.

À l'aide d'une sonde acidotrope (LysoTracker), nous avons marqué des cellules qui expriment SHP-1 (LM1), ainsi que deux clones indépendants de cellules déficientes en

SHP-1 (SHP^{-/-} me3 et me5). Indépendamment du type de particule phagocytée, les cellules déficientes en SHP-1 ont démontré un défaut d'acidification de leur phagosomes par rapport à LM1, ce qui pourrait alors expliquer le défaut au niveau de la transformation de la cathepsine D. Bucci et son équipe (Bucci *et al.*, 2000) ont obtenu des résultats similaires en absence de Rab7, soit un taux d'acidification plus bas, ainsi qu'un défaut au niveau du recrutement de la cathepsine D. Ensemble, les effets de la bafilomycine ou l'absence de Rab7 semblent indiquer que SHP-1 pourrait affecter intensément l'acidification du phagolysosome via l'acquisition de la pompe à protons v-ATPase.

Évidemment, nous avons par la suite voulu évaluer si le recrutement de la v-ATPase était effectivement affecté par l'absence de SHP-1. En accord avec nos résultats avec le LysoTracker et Rab7, nous avons observé une différence marquée dans le recrutement de la v-ATPase entre les cellules LM1 versus les cellules déficientes en SHP-1 (SHP^{-/-} me3). En effet, à 1h post-phagocytose, les cellules LM1 démontrent un recrutement typique de la v-ATPase dans 70% des phagosome, tandis que les cellules SHP^{-/-} me3 démontrent leur recrutement dans à peine 30% des phagosomes. De plus, contrairement à la lignée sauvage LM1, le pourcentage de phagosomes positifs pour la v-ATPase diminue avec le temps (Article et Annexe B). Nos résultats suggèrent que SHP-1 joue un rôle dans la formation du phagolysosome. Il est possible que cette protéine soit impliquée au niveau de l'interaction entre le phagosome tardif et le lysosome et son absence causerait un défaut dans l'acquisition des certains marqueurs fonctionnels du phagosome tardif, ainsi que dans l'activation des hydrolases. Nous ne pouvons confirmer pour l'instant si ce phénotype observé est dû à une interaction directe entre SHP-1 et Rab7 ou avec la v-ATPase. Des expériences additionnelles seront nécessaires pour éclaircir ce sujet, tels que des essais de phagocytose lors de l'inhibition de l'une des ces protéines. Dans notre laboratoire, nous possédons des lignées cellulaires déficientes en v-ATPase, ce qui permettra d'étudier si les effets observés sont liés à cette protéine.

L'acidification des phagosomes n'est pas seulement importante pour la transformation correcte de certaines protéines, comme nous l'avons déjà mentionné, mais aussi pour la dégradation des agents pathogènes (Beaven et Paynter, 1999; Rathman, Sjaastad et Falkow, 1996). L'acidification générée par le recrutement de pompes protoniques est un des mécanismes les plus étudiés pour cette partie de la maturation du phagosome (Lukacs, Rotstein et Grinstein, 1990) et nous avons démontré dans notre laboratoire que ce recrutement est affecté par l'infection avec *Leishmania* (Vinet et al., 2009). En plus,

nous savons que SHP-1 interagit de manière fonctionnelle avec un autre régulateur du pH, l'échangeur Na^+/H^+ (NHE)1, et que la surexpression de SHP-1 peut mener à l'activation de (NHE)1 (Xue *et al.*, 2007). Des études de protéomique visant à évaluer les interactions entre SHP-1 et la v-ATPase permettront d'élucider le rôle de la phosphatase dans le recrutement de la pompe.

4. SHP-1 comme protéine adaptatrice : l'importance des domaines d'homologies.

Comme nous l'avons mentionné dans la revue de littérature, SHP-1 est caractérisée par ses deux domaines de reconnaissance de résidus tyrosine phosphorylés de type SH2 dans sa partie N-terminale, suivis de son site catalytique et finalement par son domaine C-terminal. C'est le domaine SH2 N-terminal qui forme les contacts extensifs avec le domaine catalytique de la protéine pour la rendre inactive. Cependant, une fois qu'un phosphopeptide s'attache à ce domaine, un changement de type allostérique a lieu, ce qui permet son activation. Ce type d'autorégulation intramoléculaire est unique à SHP-1 et SHP-2 (Chong et Maiese, 2007).

À ce jour, 4 isoformes de SHP-1 possédant des variations au niveau du domaine N-terminal ont été identifiés. Un de ces isoformes est spécifique pour les cellules hématopoïétiques tandis qu'un second n'y est pas exprimé (Banville, Stocco et Shen, 1995). La production de chaque isoforme est dépendante des différents sites d'initiation de la transcription. De plus, une autre forme de SHP-1 a été décrite en 1999 (Jin, Yu et Burakoff, 1999) avec un poids moléculaire légèrement plus élevé, ainsi que des différences au niveau de la partie C-terminale et l'activité de la protéine, nommée SHP-1L.

La plupart des mutations en SHP-1 ont été insérées dans le domaine catalytique de cette protéine pour étudier ses substrats (Frank *et al.*, 2004; Timms *et al.*, 1998) ainsi que la sélectivité de la protéine pour chaque résidu phosphorylé (Ren *et al.*, 2011). L'inactivation de phosphatases par mutagenèse est une des méthodes les plus communes pour étudier leurs substrats physiologiques. Il a été démontré qu'une altération de la cystéine nucléophile pour une sérine ou encore pour une alanine permet une interaction irréversible de certaines PTPs avec leurs partenaires (Flint *et al.*, 1997; Jia *et al.*, 1995).

Afin de créer une version mutante inactive de SHP-1, la cystéine 453 localisée dans le domaine catalytique de la protéine a été remplacée par une sérine (Cys453→Ser453) (Timms *et al.*, 1998). C'est avec ce mutant que la protéine régulatrice de signal, BIT et PIR-B ou « paired Ig-like receptor » ont été identifiés comme des substrats de SHP-1.

