

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**  
**INRS-Institut Armand-Frappier**

**Rôle de la tyrosine phosphatase, TC-PTP, dans l'activation  
des lymphocytes et des macrophages**

par

**MARYSE DUPUIS**

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

**Jury d'évaluation**

Président du jury	Claude Daniel
Examineur externe	Paul Naccache
Directeur de recherche	Pascale Duplay

©droits réservés de Maryse Dupuis, 2003.



## RÉSUMÉ

La tyrosine phosphatase, TC-PTP, est une PTP intracellulaire exprimée de façon ubiquiste mais retrouvée en plus grande quantité dans les cellules hématopoïétiques. La TC-PTP est impliquée dans la régulation du système immunitaire. En effet, chez des souris déficientes pour l'expression de la TC-PTP (TC-PTP<sup>-/-</sup>) on retrouve des défauts au niveau du développement et des fonctions de plusieurs populations cellulaires hématopoïétiques. En particulier, des études préliminaires ont permis de démontrer que la prolifération cellulaire des lymphocytes T et B est inhibée quand les splénocytes totaux isolés de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> sont stimulés par la Con A et le LPS respectivement. Afin d'étudier plus en détail le rôle de cette phosphatase dans l'activation des lymphocytes, nous avons établi une collaboration avec le laboratoire du Dr. Michel L Tremblay.

Nous avons montré que le défaut de prolifération des lymphocytes TC-PTP<sup>-/-</sup> n'est pas dû à une propriété intrinsèque des lymphocytes mais plutôt à une population inhibitrice présente dans les splénocytes totaux. En effet, la purification des lymphocytes isolés à partir de la rate de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> permet de rétablir leur prolifération. Par ailleurs, les signaux précoces (augmentation du calcium intracellulaire et phosphorylation sur résidus tyrosine) induits suite à une stimulation avec un anticorps anti-CD3 ne sont pas altérés dans les lymphocytes TC-PTP<sup>-/-</sup>. Nous nous sommes donc intéressés à caractériser la population inhibitrice présente dans la rate de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>. Différentes populations de la rate des souris TC-PTP<sup>-/-</sup> ont été purifiées et testées pour leur capacité à inhiber la prolifération des lymphocytes T isolés à partir de la rate de souris TC-PTP<sup>+/+</sup>. Nous avons caractérisé phénotypiquement et fonctionnellement cette population inhibitrice. Nous avons montré qu'une population cellulaire enrichie en cellules Gr-1<sup>+</sup>

isolées de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> supprime la prolifération de lymphocytes T stimulés par un anticorps anti-CD3. L'inhibition de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) avec le L-*N*-MMA, un inhibiteur d'iNOS, rétablit la prolifération des splénocytes totaux TC-PTP<sup>-/-</sup>. De plus, il y a une corrélation entre le niveau de NO sécrété et le degré de suppression de la prolifération cellulaire. La neutralisation de l'IFN- $\gamma$  avec un anticorps spécifique abolit presque complètement l'activité inhibitrice des cellules Gr-1<sup>+</sup> et la sécrétion de niveaux élevés de NO. Enfin, l'inhibition de la prolifération cellulaire des lymphocytes T nécessite un contact cellule-cellule pour permettre une production suffisante de NO. Nos résultats démontrent aussi que les cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> présentent une sensibilité accrue à l'IFN- $\gamma$  et au LPS comparé aux cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>+/+</sup>. Cette différence dans l'état d'activation des cellules est reflétée par une augmentation de l'expression du marqueur membranaire B7.1. Pris ensemble, nos résultats indiquent que la TC-PTP semble jouer un rôle de régulateur négatif lors de l'activation des cellules Gr-1<sup>+</sup> et lors de la signalisation induite par Jak/Stat.

  
Étudiante

  
Directrice de recherche

# TABLE DES MATIÈRES

**RÉSUMÉ.....II**

**TABLE DES MATIÈRES.....IV**

**LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES ..... VII**

**LISTE DES ABRÉVIATIONS.....IX**

**INTRODUCTION .....1**

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....5**

**1. ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T .....6**

1.1 RÉPONSE IMMUNITAIRE SPÉCIFIQUE.....6

1.2 SIGNALISATION INTRACELLULAIRE.....7

1.2.1 Le complexe du récepteur à antigènes du lymphocyte T.....7

1.2.2 Signalisation intracellulaire suite à l'engagement du TCR.....8

1.2.3 Phosphorylation sur résidus tyrosine .....9

1.2.4 Synapse immunologique ..... 11

**2. LES PHOSPHATASES ..... 12**

2.1 DÉFINITION ET DESCRIPTION ..... 12

2.2 CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES DE LA FAMILLE DES PTPs ..... 13

2.3 CARACTÉRISTIQUES DU SITE ACTIF DES PTPs..... 15

2.4 PTPs CLASSIQUES ..... 17

2.4.1 PTPs transmembranaires impliquées dans la signalisation des lymphocytes T... 17

2.4.1.1 CD45 ..... 18

2.4.1.2	LAR.....	20
2.4.1.3	PTP $\alpha$ .....	20
2.4.2	PTPs intracellulaires impliquées dans la signalisation des lymphocytes T .....	21
2.4.2.1	PTPs qui contiennent un domaine d'interaction de type SH2 (SHPs).....	21
2.4.2.1.1	SHP-1 (HCP, SHPTP-1, PTPN6 ou PTP1C).....	22
2.4.2.1.2	SHP-2 (Syp, PTP1D, SH-PTP2, SH-PTP3 ou PTP2C) .....	25
2.4.2.2	FAP-1 ( PTP-BAS ou hPTP1E).....	26
2.4.2.3	Phosphatase de la famille PEP .....	27
2.4.2.3.1	PEP .....	27
2.4.2.3.2	PTP-PEST (PTP-P19, ou PTPG1) .....	28
2.4.2.4	HePTP (LCPTP) .....	28
2.5	PHOSPHATASES À DOUBLE SPÉCIFICITÉ .....	29
2.5.1	PTEN (MMAC1).....	30
<b>3.</b>	<b>T-CELL PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE (TC-PTP OU MPTP, PTP-S).....</b>	<b>32</b>
3.1	DÉCOUVERTE ET DESCRIPTION .....	32
3.2	RÔLE DE LA TC-PTP .....	34
3.2.1	Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR).....	34
3.2.2	Cycle cellulaire.....	36
3.2.3	Signalisation induite par les cytokines .....	37
3.3	RÔLE DE LA TC-PTP DANS LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	39
3.3.1	Modèle d'étude: Souris déficientes pour la TC-PTP [3] .....	39
3.3.2	Phénotype.....	40
3.3.3	Développement et fonctions des lymphocytes T.....	41
3.3.4	Développement et fonctions des lymphocytes B .....	41
3.3.5	Hématopoïèse .....	43
<b>4.</b>	<b>INHIBITION DE LA PROLIFÉRATION DES LYMPHOCYTES.....</b>	<b>43</b>
4.1	OXYDE NITRIQUE (NO).....	44
4.1.1	Principales caractéristiques du NO.....	44
4.1.2	Régulation d'iNOS .....	45
4.1.2.1	Interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ).....	45
4.3	CYTOKINES INHIBITRICES ET AUTRES MÉDIATEURS.....	47
4.4	CELLULES MYÉLOÏDES SUPPRESSIVES (MSC).....	48
<b><u>ARTICLE.....</u></b>		<b>50</b>
<b>PARTICIPATION DES AUTEURS.....</b>		<b>51</b>
<b>ABSTRACT .....</b>		<b>53</b>

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>54</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>56</b>
<b>RESULTS</b> .....	<b>59</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>63</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	<b>66</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>67</b>
<b>FOOTNOTES</b> .....	<b>71</b>
<b>FIGURES AND FIGURE LEGENDS</b> .....	<b>72</b>
<b><u>RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES</u></b> .....	<b><u>85</u></b>
<b><u>DISCUSSION</u></b> .....	<b><u>89</u></b>
<b><u>LISTE DES RÉFÉRENCES</u></b> .....	<b><u>97</u></b>
<b><u>APPENDICE A</u></b> .....	<b><u>120</u></b>
<b><u>APPENDICE B</u></b> .....	<b><u>122</u></b>

## Liste des tableaux et des figures

<b>Tableau A :</b> Caractérisation de la population lymphocytaire chez des souris TC-PTP <sup>-/-</sup> au jour 21 d'après 3 .....	42
<b>Figure A:</b> Signalisation intracellulaire induite suite à l'engagement du TCR.....	10
<b>Figure B:</b> Représentation schématique de différentes phosphatases .....	14
<b>Figure C:</b> Schéma du mécanisme catalytique des phosphatases.....	16
<b>Figure D:</b> Représentation schématique des deux isoformes de la TC-PTP .....	33
<b>Figure E:</b> Signalisation induite par l'IFN- $\gamma$ .....	47
<b>Figure 1:</b> Purified T and B cells from TC-PTP <sup>-/-</sup> splenocytes proliferate after mitogen stimulation .....	72
<b>Figure 2:</b> CD3-induced tyrosine phosphorylation and calcium response is not affected in T cells from TC-PTP <sup>-/-</sup> mice .....	74
<b>Figure 3:</b> Gr-1 <sup>+</sup> cells purified from splenocytes of TC-PTP <sup>-/-</sup> mice inhibit T cell proliferation .	76
<b>Figure 4:</b> Involvement of IFN- $\gamma$ and NO secretion in Gr-1 <sup>+</sup> immune suppression.....	78
<b>Figure 5:</b> Preactivation of T cells prevents the inhibition of their proliferation by Gr-1 <sup>+</sup> cells from TC-PTP <sup>-/-</sup> mice .....	79
<b>Figure 6:</b> Suppression of T cell proliferation by Gr-1 <sup>+</sup> cells purified from TC-PTP <sup>-/-</sup> splenocytes requires a cell-cell contact .....	80
<b>Figure 7:</b> Gr-1 <sup>+</sup> cells do not accumulate in the spleen of TC-PTP <sup>-/-</sup> mice .....	82

**Figure 8:** Functional and phenotypic characterization of Gr-1<sup>+</sup> cells isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> spleen..... 83

**Figure 9:** Les cellules DX5<sup>+</sup> ne sont pas impliquées dans l'inhibition de la prolifération des cellules par les splénocytes de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>..... 87

**Figure 10:** Les cellules T purifiées de splénocytes TC-PTP<sup>-/-</sup> produisent plus d'IFN-γ que les cellules T purifiées de splénocytes TC-PTP<sup>+/+</sup> ..... 88

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.	:	acide aminé
ADNc	:	ADN complémentaire
ARNm	:	ARN messenger
BMDM	:	Bone Marrow-Derived Macrophage
CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CD	:	Cluster of Differentiation
CDK	:	Cyclin-Dependant Kinase
Con A	:	Concanavaline A
CPA	:	Cellule Présentatrice d'Antigènes
ERK	:	Extracellular-signal Regulated Kinase
GRB2	:	Growth factor Receptor-Bound protein 2
HePTP	:	Hematopoietic Protein Tyrosine Phosphatase
IFN	:	Interféron
Ig	:	Immunoglobuline
IL	:	Interleukine
iNOS	:	inducible Nitric Oxide Synthase
ITAM	:	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
kDa	:	kilodalton
LPS	:	Lipopolysaccharide
MAPK	:	Mitogen Activated Protein Kinase
MKP	:	MAP Kinase Phosphatase
NF- $\kappa$ B	:	Nuclear Factor- $\kappa$ B

NK	:	Natural Killer
NO	:	Oxyde nitrique (ou monoxyde d'azote)
PKB	:	Protein Kinase B
PI 3-K	:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PLC- $\gamma$	:	Phospholipase C gamma
PTK	:	Protéine Tyrosine Kinase
PTP	:	Protéine Tyrosine Phosphatase
SCID	:	Severe Combined Immunodeficiency Disease
Ser	:	Sérine
SFK	:	Src Family Kinase
SH2	:	Src Homology domain 2
SOS	:	Son Of Sevenless
STAT	:	Signal Transducer and Activator of Transcription
TC-PTP	:	T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase
TCR	:	T-Cell Receptor
TGF- $\beta$	:	Transforming Growth Factor-beta
Thr	:	Thréonine
TNF- $\alpha$	:	Tumor Necrosis Factor-alpha
Tyr	:	Tyrosine



## **INTRODUCTION**

La phosphorylation sur résidus tyrosine est un mécanisme de contrôle majeur dans les phénomènes cellulaires tels que la croissance cellulaire, la prolifération, le métabolisme, la différenciation et la motilité. Ce faisant, l'activité des enzymes qui régit le niveau de phosphorylation, les protéines tyrosine kinases (PTKs) et les protéines tyrosine phosphatases (PTPs), se doit d'être régulée de façon précise. La régulation anormale de cette phosphorylation sur résidus tyrosine peut mener à une variété de maladies [1]. Il est donc important de comprendre comment la spécificité et les fonctions des membres des deux familles d'enzymes sont régulées. Jusqu'à récemment, la plupart des études de phosphorylation sur résidus tyrosine ont porté sur les PTKs. La caractérisation des PTPs a avancé à un rythme plus lent. Premièrement, l'étude de l'activité phosphatase des PTPs était plus ardue à cause de la difficulté à identifier leur(s) substrat(s). Deuxièmement, les chercheurs croyaient, à tort, que les PTPs étaient peu nombreuses, présentaient une faible spécificité envers leur(s) substrat(s) et n'avaient qu'un rôle de second ordre lors de la signalisation cellulaire. Il est maintenant clair que les PTPs forment une grande famille regroupant des enzymes apparentées qui sont sujettes à des modes de régulation très précis et qui jouent des rôles importants dans le contrôle d'une vaste gamme de voies de signalisation.

La "T-cell protein tyrosine phosphatase" (TC-PTP) est une phosphatase intracellulaire qui est exprimée de façon ubiquiste (revue dans [2]). Toutefois, la TC-PTP est retrouvée en plus grande quantité dans les cellules hématopoïétiques ce qui peut laisser présager un rôle important pour cette phosphatase dans ces cellules. Des souris déficientes pour l'expression de la TC-PTP présentent des altérations majeures dans les cellules hématopoïétiques [3]. Ces défauts sont principalement manifestés par une splénomégalie, lymphoadénopathie et diminution de la cellularité dans la moëlle osseuse. L'important défaut retrouvé au niveau de la moëlle osseuse et qui est dû à une déficience des cellules stromales, résulte en une incapacité de ces cellules à

soutenir le développement normal des lymphocytes B et des érythrocytes mais ne semble pas affecter le développement des cellules myéloïdes. La présence normale dans la rate et le thymus du nombre de lymphocytes T ainsi que du rapport  $CD4^+/CD8^+$  laisse croire à un développement normal des lymphocytes T.

En plus de son rôle dans l'hématopoïèse, la TC-PTP semble impliquée dans la régulation des fonctions des lymphocytes puisqu'il y a un défaut spécifique dans la prolifération des lymphocytes T et B spléniques de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> suite à une stimulation avec de la Con A et du LPS respectivement [3]. Récemment, la TC-PTP a aussi été impliquée dans la signalisation induite par les cytokines en régulant négativement Jak1 et Jak3 [4]. En accord avec ces résultats, en réponse à l'IFN- $\gamma$ , il y a hyperphosphorylation de Jak1 et une expression élevée d'iNOS dans des BMDMs de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> [4]. La TC-PTP a également été associée comme étant un régulateur positif de la prolifération cellulaire lors de la progression de la phase G1 du cycle cellulaire à travers la voie NF- $\kappa$ B chez des fibroblastes embryonnaires murins [5].

L'absence de prolifération des lymphocytes de la rate de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> peut être due à un défaut des lymphocytes eux-mêmes ou à la présence de cellules capables d'inhiber leur prolifération. Il y a de nombreuses situations où une inhibition de la prolifération lymphocytaire est observée: maladie de la réaction du greffon contre l'hôte ("Graft-versus-host disease"), souris immunisées avec des vaccins viraux, bactéries et parasites, souris traitées avec des superantigènes, et des souris qui présentent des tumeurs [6-12]. Ce phénomène est associé à des cellules myéloïdes suppressives qui expriment le marqueur granulocytaire-monocytaire Gr-1 (Ly-6G). Il a été démontré que ces cellules immunosuppressives sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire des lymphocytes T induite par une stimulation par des anticorps anti-CD3 ou avec différents mitogènes.