Des études récentes ont montré l'importance du domaine C-terminal, comprenant un rôle lors de la phosphorylation des tyrosines et sérines, l'interaction avec des membranes lipidiques, la localisation dans les microdomaines lipidiques et l'interaction avec des domaines riches en prolines (Pei *et al.*, 1994). Cette phosphorylation des tyrosines est devenue plus intéressante après les travaux de Lorenz en 1994 (Lorenz *et al.*, 1994) qui ont montré un rôle pour le domaine C-terminal de SHP-1 comme adaptateur pour le recrutement de la protéine d'union au récepteur du facteur de croissance 2 (Grb2). Ce recrutement est requis pour le blocage de la protéine inhibitrice suppresseur de la signalisation par les cytokines 1 (SOCS-1) (Minoo *et al.*, 2004). La phosphorylation de la Tyr⁵³⁶, présente dans le domaine C-terminal, a été impliquée dans le recrutement des substrats. Ce résidu est conservé dans SHP-1L et suggère une fonction adaptatrice liée au recrutement des autres molécules ou dans l'auto modulation de SHP-1 (Yang, W. *et al.*, 1998).

Nous avons alors considéré le rôle de SHP-1 comme protéine adaptatrice, et nous visons à étudier en profondeur cette possibilité. Comme mentionné auparavant, SHP-1 est nécessaire pour la régulation de l'activation des mastocytes par la voie de FcεRI (Xiao *et al.*, 2011). Ce n'est pas l'activité de SHP-1 qui est nécessaire, mais la présence de la phosphatase comme tel en parallèle avec la phospholipase C-β3 (PLC-β3). En absence de SHP-1 mais pas de PLC-β3, la production de l'IL-6 est légèrement plus élevée que dans le cas contraire, mais il n'atteint pas les niveaux observés lorsque les deux protéines sont présentes. Fait intéressant, PLC-β3 agit aussi en tant que protéine adaptatrice. Une fois que nous aurons identifié des interactions plus spécifiques entre SHP-1 et d'autres protéines, nous pourrions déterminer si les effets observés dans cette étude sont dus à l'activité de SHP-1 ou à sa présence.

CONCLUSION

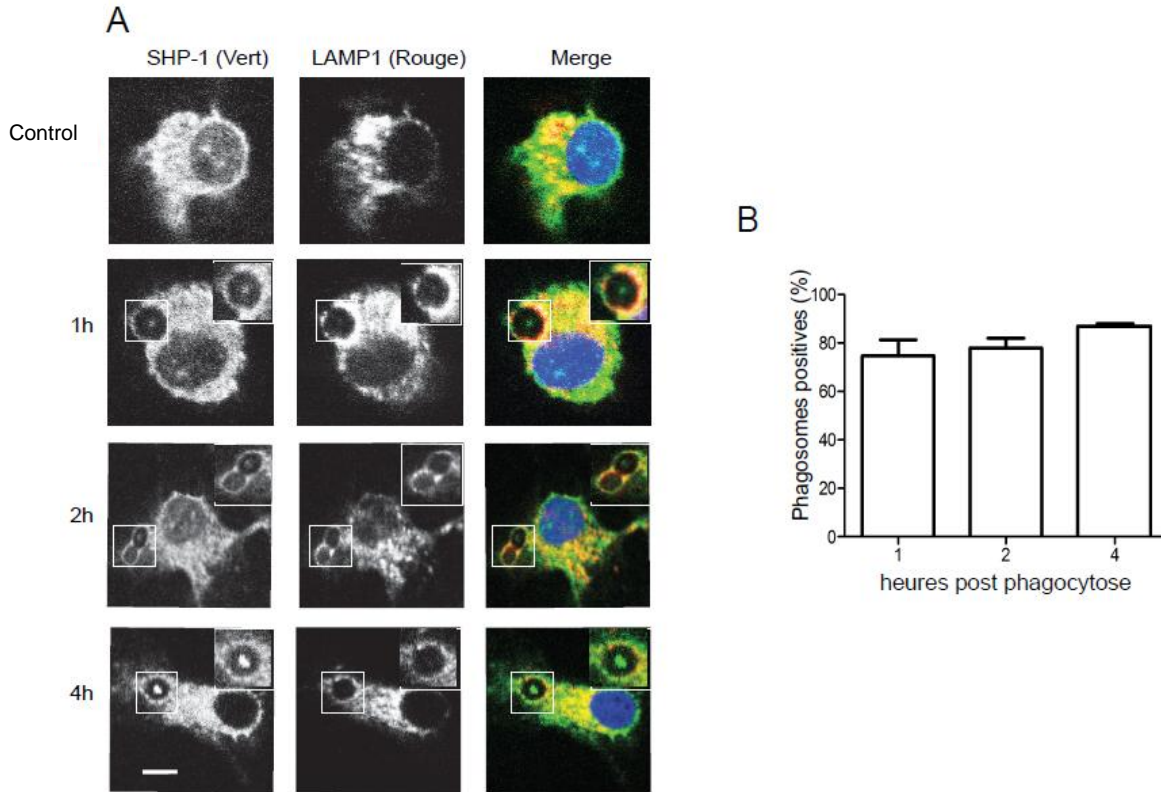
Notre étude est la première à démontrer le recrutement de SHP-1 au phagosome. Nous avons démontré ce recrutement par immunobuvardage de type western et par visualisation en microscopie confocale. C'est avec ces données que nous supportons notre hypothèse que SHP-1 joue un rôle important dans la vie du phagosome. Encore plus intéressantes sont nos données qui démontrent comment la maturation du phagosome, et donc la biogenèse du phagolysosome, est affectée en absence de SHP-1. Dans les cellules déficientes en SHP-1 *me*^{-/-}, nous observons un délai marqué au niveau de l'acquisition des marqueurs du phagosomes tardifs /phagolysosomes, dont Rab7, LAMP-1 et la v-ATPase, ainsi que des caractéristiques typiques de ces organelles, tel l'acidification de la vacuole. Nous savons aussi que les phagosomes précoces ne semblent pas être affectés par l'absence de SHP-1 vu le recrutement d'EEA1 de type sauvage. Nous proposons un modèle où SHP-1 participe à la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes, et donc à la formation des phagolysosomes.