Plusieurs médiateurs solubles incluant certaines cytokines, les prostaglandines, les intermédiaires d'oxygène réactif, le peroxyde d'hydrogène et le NO ont été impliqués dans ce mécanisme d'inhibition. Le NO semble jouer un rôle majeur dans ce phénomène d'immunosuppression. Dans les cellules myéloïdes, le NO est produit par l'enzyme inducible NO synthase (iNOS) qui permet la conversion de la L-arginine en L-citrulline (revue dans [13]). L'ARNm codant pour iNOS ainsi que la protéine correspondante sont induits par une variété de stimuli tels que l'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 et le LPS dans les macrophages [13-17]. Le NO est requis pour maintenir les fonctions physiologiques normales alors qu'une production excessive de NO sera responsable de l'apparition de problèmes physiologiques ainsi que certaines pathologies. Il est donc très important que l'expression d'iNOS soit régulée.

L'objectif de mon projet de maîtrise consistait à déterminer si la TC-PTP était impliquée dans la signalisation induite chez les lymphocytes T. Le modèle employé pour permettre de mener à bien cet objectif a été la souris déficiente pour l'expression de la TC-PTP. Toutefois, suite aux résultats préliminaires qui ont montré que les lymphocytes TC-PTP<sup>-/-</sup> sont capables de répondre de façon normale à une stimulation à l'aide d'anticorps anti-CD3, l'emphase de la recherche a été redirigée sur la population inhibitrice qui inhibait la prolifération cellulaire des lymphocytes. Les différentes expériences effectuées avec ces souris ont permis l'identification d'une population Gr-1<sup>+</sup> purifiée de la rate qui inhibe la prolifération des lymphocytes suite à une forte production de NO après une stimulation par le LPS et/ou l'IFN- $\gamma$ . Ainsi, la TC-PTP pourrait être impliquée dans la régulation négative de l'activation des cellules Gr-1<sup>+</sup>.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. Activation des lymphocytes T**

### **1.1 Réponse immunitaire spécifique**

Les lymphocytes T de l'organisme sont généralement au repos et requièrent une stimulation antigénique pour progresser à travers le cycle cellulaire. Pour être complètement activés, et ainsi permettre entre autres leur prolifération et la sécrétion de cytokines, les lymphocytes T naïfs doivent entrer en contact avec des cellules accessoires, aussi connues comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). Les macrophages activés et les cellules dendritiques sont les cellules les plus importantes de cette catégorie [18]. En plus de fournir le premier stimulus pour l'activation des lymphocytes T, c'est-à-dire un peptide antigénique présenté par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les CPAs professionnelles peuvent apporter un microenvironnement favorable de stimuli tels que l'apport de cytokines, chimiokines et molécules de costimulations [19]. La génération d'une réponse immune spécifique effective nécessite l'activation, et subséquemment l'expansion rapide de lymphocytes spécifiques à un antigène. Ainsi, les lymphocytes T vont proliférer rapidement suite à l'exposition à un immunogène, et après un pic de réactivité qui survient entre 4 à 8 jours après la première rencontre antigénique, leur activité diminue pour donner lieu à la réponse mémoire. Les raisons qui expliquent cette rapide disparition de l'activité des lymphocytes T ne sont pas complètement connues mais certaines études suggèrent l'importance du phénomène de l'apoptose passive (manque de facteurs de croissance tel que l'IL-2) ou active [20]. Les réponses spécifiques produites par les lymphocytes T suite à la rencontre de l'antigène nécessitent donc

que les récepteurs sur ces cellules reconnaissent le peptide antigénique et permettent l'initiation d'une série d'événements de signalisation intracellulaire qui permettront d'activer la cellule.

## 1.2 Signalisation intracellulaire

### 1.2.1 Le complexe du récepteur à antigènes du lymphocyte T

Le récepteur de la cellule T (TCR) comprend généralement les sous-unités  $\alpha/\beta$  alors qu'un autre type de TCR retrouvé sur une petite proportion de lymphocytes T est composé des sous-unités  $\gamma/\delta$ . Le TCR permet la reconnaissance d'un peptide lié au CMH mais la traduction des signaux est permise grâce à cinq autres protéines transmembranaires qui sont associées de façon non-covalente avec l'hétérodimère  $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$ . Trois de ces protéines sont des molécules du CD3 et sont nommées; chaînes  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$ . Deux hétérodimères sont présents à la surface du lymphocyte T soit  $\epsilon\gamma$  et  $\epsilon\delta$ . Un homodimère de chaînes  $\zeta$  ou un hétérodimère de chaînes  $\zeta$  et  $\eta$  reliées par un pont disulfure fait également partie du complexe du TCR chez la souris. En plus du TCR, des molécules accessoires contribuent à l'activation cellulaire : premièrement en fonctionnant comme co-récepteurs (i.e. CD4 et CD8); deuxièmement en augmentant l'avidité de l'interaction avec l'antigène ou la CPA (exemple : LFA-1); ou, troisièmement en induisant des signaux de signalisation indépendants qui vont influencer la réponse cellulaire (exemple : CD2 et CD28). Les co-récepteurs comme CD4 et CD8 contribuent directement à la formation du complexe entre le TCR et la CPA qui contient un peptide, ce qui permet d'augmenter l'intensité de l'interaction. De plus, ces co-récepteurs contribuent également à l'initiation de signaux. Ces signaux, qui permettent l'intégration des changements qui surviennent dans l'environnement

externe de la cellule et de sa réponse face à ces changements, se font entre autres par l'intermédiaire de la phosphorylation sur résidus tyrosine. Bien que la phosphorylation sur résidus tyrosine soit importante dans l'initiation des réponses cellulaires produites par le TCR, aucune activité protéine tyrosine kinase n'est attribuée au TCR ou aux molécules accessoires. En effet, le TCR active plutôt des PTKs cytoplasmiques, comme Lck, qui sont requises pour initier la signalisation suite à l'engagement du récepteur à antigènes pour induire la phosphorylation de cibles en aval (revue dans [21]).

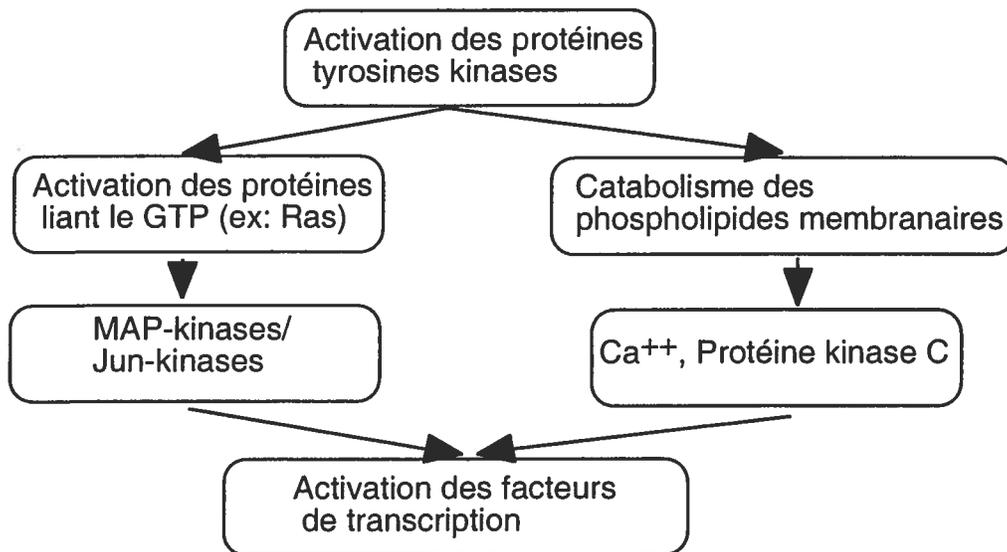
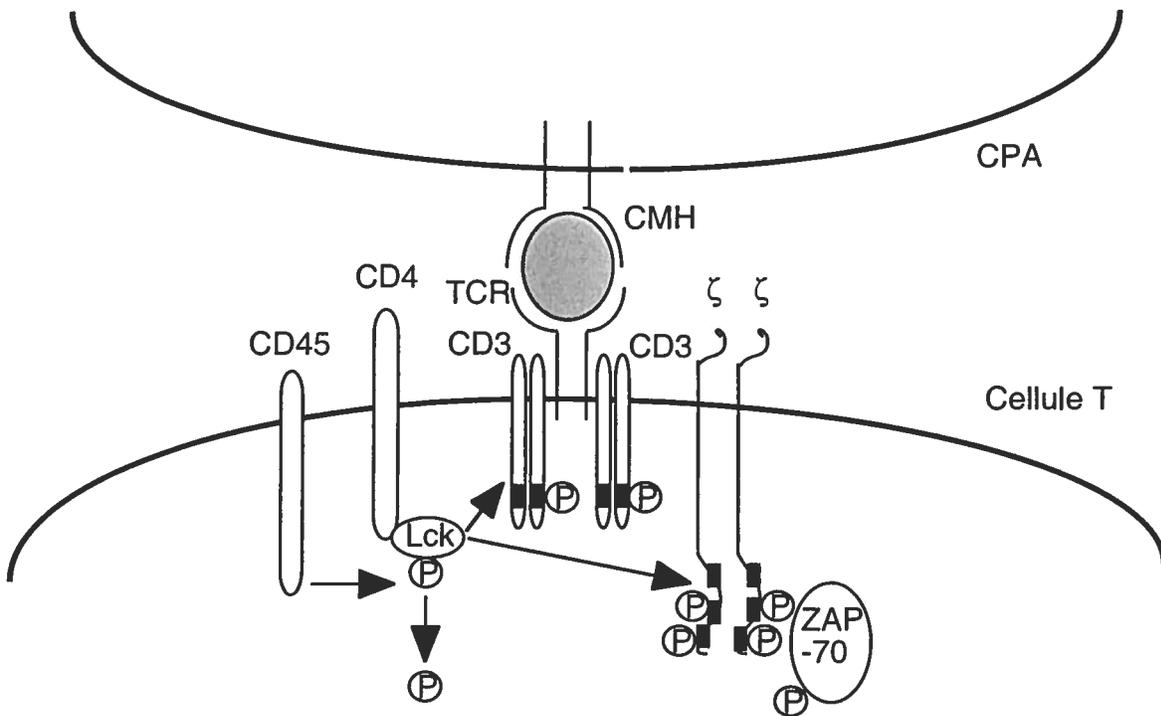
### **1.2.2 Signalisation intracellulaire suite à l'engagement du TCR**

La liaison du TCR par un antigène peptidique présenté dans le contexte d'une molécule du CMH déclenche une cascade de signalisation qui va mener à l'activation de la cellule T [21]. L'événement qui permet de déclencher la cascade de signalisation est l'activation de la protéine tyrosine kinase de la famille Src (SFKs), Lck, qui peut être associée dans la cellule avec les molécules de co-stimulation CD4 et CD8 [22]. Un fait important à noter et qui sera discuté plus en détail dans une autre section, est que Lck devient active seulement lorsque la protéine tyrosine phosphatase CD45 déphosphoryle son site de régulation négative. Lck, une fois activée, va phosphoryler les "immunoreceptor tyrosine-based activation motifs" (ITAMs) présents dans la partie intra-cytoplasmique des chaînes  $\zeta$  et les sous-unités du CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$ , et  $\gamma$  du TCR. Un ITAM est composé d'environ 26 acides aminés, pour la plupart non-conservés, parmi lesquels la séquence tyrosine-X-X-leucine est présente 2 fois et est séparée par 6 à 8 résidus, où X représente un acide aminé non-spécifique. Les ITAMs, une fois phosphorylés, vont permettre l'association à ces résidus tyrosine phosphorylés de ZAP-70, une PTK exprimée exclusivement dans les cellules T et NK [23], via son tandem de domaines d'homologie à Src-2 (SH2). Les SH2

sont reconnus pour s'associer à des résidus tyrosine phosphorylés [24]. Une fois associée aux ITAMs, ZAP-70 sera activée et il y aura autophosphorylation ce qui permettra l'association de Lck à ZAP-70 via ses propres domaines SH2. Lck permettra d'augmenter l'activité catalytique de ZAP-70 en phosphorylant sa boucle d'activation [25, 26]. Ce processus permettra la phosphorylation des substrats de ZAP-70 dont SLP-76 et LAT [27, 28] et pourra induire et/ou amplifier l'activation d'autres PTKs, comme celles de la famille Src ou Tec qui interviennent après ZAP-70 dans la cascade de signalisation cellulaire [29]. L'augmentation de l'activité PTK résultante mènera à la phosphorylation de protéines adaptatrices et d'enzymes, ce qui facilitera la stimulation des voies de signalisation en aval. Ces évènements incluent la voie du phosphatidylinositol, l'activation de Ras et l'activation de plusieurs sérine/thréonine kinases et phosphatases et se terminera par l'activation du lymphocyte T avec la transcription de nouveaux gènes, la réorganisation du cytosquelette, la production de cytokines et/ou la prolifération (voir figure A).

### **1.2.3 Phosphorylation sur résidus tyrosine**

La phosphorylation sur résidus tyrosine joue donc un rôle central et critique dans la traduction de l'information environnementale en réponse cellulaire. Les évènements décrits précédemment sont initiés très rapidement suite à la rencontre du lymphocyte T avec l'antigène. En effet, l'augmentation de la phosphorylation sur résidus tyrosine est détectable en quelques secondes suite à l'engagement du TCR [30]. De plus, les inhibiteurs des PTKs empêchent l'activation de la cellule T, alors que les inhibiteurs des PTPs peuvent activer les cellules T au repos même en l'absence d'autres stimuli [30, 31]. Ainsi, le maintien des cellules T dans un état de repos est un processus actif qui nécessite un équilibre dynamique entre les PTKs et les PTPs. L'activation de



**Figure A: Signalisation intracellulaire induite suite à l'engagement du TCR**

la cellule T représente donc un changement dans cet équilibre. La régulation dynamique de la phosphorylation des protéines tyrosine est cruciale pour plusieurs processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la différenciation, la migration et la mort. Dans le système immunitaire, la régulation précise et coordonnée de cet équilibre est nécessaire pour une réponse rapide contre les antigènes étrangers alors qu'un débalancement entre les PTKs et les PTPs peut avoir des conséquences pathologiques comme l'auto-immunité et l'immunodéficience [1].

#### **1.2.4 Synapse immunologique**

La ségrégation active des composants de la cascade de signalisation, particulièrement les PTKs et les PTPs, est un mécanisme puissant pour la régulation réciproque de la phosphorylation sur résidus tyrosine. Des études récentes suggèrent que la localisation sub-cellulaire des PTKs et des PTPs et de leurs substrats change avec l'état du développement et d'activation des lymphocytes T [32]. Ce changement observé dans la membrane cellulaire est causé par l'apparition de sous-domaines membranaires enrichis en glycosphingolipides, cholestérol et autres lipides spécialisés et ont été identifiés et nommés "glycosphingolipids-enriched micro domains" (GEMs), "detergent-insoluble glycolipid-rich membranes" (DIGs) ou "lipid rafts". De nombreuses études indiquent que certaines protéines comme LAT, Ras et Lck, sont associées à ces micro-domaines alors que CD45 et ZAP-70 en sont exclues dans des cellules T au repos [32]. L'activation des cellules T permet le recrutement aux micro-domaines de composants additionnels de signalisation comme le TCR et les membres de la famille Syk/ZAP-70. La phosphatase CD45, quant à elle, reste toujours exclue des micro-domaines. L'agrégation des micro-domaines peut s'effectuer à l'interface de la cellule T et de la cellule présentatrice

d'antigènes lorsqu'une synapse immunologique, i.e une surface de contact organisée, se crée. Ainsi, une localisation sub-cellulaire régulée mènera à des altérations locales au niveau de la concentration en enzymes et en substrats, ce qui pourra amplifier la réponse aux signaux externes et modifier le seuil d'activation requis pour l'activation des cellules T.