L'absence de SHP-1 n'est pas compensée par d'autres PTPs. PTP-1B et TC-PTP demeurent présentes et actives dans les cellules déficientes en SHP-1 *me*^{-/-}, mais ni l'hyper phosphorylation des résidus de tyrosine ni le délai dans la maturation des phagosomes ne semblent être corrigées par ces PTPs. De plus, nous avons démontré que la phagocytose comme tel est aussi affectée, indépendamment du type de particules phagocytées, tel que nous avons montré avec des globules rouges du mouton, des billes en latex et finalement avec du zymosan. Dans ces trois cas, l'index de phagocytose est beaucoup plus bas dans les cellules déficientes en SHP-1 *me*^{-/-}. Considérant que l'index d'adhésion des SRBC ainsi que leur ratio d'adhésion de particules demeurent similaire à ceux des cellules LM, nous proposons que ce soient la formation des pseudopodes et la subséquente invagination des particules qui est affecté par SHP-1. Cette hypothèse est aussi appuyée par nos observations (non documenté) en culture cellulaire où les cellules déficientes en SHP-1 *me*^{-/-} semblent garder une forme plus arrondie, même en adhésion, contrairement aux cellules LM.

Nous considérons fortement la possibilité que les rôles décrits ici sont dues plutôt à la présence physique de SHP-1 et non à ses propriétés catalytiques, considérant encore une fois que d'autres PTPs ne semblent pas être capables de compenser pour son absence. De plus, plusieurs publications récentes ont démontré l'importance du domaine C-terminale de la protéine. Il nous reste à identifier les substrats de SHP-1 et à déterminer si SHP-1 joue un rôle direct ou non lors de la biogenèse du phagolysosome.

ANNEXE A

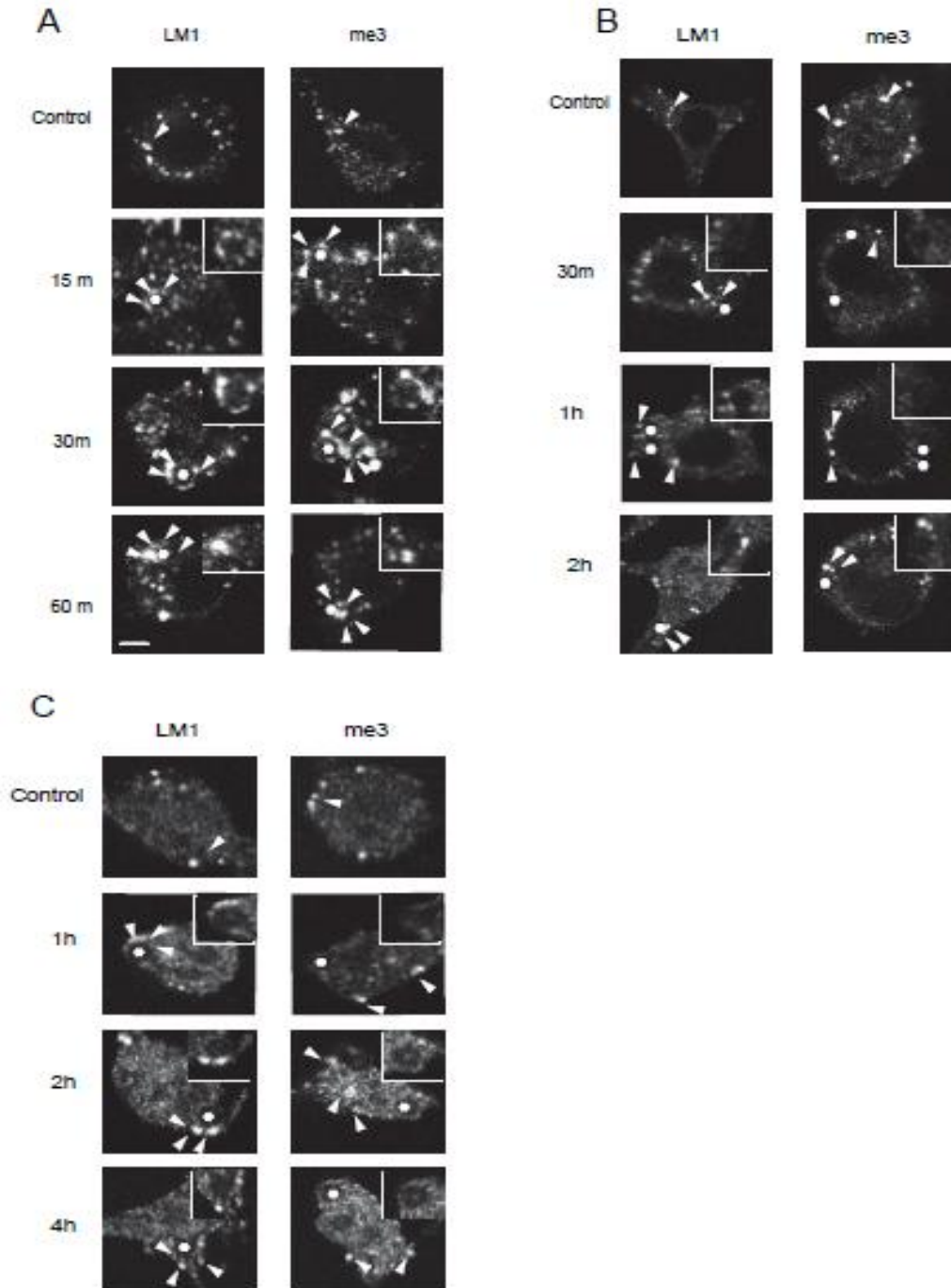
Co-localisation entre SHP-1 et LAMP-1 dans des macrophages dérivés de la moelle
osseuse



Légende : Co-localisation entre SHP-1 et LAMP-1 dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse. A) SHP-1 et LAMP-1 sont toutes les deux recrutées aux phagosomes formées par des BMMs avec du zymosan opsonisés avec du sérum, et montrent une co-localisation, même en état de repos, fait déterminé par microscopie confocale. Le carré en haute à droite montré un phagosome magnifié. Ligne, 2 μ m. B) Quantification de la co-localisation entre SHP-1 et LAMP-1 post-phagocytose. 100 phagosomes étaient comptés par triplicata, et chaque expérience était répétée au moins 2 fois.

ANNEXE B

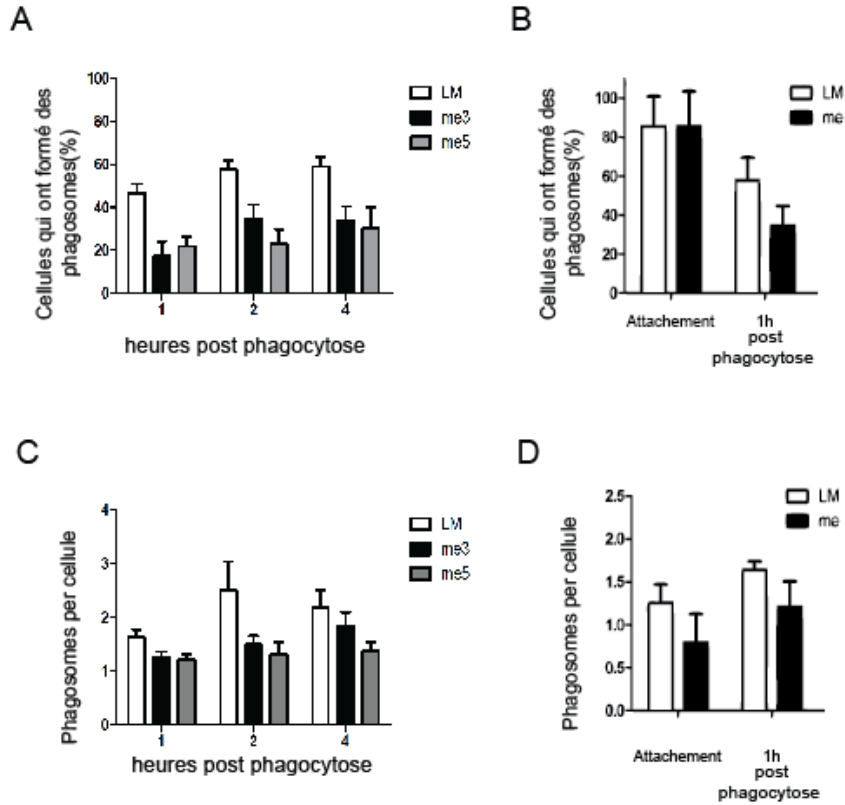
Distribution de EEA 1, Rab7 et v-ATPase dans des cellules LM1 et SHP-1^{-/-} *me3*



Légende : Distribution de EEA 1, Rab7 et v-ATPase dans des cellules LM1 et SHP-1^{-/-} me3. Recrutement de EEA1(A) Rab7 (B) et v-ATPase (C) en cellules LM et SHP-1^{-/-} me3. L'astérisque montre la position du phagosome et les têtes de flèche blanches montrent la localisation de la protéine. Le carré en haute à droite montré un phagosome magnifié. Microscopie confocale, Ligne, 2µm.

ANNEXE C

Différences dans le taux et ratio de phagocytose et d'attachement aux particules entre
cellules LM1 et SHP-1^{-/-}



Légende : Différences dans le taux et ratio de phagocytose et d'attachement aux particules entre cellules LM1 et SHP-1^{-/-}. A) Index de phagocytose dans les cellules LM et deux clones SHP-1^{-/-} *me3* et *me5*. Expérience de phagocytose avec des particules de zymosan opsonisés avec du sérum.. B) Index de d'attachement et de phagocytose dans les cellules LM et SHP-1^{-/-} *me3*. Expérience de phagocytose avec des globules rouges de mouton (SRBC). C) Taux de phagocytose dans les cellules LM et deux clones SHP-1^{-/-} *me3* et *me5*. Expérience de phagocytose avec des particules de zymosan opsonisés avec du sérum. D) Taux de d'attachement et de phagocytose dans les cellules LM et SHP-1^{-/-} *me3*. Expérience de phagocytose avec des globules rouges de mouton. Pour toutes : Index déterminé comme pourcentage de cellules qui ont formé des phagosomes per cellules totales et Taux déterminé comme quantité de phagosomes formés ou SRBC attachés par cellule. A et B, LysoTracker. C et D, coloration Giemsa.

RÉFÉRENCES

- Abu-Dayyeh, I., *et al.* (2008). "*Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif." *PLoS Negl Trop Dis* **2**(12): e305.
- Aderem, A. et D. M. Underhill (1999a). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Aderem, A. et D. M. Underhill (1999b). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Akira, S. et H. Hemmi (2003). "Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family." *Immunol Lett* **85**(2): 85-95.
- Alonso, A., *et al.* (2004). "Protein tyrosine phosphatases in the human genome." *Cell* **117**(6): 699-711.
- Alvarez-Dominguez, C., R. Roberts et P. D. Stahl (1997). "Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome." *J Cell Sci* **110** (Pt 6): 731-43.
- An, H., *et al.* (2008). "Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1." *Nat Immunol* **9**(5): 542-550.
- Andersen, J. N., *et al.* (2004). "A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage." *FASEB J* **18**(1): 8-30.
- Andrejewski, N., *et al.* (1999). "Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice." *J Biol Chem* **274**(18): 12692-701.
- Areschoug, T. et S. Gordon (2009). "Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis." *Cell Microbiol* **11**(8): 1160-9.
- Banville, D., R. Stocco et S. H. Shen (1995). "Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts." *Genomics* **27**(1): 165-73.
- Barbeau, B., *et al.* (2001). "Negative regulation of the NFAT1 factor by CD45: Implication in HIV-1 long terminal repeat activation." *The Journal of Immunology* **167**(5): 2700-2713.
- Baruzzi, A., E. Cavegion et G. Berton (2008). "Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases." *Cell Mol Life Sci* **65**(14): 2175-90.
- Beaven, A. E. et K. T. Paynter (1999). "Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zymosan." *Biol Bull* **196**(1): 26-33.
- Beresford, N., *et al.* (2007). "MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity." *Biochem J* **406**(1): 13-8.