## **2. Les phosphatases**

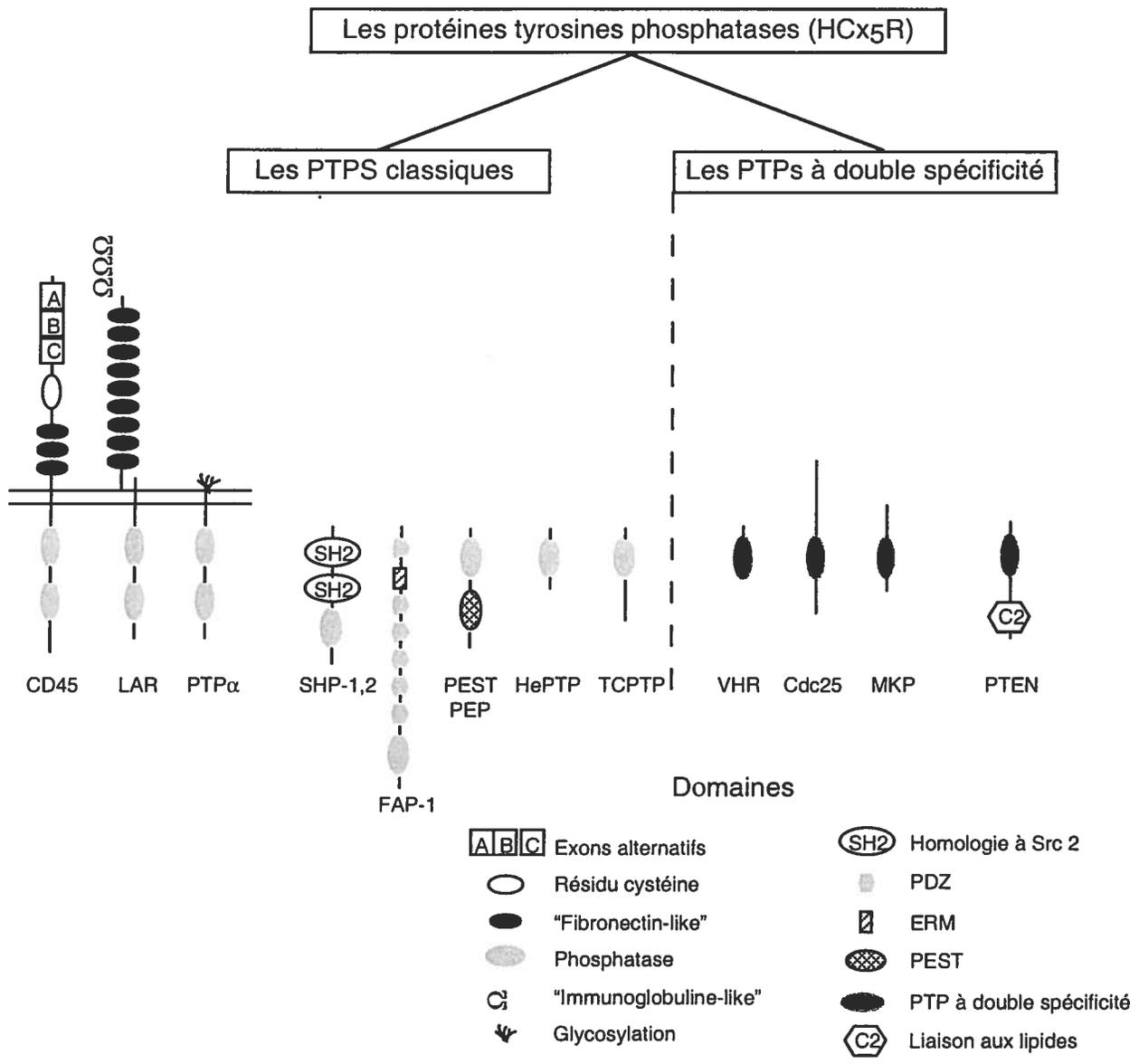
### **2.1 Définition et description**

La grande famille des PTPs comprend des enzymes qui sont parentes et qui sont sujettes à des modes sophistiqués de régulation. Elles jouent des rôles critiques dans un grand nombre de voies de signalisation ce qui leur permet d'augmenter ou de diminuer la réponse des lymphocytes. Les PTPs sont très spécifiques, non-seulement pour des protéines phosphorylées particulières mais également pour des substrats non-protéiques (exemple : phospholipides). De plus, elles sont spécifiques pour des sites de phosphorylation particuliers. Trois rôles importants peuvent être attribués aux PTPs : garder une protéine cible non-phosphorylée afin de ne pas envoyer de signal, recycler une protéine cible phosphorylée après l'initiation du signal et finalement, activer une protéine cible qui devient active lorsqu'elle est déphosphorylée. Ainsi, les PTPs peuvent réguler positivement ou négativement les PTKs en déphosphorylant leurs sites spécifiques de régulation de phosphorylation sur résidus tyrosine [33]. De plus, quelques PTPs sont aussi phosphorylées par des PTKs ce qui permet de conclure que les interactions PTKs et PTPs peuvent être complexes [34]. Dans cette partie qui traite des phosphatases, une emphase

sera portée sur les PTPs qui ont un rôle à jouer dans la signalisation induite chez les lymphocytes T.

## 2.2 Caractéristiques structurales de la famille des PTPs

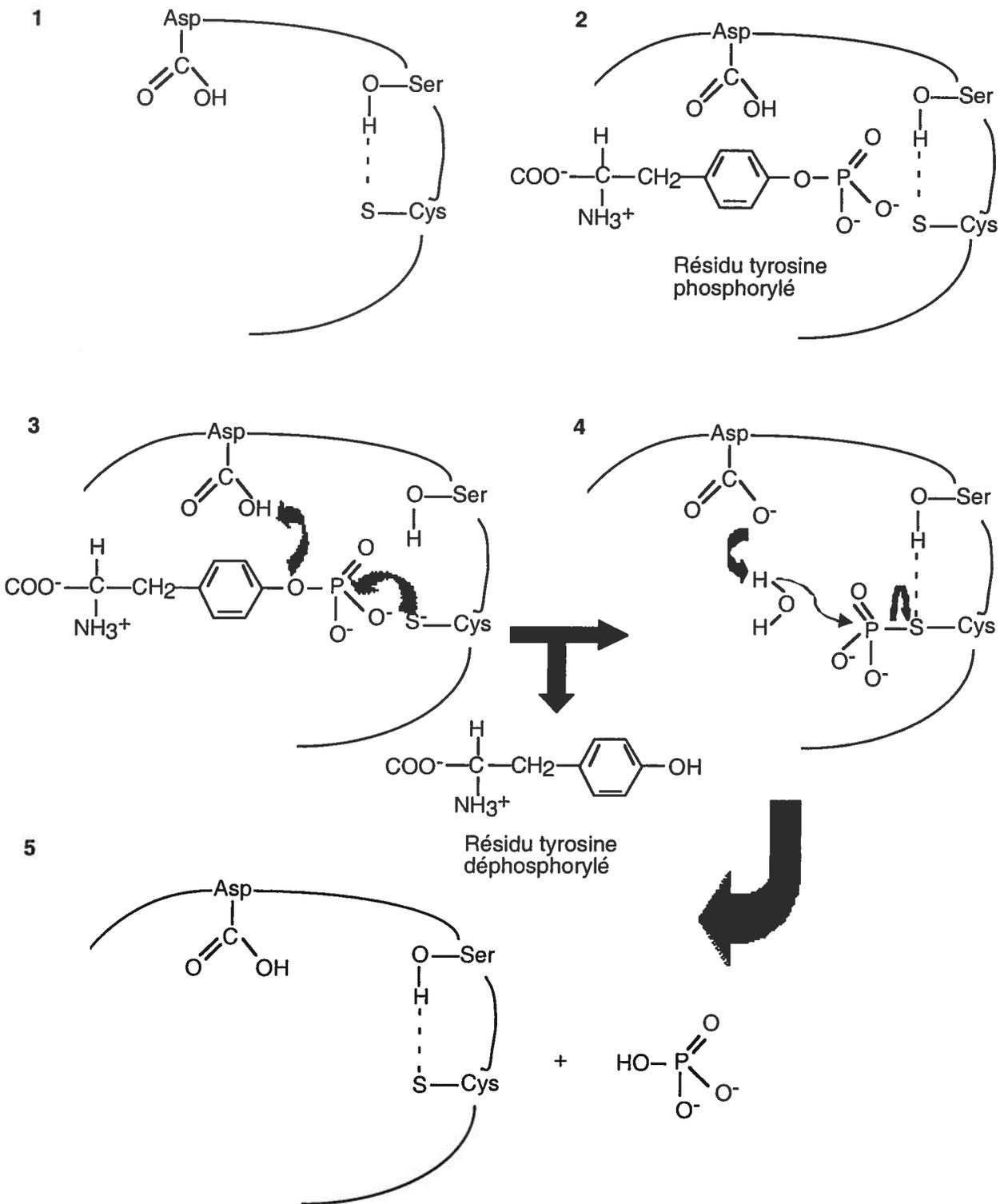
Les membres de la superfamille des PTPs sont caractérisés par la présence d'un motif signature, H-C-X-X-G-X-X-R; et ils peuvent être classifiés soit comme étant une PTP classique ou une PTP avec une double spécificité (i.e. pouvant déphosphoryler des résidus phosphotyrosine (pTyr) et des résidus phosphosérine (pSer)/phosphothréonine (pThr). Toutefois, une phosphatase particulière, PTEN, possède le motif signature des PTPs mais déphosphoryle des phospholipides inositol [35]. Des exemples de PTPs appartenant à ces 2 familles sont illustrés dans la figure B. Les PTPs classiques (exemple : PTP1B et CD45) contiennent un ou deux domaines PTP et des séquences conservées de 240-250 acides aminés qui entourent le motif signature. La structure du site actif des PTPs classiques, en particulier la profondeur de ce site, lui confère une spécificité pour les résidus pTyr et non pour les résidus pSer et pThr. Ces enzymes classiques peuvent être par la suite divisées selon leur localisation; transmembranaire ("receptor-like") et cytoplasmique. Sur la base des séquences qui entourent leur(s) domaine(s) PTPs, les PTPs peuvent être encore subdivisées. Ces domaines adjacents au domaine catalytique régulent l'activité des PTPs, soit directement ou indirectement, en fournissant des sites d'interaction pour d'autres protéines régulatrices ou protéines cibles.