- Beresford, N. J., *et al.* (2009). "Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages." J Antimicrob Chemother **63**(5): 928-36.
- Bjerknes, R., O. D. Laerum et W. Knapp (1984). "Inhibition of phagocytosis by monoclonal antibodies to human myeloid differentiation antigens." Exp Hematol **12**(11): 856-62.
- Blanchette, J., *et al.* (1999). "*Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered JAK2 activation." European Journal of Immunology **29**(11): 3737-3744.
- Blander, J. M. et R. Medzhitov (2004). "Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors." Science **304**(5673): 1014-1018.
- Blom, A. M., T. Hallstrom et K. Riesbeck (2009). "Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond." Mol Immunol **46**(14): 2808-17.
- Bohdanowicz, M., *et al.* (2010). "Class I and class III phosphoinositide 3-kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes." The Journal of Cell Biology **191**(5): 999-1012.
- Booth, J. W., W. S. Trimble et S. Grinstein (2001). "Membrane dynamics in phagocytosis." Semin Immunol **13**(6): 357-64.
- Botelho, R. J., *et al.* (2002). "Fc γ R-mediated phagocytosis stimulates localized pinocytosis in human neutrophils." J Immunol **169**(8): 4423-9.
- Botto, M. (2004). "Phosphatidylserine receptor and apoptosis: consequences of a non-ingested meal." Arthritis Res Ther **6**(4): 147-50.
- Bouchard, P., *et al.* (1994). "Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C." J Biol Chem **269**(30): 19585-9.
- Boulais, J., *et al.* (2010). "Molecular characterization of the evolution of phagosomes." Mol Syst Biol **6**: 423.
- Bourdeau, A., N. Dube et M. L. Tremblay (2005). "Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 203-9.
- Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol **6**(1): 33-43.
- Bucci, C., *et al.* (2000). "Rab7: a key to lysosome biogenesis." Mol Biol Cell **11**(2): 467-80.
- Cantalupo, G., *et al.* (2001). "Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes." Embo J **20**(4): 683-93.

- Crowley, M. T., *et al.* (1997). "A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages." J Exp Med **186**(7): 1027-39.
- Chong, Z. Z. et K. Maiese (2007). "The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury." Histol Histopathol **22**(11): 1251-67.
- D'Ambrosio, D., *et al.* (1995). "Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc γ RIIB1." Science **268**(5208): 293-7.
- Delibrias, C. C., *et al.* (1997). "Downregulated expression of SHP-1 in Burkitt lymphomas and germinal center B lymphocytes." J. Exp. Med. **186**(9): 1575-1583.
- Deretic, V. et R. A. Fratti (1999). "*Mycobacterium tuberculosis* phagosome." Mol Microbiol **31**(6): 1603-9.
- Dermine, J. F., *et al.* (2001). "Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes." J Biol Chem **276**(21): 18507-12.
- Dermine, J. F., *et al.* (2005). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages." Cell Microbiol **7**(9): 1263-70.
- Desjardins, M. (1995). "Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis." Trends Cell Biol **5**(5): 183-6.
- Desjardins, M. et A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan." J Exp Med **185**(12): 2061-8.
- Desjardins, M., *et al.* (1994). "Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus." J Cell Biol **124**(5): 677-88.
- Desjardins, M., *et al.* (1997). "Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes." J Cell Sci **110** (Pt 18): 2303-14.
- Dieudonné-Vatran, A., *et al.* (2009). "Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* Bind the Complement Inhibitor C4b-Binding Protein in a PspC Allele-Dependent Fashion." The Journal of Immunology **182**(12): 7865-7877.
- Drecktrah, D., *et al.* (2006). "The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression." Traffic **7**(1): 39-51.
- Duclos, S., *et al.* (2000). "Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages." Journal of Cell Science **113**(19): 3531-3541.
- Dumas, J. J., *et al.* (2001). "Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1." Mol Cell **8**(5): 947-58.

- Ehlers, M. R. (2000). "CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity." Microbes Infect **2**(3): 289-94.
- Elchebly, M., *et al.* (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." Science **283**(5407): 1544-8.
- Erbacher, A., *et al.* (2009). "Dendritic cells: Functional aspects of glycosylation and lectins." Human Immunology **70**(5): 308-312.
- Ernst, J. D. (2000). "Bacterial inhibition of phagocytosis." Cell Microbiol **2**(5): 379-86.
- Eskelinen, E. L., Y. Tanaka et P. Saftig (2003). "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." Trends Cell Biol **13**(3): 137-45.
- Fadok, V. A., *et al.* (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." Nature **405**(6782): 85-90.
- Fawcett, V. C. et U. Lorenz (2005). "Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus." J Immunol **174**(5): 2849-59.
- Feng, Y., B. Press et A. Wandinger-Ness (1995). "Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic." J Cell Biol **131**(6 Pt 1): 1435-52.
- Fitzer-Attas, C. J., *et al.* (2000). "Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn." J Exp Med **191**(4): 669-82.
- Flannagan, R. S., G. Cosio et S. Grinstein (2009). "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies." Nat Rev Micro **7**(5): 355-366.
- Flint, A. J., *et al.* (1997). "Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1680-5.
- Forget, G., *et al.* (2006). "Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production." Infect. Immun. **74**(11): 6272-6279.
- Forget, G., *et al.* (2001). "Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis." European Journal of Immunology **31**(11): 3185-3196.
- Fortin, J.-F., *et al.* (2001). "Regulation of nuclear factor of activated T cells by phosphotyrosyl-specific phosphatase activity: a positive effect on HIV-1 long terminal repeat-driven transcription and a possible implication of SHP-1." Blood **97**(8): 2390-2400.
- Foster, T. J. (2005). "Immune evasion by staphylococci." Nat Rev Microbiol **3**(12): 948-58.

- Frangioni, J. V., *et al.* (1992). "The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence." Cell **68**(3): 545-560.
- Frank, C., *et al.* (2004). "Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1." J Biol Chem **279**(12): 11375-83.
- Fratti, R. A., *et al.* (2001). "Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest." J Cell Biol **154**(3): 631-44.
- Fu, Y. et J. E. Galan (1998). "The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton." Mol Microbiol **27**(2): 359-68.
- Garcia-Garcia, E. et C. Rosales (2002). "Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis." J Leukoc Biol **72**(6): 1092-108.
- Garin, J., *et al.* (2001). "The phagosome proteome: insight into phagosome functions." J Cell Biol **152**(1): 165-80.
- Gazi, U. et L. Martinez-Pomares (2009). "Influence of the mannose receptor in host immune responses." Immunobiology **214**(7): 554-561.
- Gessner, J. E., *et al.* (1998). "The IgG Fc receptor family." Ann Hematol **76**(6): 231-48.
- Gomez, M. A., *et al.* (2009). "*Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases." Sci Signal **2**(90): ra58.
- Gordon, A. H., P. D. Hart et M. R. Young (1980). "Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages." Nature **286**(5768): 79-80.
- Gordon, S. et P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-64.
- Green, M. C. et L. D. Shultz (1975). "Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology." J Hered **66**(5): 250-8.
- Greenberg, S. (1995). "Signal transduction of phagocytosis." Trends in Cell Biology **5**(3): 93-99.
- Gutierrez, M. G., *et al.* (2008). "NF- κ B activation controls phagolysosome fusion-mediated killing of *Mycobacteria* by macrophages." The Journal of Immunology **181**(4): 2651-2663.
- Haas, A. (2007). "The phagosome: compartment with a license to kill." Traffic **8**(4): 311-30.
- Hardin, A. O., *et al.* (2006). "SHP-1 inhibits LPS-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages." Biochemical and Biophysical Research Communications **342**(2): 547-555.

- Harrison, R. E., *et al.* (2003). "Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP." Mol Cell Biol **23**(18): 6494-506.
- Hauck, C. R., *et al.* (1999). "Tyrosine phosphatase SHP-1 Is involved in CD66-mediated phagocytosis of Opa52-Expressing *Neisseria gonorrhoeae*." Infect. Immun. **67**(10): 5490-5494.
- Heinonen, K. M., *et al.* (2009). "Protein tyrosine phosphatases PTP-1B and TC-PTP play nonredundant roles in macrophage development and IFN- γ signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(23): 9368-72.
- Herre, J., S. Gordon et G. D. Brown (2004). "Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages." Mol Immunol **40**(12): 869-76.
- Herre, J., *et al.* (2004). "The role of Dectin-1 in antifungal immunity." Crit Rev Immunol **24**(3): 193-203.
- Huang, Z.-Y., *et al.* (2003). "The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fc γ receptors Fc γ RIIB and Fc γ RIIA." J Leukoc Biol **73**(6): 823-829.
- Hunter, T. (2009). "Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting." Current Opinion in Cell Biology **21**(2): 140-146.
- Huynh, H., *et al.* (2004). "Control of vesicle fusion by a tyrosine phosphatase." Nat Cell Biol **6**(9): 831-839.
- Huynh, K. K., *et al.* (2007). "LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes." Embo J **26**(2): 313-324.
- Huynh, K. K. et S. Grinstein (2007). "Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species." Microbiol Mol Biol Rev **71**(3): 452-62.
- Imbuluzqueta, E., *et al.* (2010). "Drug delivery systems for potential treatment of intracellular bacterial infections." Front Biosci **15**: 397-417.
- Iwasaki, A. et R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." Science **327**(5963): 291-295.
- Jia, Z., *et al.* (1995). "Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B." Science **268**(5218): 1754-8.
- Jin, Y. J., C. L. Yu et S. J. Burakoff (1999). "Human 70-kDa SHP-1L differs from 68-kDa SHP-1 in its C-terminal structure and catalytic activity.
." J Biol Chem **274**(40): 28301-7.
- Jutras, I., *et al.* (2005). "Gamma-secretase is a functional component of phagosomes." J Biol Chem **280**(43): 36310-7.

- Kant, A. M., *et al.* (2002). "SHP-1 regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC." Blood **100**(5): 1852-1859.
- Kawai, T. et S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-84.
- Kiefer, F., *et al.* (1998). "The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils." Mol Cell Biol **18**(7): 4209-20.
- Kim, H. Y., *et al.* (2006). "Raft-mediated Src homology 2 domain-containing proteintyrosine phosphatase 2 (SHP-2) regulation in microglia." Journal of Biological Chemistry **281**(17): 11872-11878.
- Kinchen, J. M. et K. S. Ravichandran (2008). "Phagosome maturation: going through the acid test." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(10): 781-795.
- Knutson, K. L., *et al.* (1998). "Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1." J Biol Chem **273**(1): 645-52.
- Kosugi, A., *et al.* (2001). "Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts." Immunity **14**(6): 669-680.
- Kruger, J., *et al.* (2000). "Deficiency of Src homology 2-containing phosphatase 1 results in abnormalities in murine neutrophil function: studies in motheaten mice." The Journal of Immunology **165**(10): 5847-5859.
- Kruger, J. M., *et al.* (2002). "Protein-tyrosine phosphatase MEG2 is expressed by human neutrophils. Localization to the phagosome and activation by polyphosphoinositides." J Biol Chem **277**(4): 2620-8.
- Kuraishi, T., *et al.* (2007). "Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*." Experimental Cell Research **313**(3): 500-510.
- Lim, W. A. et T. Pawson (2010). "Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system." Cell **142**(5): 661-7.
- Lodge, R. et A. Descoteaux (2005). "Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*." Clin Immunol **114**(3): 256-65.
- Lodge, R., T. O. Diallo et A. Descoteaux (2006). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane." Cell Microbiol **8**(12): 1922-31.
- Lorenz, U., *et al.* (1994). "Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells." Mol Cell Biol **14**(3): 1824-34.
- Lukacs, G. L., O. D. Rotstein et S. Grinstein (1990). "Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages." Journal of Biological Chemistry **265**(34): 21099-21107.