**Figure B: Représentation schématique de différentes phosphatases**

### 2.3 Caractéristiques du site actif des PTPs

Tous les membres de la superfamille des PTPs utilisent le même mécanisme catalytique, dans lequel un résidu cysteinyl dans le motif signature exécute une attaque nucléophile sur le groupe phosphate du substrat. De plus, un résidu invariant d'acide aspartique (Asp) joue deux rôles critiques dans la catalyse. Premièrement, il agit comme un acide général, en protonnant le groupe phénolate qui reste sur le substrat. Deuxièmement, il sert comme une base générale, en activant une molécule d'eau à promouvoir l'hydrolyse de l'intermédiaire cysteinyl-phosphate. Dans les PTPs classiques, un résidu tyrosyl forme un côté de la dépression, déterminant la profondeur de la poche et contribuant ainsi à la spécificité absolue des PTPs classiques pour les protéines phosphorylées sur résidus tyrosine. Seulement la chaîne latérale d'un résidu pTyr d'un substrat cible est suffisamment longue pour être accessible au résidu cysteinyl nucléophile quand celui-ci est inséré dans le site catalytique; les chaînes latérales des résidus pSer et pThr étant trop courtes pour être déphosphorylées. Une autre caractéristique importante est le changement dramatique de conformation qui se produit suite à la liaison du substrat. En absence de substrat, le site actif adopte une conformation "ouverte" dans laquelle l'acide aspartique est dirigée en direction inverse du site actif, ce qui l'empêche de servir de donneur de protons. Suite à la liaison du substrat, le site actif se ferme autour de la chaîne latérale du résidu pTyr. Dans cette conformation "fermée", la boucle qui contient le résidu d'acide général a bougé de sorte que le résidu Asp est repositionné pour ses fonctions catalytiques. Ceci permet également de juxtaposer le résidu Asp à côté du groupe phosphate chargé négativement, ce qui limite la stabilité du complexe enzyme-substrat (revue dans [36]) (voir figure C).



**Figure C: Schéma du mécanisme catalytique des phosphatases**

C'est en se basant sur les caractéristiques structurales du site actif des PTPs discutées précédemment que le développement de mutants dominants négatifs qui séquestrent leur(s) substrat(s) a été réalisé. Cette mutation rend l'enzyme catalytiquement inactive alors que l'affinité pour son substrat reste inchangée [37, 38]. Les mutants dans lesquels le résidu d'acide aspartique est changé pour une alanine (mutants Asp→Ala) présentent ces propriétés. Ainsi les mutants peuvent former des complexes stables avec des substrats qui sont phosphorylés sur résidus tyrosine [37]. De tels complexes peuvent être purifiés et le substrat correspondant identifié. Cette méthode a permis l'identification de différentes protéines cibles possibles pour plusieurs PTPs.

## 2.4 PTPs Classiques

### 2.4.1 PTPs transmembranaires impliquées dans la signalisation des lymphocytes T

Les PTPs transmembranaires ou "receptor-like", comme leur nom l'indique, étaient perçues comme des récepteurs dont la spécificité biologique découlait en grande partie de leur(s) ligand(s). Cependant, les ligands pour la plupart de ces PTPs transmembranaires ne sont pas clairement définis. De plus, les conséquences de la liaison des ligands à ces PTPs pour lesquels les ligands existent, restent encore indéfinies. Plusieurs PTPs transmembranaires jouent le rôle de molécules d'adhésion cellulaire et sont impliquées dans la régulation du contact cellulaire. CD45 est la PTP transmembranaire dont les rôles ont été les mieux définis. Très peu d'informations sont disponibles sur le rôle que jouent les autres PTPs transmembranaires chez le lymphocyte.

#### 2.4.1.1 CD45

CD45 est une phosphatase transmembranaire qui se retrouve sur toutes les cellules hématopoïétiques nucléées. L'épissage alternatif des différents exons codant pour des séquences du domaine NH<sub>2</sub>-terminal du gène de CD45 donne lieu à l'existence de différentes isoformes de CD45 (180-235 kD) qui sont exprimées selon le type de cellules et leur état d'activation (revue dans [39]). CD45 possède deux domaines intracellulaires, le domaine proximal (D1) contient l'activité phosphatase alors que le domaine distal, D2, ne semble pas avoir une activité catalytique significative (voir figure B). Cependant, le domaine D2 est requis pour une conformation adéquate de la protéine et/ou le recrutement des substrats. Jusqu'à présent aucun ligand spécifique à CD45 n'a été trouvé et aucune information n'est connue sur l'implication du domaine extracellulaire dans la régulation des fonctions de CD45.

Il est maintenant bien connu que CD45 est un régulateur clé dans la signalisation induite par les récepteurs à antigènes des cellules B et T. En effet, des lignées cellulaires de lymphocytes T et B déficients pour CD45 [40, 41] sont incapables de répondre suite à une stimulation via leurs récepteurs à antigènes. Des patients ayant une déficience au niveau de la protéine CD45 présentent une immunodéficiência sévère (SCID) [42]. Des souris déficientes pour CD45, quant à elles, ont un défaut important au niveau du développement et des fonctions des lymphocytes T et B [43, 44]. Les protéines clairement définies comme étant les cibles de CD45 dans la cascade de signalisation induite suite à l'activation du TCR font partie de la famille SFK. En plus des SFKs, il a été suggéré que CD45 peut déphosphoryler ZAP-70 [45] et la chaîne  $\zeta$  du CD3 [46], mais ces dernières données sont controversées. Les SFKs sont régulées par une phosphorylation sur résidus tyrosine sur deux sites : un site C-terminal inhibiteur et un site d'auto-phosphorylation

activateur. Le résidu tyrosine phosphorylé de la partie C-terminale des SFKs est intimement associé avec son propre domaine SH2 [47]. Cette interaction intra-moléculaire impose une conformation à la protéine qui rend le site catalytique de la tyrosine kinase inactif. La déphosphorylation de ce résidu pTyr par CD45 augmente l'activité kinase de la SFK. Ainsi, puisque CD45 peut déphosphoryler le site de régulation négative des SFKs comme Lck et la rendre active, CD45 a donc un rôle positif dans cette voie de signalisation [48, 49]. Le site de régulation négative de Lck est phosphorylé par la kinase Csk [50]. Les actions contraires qu'exercent Csk et CD45 sont des bons exemples de l'importance de la balance des PTKs et PTPs dans les cellules. Bien que CD45 puisse agir comme un régulateur positif, elle peut également avoir un rôle négatif en modulant à la baisse l'activité de Lck en déphosphorylant le résidu tyrosine dans le domaine kinase. [51]. CD45 peut également déphosphoryler le résidu tyrosine situé à l'intérieur du domaine kinase d'autres SFKs telles que Hck et Lyn ce qui lui permet de réguler négativement la voie de signalisation d'adhésion des macrophages induite par les intégrines. CD45 peut donc opérer comme un régulateur positif ou négatif des SFKs selon le type cellulaire et le contexte de la réponse cellulaire.