- Luzio, J. P., *et al.* (2003). "Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes." Mol Membr Biol **20**(2): 141-54.
- Majeed, M., *et al.* (2001). "Role of Src kinases and Syk in Fc γ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion." Journal of Leukocyte Biology **70**(5): 801-811.
- Medzhitov, R. et C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N Engl J Med **343**(5): 338-44.
- Medzhitov, R. et C. A. Janeway, Jr. (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." Science **296**(5566): 298-300.
- Minoo, P., *et al.* (2004). "A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling." Blood **103**(4): 1398-407.
- Miró-Julià, C., *et al.* (2011). "Molecular and Functional Characterization of Mouse S5D-SRCRB: A New Group B Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily." The Journal of Immunology **186**(4): 2344-2354.
- Murphy, J. E., *et al.* (2005). "Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors." Atherosclerosis **182**(1): 1-15.
- Nakata, K., *et al.* (2008). "Positive and negative regulation of high affinity IgE receptor signaling by Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1." J Immunol **181**(8): 5414-24.
- Neel, B. G. et N. K. Tonks (1997). "Protein tyrosine phosphatases in signal transduction." Current Opinion in Cell Biology **9**(2): 193-204.
- Ng Yan Hing, J. D., M. Desjardins et A. Descoteaux (2004). "Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C- α in phagosome maturation." Biochem Biophys Res Commun **319**(3): 810-6.
- Ofek, I., *et al.* (1995). "Nonopsonic phagocytosis of microorganisms." Annu Rev Microbiol **49**: 239-76.
- Olivier, M., D. J. Gregory et G. Forget (2005). "Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view." Clin. Microbiol. Rev. **18**(2): 293-305.
- Olsen, J. V., *et al.* (2006). "Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks." Cell **127**(3): 635-648.
- Paling, N. R. et M. J. Welham (2002). "Role of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 (Src homology phosphatase-1) in the regulation of interleukin-3-induced survival, proliferation and signalling." Biochem J **368**(Pt 3): 885-94.
- Palm, N. W. et R. Medzhitov (2009). "Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity." Immunological Reviews **227**(1): 221-233.

- Park, H., D. Ishihara et D. Cox (2011). "Regulation of tyrosine phosphorylation in macrophage phagocytosis and chemotaxis." Archives of Biochemistry and Biophysics **510**(2): 101-111.
- Pei, D., *et al.* (1994). "Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains." Biochemistry **33**(51): 15483-93.
- Peiser, L., *et al.* (2002). "The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses." Infect Immun **70**(10): 5346-54.
- Peiser, L., S. Mukhopadhyay et S. Gordon (2002). "Scavenger receptors in innate immunity." Curr Opin Immunol **14**(1): 123-8.
- Pfeffer, S. et D. Aivazian (2004). "Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 886-96.
- Pixley, F. J. et E. R. Stanley (2004). "CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action." Trends Cell Biol **14**(11): 628-38.
- Porcaro, I., *et al.* (2002). "Rôle du phagolysosome des macrophages sur la croissance et la filamentation de *Candida albicans*." Journal de mycologie médicale **12**(2): 58-64.
- Ramachandran, I. R., *et al.* (2011). "The Phosphatase Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 is an intrinsic central regulator of dendritic cell function." The Journal of Immunology.
- Rathman, M., M. D. Sjaastad et S. Falkow (1996). "Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages." Infect Immun **64**(7): 2765-73.
- Ravetch, J. V. et S. Bolland (2001). "IgG Fc receptors." Annu Rev Immunol **19**: 275-90.
- Ravetch, J. V. et J. P. Kinet (1991). "Fc receptors." Annu Rev Immunol **9**: 457-92.
- Ren, L., *et al.* (2011). "Substrate specificity of protein tyrosine phosphatases 1B, RPTP α , SHP-1, and SHP-2." Biochemistry: null-null.
- Rink, J., *et al.* (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." Cell **122**(5): 735-49.
- Roy, C. R. (2002). "The Dot/lcm transporter of *Legionella pneumophila*: a bacterial conductor of vesicle trafficking that orchestrates the establishment of a replicative organelle in eukaryotic hosts." Int J Med Microbiol **291**(6-7): 463-7.
- Saito, K., *et al.* (2007). "Association of protein-tyrosine phosphatase MEG2 via its Sec14p homology domain with vesicle-trafficking proteins." J Biol Chem **282**(20): 15170-8.

- Sanchez-Mejorada, G. et C. Rosales (1998). "Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors." J Leukoc Biol **63**(5): 521-33.
- Sanjuan, M. A., *et al.* (2007). "Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis." Nature **450**(7173): 1253-7.
- Saxena, S., *et al.* (2005). "The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA." J Neurosci **25**(47): 10930-40.
- Scianimanico, S., *et al.* (1999). "Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes." Cell Microbiol **1**(1): 19-32.
- Scott, C. C., R. J. Botelho et S. Grinstein (2003). "Phagosome maturation: a few bugs in the system." J Membr Biol **193**(3): 137-52.
- Short, B. et F. A. Barr (2004). "Membrane fusion: caught in a trap." Curr Biol **14**(5): R187-9.
- Shultz, L. D. et M. C. Green (1976). "Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. II. Depressed immune competence and elevated serum immunoglobulins." J Immunol **116**(4): 936-43.
- Silverstein, S. C. (1977). "Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and the penetration of obligate intracellular parasites." Am J Trop Med Hyg **26**(6 Pt 2): 161-9.
- Skinner, M. A., L. A. MacLaren et A. G. Wildeman (1999). "Stage-dependent redistribution of the v-ATPase during bovine implantation." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **47**(10): 1247-1254.
- Sobota, A., *et al.* (2005). "Binding of IgG-opsonized particles to FcγR is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation." The Journal of Immunology **175**(7): 4450-4457.
- Somani, A.-K., *et al.* (1997). "Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase." Journal of Biological Chemistry **272**(34): 21113-21119.
- Stoker, A. W. (2005). "Protein tyrosine phosphatases and signalling." J Endocrinol **185**(1): 19-33.
- Strzelecka-Kiliszek, A., K. Kwiatkowska et A. Sobota (2002). "Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by FcγR." J Immunol **169**(12): 6787-6794.
- Strzelecka, A., K. Kwiatkowska et A. Sobota (1997). "Tyrosine phosphorylation and Fcγ receptor-mediated phagocytosis." FEBS Letters **400**(1): 11-14.
- Stuart, L. M., *et al.* (2007). "A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome." Nature **445**(7123): 95-101.