Des données récentes démontrent que CD45 peut agir sur d'autres substrats et est impliquée dans la signalisation des récepteurs de cytokines [52]. Les protéines Jaks s'associent avec la partie intracytoplasmique des récepteurs de cytokines et sont activées suite à leur auto- ou trans-phosphorylation en réponse à la liaison des cytokines à leur récepteur [53]. CD45 est une Jak phosphatase qui régule négativement l'activation des récepteurs induite par des cytokines et des interférons. Il a été démontré que CD45 peut directement déphosphoryler et inactiver *in vitro* les 4 membres de la famille Jak; Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2 [52]. Conséquemment, la déphosphorylation des Jaks par CD45 se répercute sur la phosphorylation des Stats qui sont des facteurs de transcription activés par les Jaks. Ces derniers ne pourront pas

former des dimères puisque leur formation nécessite la phosphorylation des Stats sur résidus tyrosine, ce qui empêchera leur translocation au noyau et de ce fait, ne pourront pas permettre la transcription de certains gènes cibles.

#### 2.4.1.2 LAR

LAR est une protéine qui est principalement impliquée dans les adhésions focales [54] et la migration des cellules grâce à son association avec LIP.1 "LAR-interacting protein" et à la protéine multi-domaine Trio respectivement (voir figure B). Trio est une large protéine qui est composée entre autres des domaines ayant une activité facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) spécifique pour la protéine Rac GTPase et pour la protéine Rho GTPase. Les petites protéines G, Rho et Rac, sont généralement impliquées dans la réorganisation du cytosquelette. L'implication de LAR au niveau de la signalisation des lymphocytes est moins bien connue. Une étude récente propose que LAR pourrait être un candidat potentiel pour être une Jak phosphatase, ce qui pourrait lui attribuer un rôle dans la signalisation induite par les cytokines [52]. Une étude portant sur des souris déficientes pour la protéine LAR démontre que cette dernière ne semble pas essentielle pour le développement des cellules de l'organisme car ces souris déficientes semblent normales [55].

#### 2.4.1.3 PTP $\alpha$

PTP $\alpha$  possède un petit domaine extracellulaire de 123 acides aminés connectés à 2 domaines cytoplasmiques PTP dont seulement D1 est significativement actif *in vitro* et *in vivo* (voir figure B). PTP $\alpha$  est phosphorylé sur résidus tyrosine *in vivo* et lie la protéine adaptatrice Grb2, ce faisant, PTP $\alpha$  pourrait réguler la signalisation induite par Grb2 [56, 57]. Grb2 est une

protéine adaptatrice connue pour son habileté à lier Sos, une protéine GEF spécifique pour Ras. Cependant, Grb2, une fois liée à PTP $\alpha$  ne peut plus lier Sos. L'implication de la liaison Grb2 à PTP $\alpha$ , n'est pas précisément définie. Ce qui a été suggéré récemment par une nouvelle étude c'est que cette association pourrait permettre de faciliter la liaison de PTP $\alpha$  à Src et ainsi permettre la déphosphorylation du site de régulation négative de Src [58]. En effet, PTP $\alpha$  a été démontré comme pouvant déphosphoryler le site de régulation négative des SFKs dans des études de surexpression [59] et chez des souris déficientes pour la PTP $\alpha$  [60, 61].

## **2.4.2 PTPs intracellulaires impliquées dans la signalisation des lymphocytes T**

Une attention particulière a été portée sur les phosphatases dont l'implication au niveau des lymphocytes T a déjà été démontrée. Pour une liste exhaustive des PTPs intracellulaires connues jusqu'à maintenant, vous pouvez consulter Mustelin et collaborateurs [62].

### **2.4.2.1 PTPs qui contiennent un domaine d'interaction de type SH2 (SHPs)**

Deux SHPs avec des rôles biologiques distincts sont retrouvées chez les mammifères [63, 64]. SHP-1 est exprimé de façon prédominante dans les cellules hématopoïétiques alors que SHP-2 est exprimée de façon ubiquitaire [64, 65]. Ces deux SHPs sont très semblables avec une homologie de séquence d'environ 60% et partagent la même organisation structurale (voir figure B). Les SHPs ont la particularité de posséder deux domaines SH2. Un domaine SH2 est constitué d'environ 100 acides aminés et démontre une très grande affinité pour des séquences cibles qui contiennent des résidus tyrosine phosphorylés [66]. Dans la plupart des cas, les SHPs sont recrutées par leurs domaines SH2, à des récepteurs ou à d'autres protéines. Les domaines SH2 sont retrouvés dans diverses protéines de signalisation et dirigent l'association de ces protéines

de signalisation vers des protéines phosphorylées sur résidus tyrosine comme des récepteurs de facteurs de croissance activés par leur ligand [67]. De plus, le domaine SH2 N-terminal des SHPs peut aussi réguler l'activité catalytique directement. En absence d'un ligand approprié, le domaine SH2 N-terminal se lie au domaine phosphatase et le rend inaccessible pour ses substrats. Suite à l'engagement du domaine SH2 N-terminal avec des protéines phosphorylées sur résidus tyrosine, le domaine PTP est de nouveau libre et redevient accessible pour ses substrats. Dans la plupart des systèmes, SHP-1 semble être un régulateur négatif de la signalisation des PTKs alors que SHP-2 semble jouer un rôle positif.

#### 2.4.2.1.1 SHP-1 (*HCP*, *SHPTP-1*, *PTPN6* ou *PTP1C*)

SHP-1 est un régulateur négatif de plusieurs voies de signalisation hématopoïétiques, incluant celles des cytokines, facteurs de croissance, récepteurs d'adhésion et d'antigènes. SHP-1 peut être phosphorylée suite à une activation par différents stimuli comme la stimulation via CD4 et CD8, suggérant ainsi que l'activité phosphatase de SHP-1 et/ou son association avec d'autres protéines peuvent être régulées par la phosphorylation sur résidus tyrosine [68].

La compréhension des rôles biologiques de SHP-1 a grandement avancé lorsque le défaut génétique des souris "motheaten" (*me/me*) et "motheaten viable" (*me<sup>v</sup>/me<sup>v</sup>*) a été caractérisé [69, 70]. Les deux types de souris ont des mutations ponctuelles dans le gène codant pour SHP-1 ce qui résulte en un épissage alternatif anormal de l'ARNm. Dans les souris "motheaten", il n'y a pas de protéine SHP-1 alors que dans les souris "motheaten viable" la protéine SHP-1 est présente mais ne possède que 10% de l'activité catalytique normale [70]. Ces deux types de souris vont développer une maladie inflammatoire progressive, caractérisée par une infiltration de neutrophiles et de macrophages dans leurs poumons, leur peau et d'autres tissus. Les souris

"motheaten" et "motheaten viable" meurent d'une pneumonie vers l'âge de 3 semaines et 9 semaines respectivement [63, 71]. En accord avec la présence d'inflammation progressive, les souris "motheaten" et "motheaten viable" présentent simultanément des problèmes d'auto-immunité et des déficiences immunitaires [72]. Il y a une augmentation du niveau d'immunoglobulines totales et d'auto-anticorps circulants [71], comme des anticorps contre l'ADN. On observe aussi chez ces souris une lymphopénie avec une faible réponse proliférative des lymphocytes T et B restants suite à une stimulation avec des mitogènes [73]. Le développement de la plupart des sous-populations de cellules T est presque normal chez ces souris [74] alors qu'une involution du thymus survient à un âge inhabituellement jeune [72].

L'activité de SHP-1 peut moduler la signalisation induite par le TCR [75]. Par exemple, il a été démontré que la prolifération cellulaire ainsi que la production d'IL-2 sont augmentées de façon significative suite à l'engagement du TCR dans les cellules T *me/me* et *me<sup>v</sup>/me<sup>v</sup>* lorsque comparées aux cellules T sauvages [76]. Les effets de SHP-1 sur les fonctions du TCR semblent se réaliser à partir de diverses interactions moléculaires.