- Stuart, L. M. et R. A. Ezekowitz (2008). "Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly." Nat Rev Immunol **8**(2): 131-141.
- Sturgill-Koszycki, S., *et al.* (1994). "Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase." Science **263**(5147): 678-81.
- Su, L., *et al.* (1996). "Positive effect of overexpressed protein-tyrosine phosphatase PTP1C on mitogen-activated signaling in 293 cells." J Biol Chem **271**(17): 10385-90.
- Su, M. W., *et al.* (2011). "Targeting Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1) into lipid rafts inhibits CD3-induced T cell activation." J Immunol **166**(6): 3975-82.
- Swanson, J. A. et A. D. Hoppe (2004). "The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis." J Leukoc Biol **76**(6): 1093-103.
- Takai, Y., T. Sasaki et T. Matozaki (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- Takeuchi, O. et S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-20.
- Taylor, P. R., *et al.* (2005). "Macrophage receptors and immune recognition." Annu Rev Immunol **23**: 901-44.
- Timms, J. F., *et al.* (1998). "Identification of Major Binding Proteins and Substrates for the SH2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 in Macrophages." Mol. Cell. Biol. **18**(7): 3838-3850.
- Tonks, N. K. et B. G. Neel (1996). "From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases." Cell **87**(3): 365-368.
- Tridandapani, S. et C. Anderson (2005). Regulation of phagocytosis by FcγRIIb and phosphatases. Molecular mechanisms of phagocytosis. C. Rosales. Mexico, Springer Science. **1**: 11.
- Trost, M., *et al.* (2010). "Subcellular phosphoproteomics." Mass Spectrom Rev **29**(6): 962-90.
- Trost, M., *et al.* (2009). "The phagosomal proteome in interferon-γ-activated macrophages." Immunity **30**(1): 143-154.
- Tsan, M.-F. et Baochong Gao (2007). "Review: Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors." Journal of Endotoxin Research **13**(1): 6-14.
- Tsui, H. W., *et al.* (1993). "Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene." Nat Genet **4**(2): 124-9.

- Ullrich, H. J., W. L. Beatty et D. G. Russell (1999). "Direct delivery of procathepsin D to phagosomes: implications for phagosome biogenesis and parasitism by *Mycobacterium*." Eur J Cell Biol **78**(10): 739-48.
- Underhill, D. M. et A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." Annu Rev Immunol **20**: 825-52.
- Ungar, D. et F. M. Hughson (2003). "SNARE protein structure and function." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 493-517.
- van der Wel, N., et al. (2007). "*M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells." Cell **129**(7): 1287-98.
- Vercauteren, D., et al. (2011). "Flotillin-dependent endocytosis and a phagocytosis-like mechanism for cellular internalization of disulfide-based poly(amido amine)/DNA polyplexes." Biomaterials **32**(11): 3072-3084.
- Vergne, I., et al. (2005). "Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4033-8.
- Verhoven, B., R. A. Schlegel et P. Williamson (1995). "Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes." J Exp Med **182**(5): 1597-601.
- Vieira, O. V., R. J. Botelho et S. Grinstein (2002). "Phagosome maturation: aging gracefully." Biochem J **366**(Pt 3): 689-704.
- Vieira, O. V., et al. (2003). "Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase." Mol Cell Biol **23**(7): 2501-14.
- Vinet, A. F., M. Fukuda et A. Descoteaux (2008). "The exocytosis regulator synaptotagmin V controls phagocytosis in macrophages." J Immunol **181**(8): 5289-95.
- Vinet, A. F., et al. (2009). "The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V." PLoS Pathog **5**(10): e1000628.
- Wang, W., et al. (2011). "Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation." Journal of Cellular Biochemistry **112**(8): 2062-2071.
- Wu, Y., N. Tibrewal et R. B. Birge (2006). "Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill." Trends in Cell Biology **16**(4): 189-197.
- Xiao, W., et al. (2011). "Phospholipase C- β 3 Regulates Fc ϵ RI-Mediated Mast Cell Activation by Recruiting the Protein Phosphatase SHP-1." Immunity **34**(6): 893-904.
- Xie, Z. H., J. Zhang et R. P. Siraganian (2000). "Positive regulation of c-Jun N-terminal kinase and TNF- α production but not histamine release by SHP-1 in RBL-2H3 mast cells." J Immunol **164**(3): 1521-8.

- Xue, J., *et al.* (2007). "Novel functional interaction between Na⁺/H⁺ exchanger 1 and tyrosine phosphatase SHP-2." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **292**(6): R2406-R2416.
- Yang, J., *et al.* (2003). "Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1." Journal of Biological Chemistry **278**(8): 6516-6520.
- Yang, W., *et al.* (1998). "SHP-1 phosphatase C-terminus interacts with novel substrates p32/p30 during erythropoietin and interleukin-3 mitogenic responses." Blood **91**(10): 3746-55.
- Yu, X., N. Lu et Z. Zhou (2008). "Phagocytic receptor CED-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells." PLoS Biol **6**(3): e61.
- Zhang, J., A.-K. Somani et K. A. Siminovitch (2000). "Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling." Seminars in Immunology **12**(4): 361-378.
- Zhang, Z.-Y. (2005). "Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics **1754**(1-2): 100-107.
- Zhang, Z.-Y., B. Zhou et L. Xie (2002). "Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors." Pharmacology & Therapeutics **93**(2-3): 307-317.
- Zhou, M. J. et E. J. Brown (1994). "CR3 (Mac-1, α M β 2, CD11b/CD18) and Fc γ RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc γ RIII and tyrosine phosphorylation." J Cell Biol **125**(6): 1407-16.
- Zhou, D., *et al.* (2010). "Protein tyrosine phosphatase SHP-1 positively regulates TLR-induced IL-12p40 production in macrophages through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase." Journal of Leukocyte Biology **87**(5): 845-855.