SHP-1 s'associe au TCR au repos et activé, et semble déphosphoryler les composants du complexe TCR tel que CD3 $\epsilon$  suite à l'engagement du TCR [74]. Cependant, la manière dont SHP-1 lie et/ou module les co-récepteurs du TCR reste encore à déterminer. Par exemple, SHP-1 ne semble pas impliqué dans la modulation de CTLA-4 ou de CD28 [75] mais cette phosphatase semble s'associer de façon constitutive avec le récepteur CD5 [74, 77], récepteur que l'on retrouve sur toutes les cellules T et une certaine portion des cellules B. L'analyse des propriétés phénotypiques et biologiques des cellules T de souris déficientes pour CD5 a permis d'identifier CD5 comme étant un inhibiteur de la signalisation à partir du TCR [78]. Étant donné qu'il a été démontré que CD5 régule négativement la phosphorylation sur résidus tyrosine et que son

association avec SHP-1 est augmentée suite à la stimulation du TCR [74, 77], il apparaît donc que SHP-1 joue un rôle dans l'activité inhibitrice de CD5 sur le TCR.

L'effet de SHP-1 sur les fonctions des PTKs a aussi été examiné dans les cellules T. SHP-1 a été démontré comme pouvant réguler à la baisse l'activation induite par le TCR des PTKs de la famille Src, telles que Lck et Fyn [76], s'associer et déphosphoryler ZAP-70 [79]. Plus récemment, il a été démontré que SHP-1 peut s'associer à PI-3K, et cette association est augmentée suite à l'engagement du TCR [80]. Les données disponibles indiquent que SHP-1 peut déphosphoryler PI-3K et inhiber son activité; PI-3K est donc un substrat direct de SHP-1. Étant donné que PI-3K est impliquée au niveau de la prolifération, l'apoptose et la réorganisation du cytosquelette [81], la capacité de SHP-1 à réguler PI-3K l'implique dans la régulation d'une vaste gamme d'activités de la cellule T.

La participation de SHP-1 dans la régulation de la signalisation du TCR implique également son interaction avec d'autres molécules comme Vav, Grb2 [74, 82] et SLP-76 [83]. Vav, agit comme un facteur d'échange de nucléotide guanidine pour les GTPases de la famille Rho [84]. Même si Vav s'associe, grâce à son domaine SH2, à des résidus tyrosine phosphorylés contenus dans SHP-1 suite à la stimulation du TCR [82], Vav ne semble pas être directement déphosphorylé par SHP-1 [74]. Les données suggèrent plutôt que Vav localise SHP-1 proche de ses substrats, ce qui permet ainsi la déphosphorylation d'autres composants qui se retrouvent dans la voie de signalisation de la cellule T. Cette hypothèse est en accord avec de récentes données qui identifient SLP-76, une protéine adaptatrice qui se lie à Vav, comme étant un substrat de SHP-1 [83, 85]. Bien que le rôle de SLP-76 dans l'activation de la cellule T ne soit pas encore bien défini, son association à un autre adaptateur, LAT, semble coupler ZAP-70/Syk activé à des événements de signalisation en aval comme la mobilisation de calcium

intracellulaire ainsi que l'activation de la voie Ras/MAPK [86-88]. Ces découvertes suggèrent que l'augmentation de l'activation de la voie Ras/MAPK dans des cellules déficientes pour SHP-1 [74], reflète l'implication de SHP-1 dans la modulation de SLP-76/LAT. D'autre part, les effets attribués à SHP-1 sur l'activation de Ras induite par le TCR peut refléter sa capacité à se lier à Grb2 [83] qui, comme mentionné précédemment, est une protéine adaptatrice qui se lie au facteur d'échange de nucléotide guanine Sos pour induire l'activation de Ras [89]. De plus, l'association de SHP-1, PI-3K, Vav et SLP-76 soulève la possibilité que SHP-1 puisse moduler les modifications du cytosquelette en réponse au TCR puisque ces 3 protéines sont reliées à ce phénomène.

Des études ont démontré que certains récepteurs de cytokines retrouvés sur les cellules T sont modulés directement ou indirectement par SHP-1. SHP-1 peut se lier et déphosphoryler la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-2 lorsque ce dernier est activé [90]. Cette interaction résulte en une phosphorylation diminuée des PTKs de la famille Janus, telles que Jak1 et Jak3. Ainsi, SHP-1 peut inhiber la réponse de la cellule T à un stimulus en régulant à la baisse les signaux reçus par le récepteur d'IL-2. SHP-1 est donc une phosphatase importante qui agit à différents niveaux lors des cascades de signalisation des immunorécepteurs.

#### 2.4.2.1.2 *SHP-2 (Syp, PTP1D, SH-PTP2, SH-PTP3 ou PTP2C)*

Dans des systèmes cellulaires différents des lymphocytes T, SHP-2 semble principalement avoir un rôle de régulateur positif des signaux qui mènent à l'activation de la voie des MAP kinases (MAPKs) (revue dans [91]). Le mécanisme exact de cette régulation positive est encore inconnu mais des études suggèrent que la phosphorylation de SHP-2 à sa partie C-terminale est responsable pour une augmentation du recrutement de Grb2 à la membrane ce qui

permet la translocation de Sos et l'activation de Ras [92, 93]. Dans les lymphocytes T, le rôle de SHP-2 n'est pas aussi bien déterminé que celui de SHP-1 [94]. SHP-2 s'associe à CTLA-4 dans les lymphocytes T ce qui laisse présager une implication pour SHP-2 dans la transduction d'un signal négatif par CTLA-4 [95]. Des expériences subséquentes suggèrent que SHP-2 est recrutée à un complexe formé de CTLA-4 et de la chaîne  $\zeta$  du TCR et renverse la phosphorylation de la chaîne  $\zeta$  induite par Lck, un mécanisme pour la régulation négative de l'activation de la cellule T [96]. Au niveau des lymphocytes T, SHP-2 a été montrée comme devenant phosphorylé sur résidus tyrosine après l'engagement du TCR et l'ajout d'IL-2. Il a également été démontré que l'expression de SHP-2 augmente l'activation des MAPKs en réponse à l'activation de la cellule via le TCR. Cependant, ces dernières données sont encore très controversées car des équipes différentes ont trouvé des résultats contradictoires.

Très peu d'informations sont disponibles sur la signification de la participation de SHP-2 dans la signalisation induite par les cytokines. Tandis que SHP-2 semble jouer un rôle positif dans la signalisation induite par des facteurs de croissance, SHP-2 est un effecteur négatif dans l'activité cytotoxique des interférons, probablement en régulant à la baisse l'activité de Jak/Stat (revue dans [97]).

#### 2.4.2.2 FAP-1 ( PTP-BAS ou hPTP1E)

"Fas-associated phosphatase-1" (FAP-1) se lie avec la queue cytoplasmique du récepteur Fas (voir figure B). Fas est un récepteur de surface qui est exprimé sur une variété de cellules normales et de cellules néoplasiques alors que le ligand de Fas est exprimé de façon prédominante sur les cellules T cytotoxiques. La liaison de Fas à son ligand induit le phénomène

de mort cellulaire programmée par l'apoptose des cellules. Une expression ectopique de FAP-1 abolit partiellement l'apoptose induite par Fas. De plus, une corrélation existe entre le niveau d'expression de FAP-1 et la résistance de plusieurs lignées cellulaires à l'apoptose induite par Fas, suggérant ainsi que FAP-1 régule de façon négative la signalisation de Fas [98].

#### 2.4.2.3 Phosphatase de la famille PEP

##### 2.4.2.3.1 *PEP*

PEP est la phosphatase prototype de la famille PEP qui regroupe des PTPs cytoplasmiques telles que PTP-PEST et PTP-HSCF. Ces trois membres de la famille PEP contiennent des séquences riches en résidus proline, acide glutamique, sérine et théonine. Ces PTPs possèdent un domaine phosphatase amino-terminal ainsi qu'un long prolongement carboxy-terminal qui contient plusieurs séquences riches en résidus proline (voir figure B). PEP est exprimé exclusivement dans les cellules hématopoïétiques [99]. Bien que sa distribution intracellulaire soit controversée comme c'est le cas pour plusieurs enzymes, PEP est principalement retrouvée dans le cytoplasme alors que sous certaines conditions elle peut transloquer au noyau. PEP est impliquée au niveau de la signalisation qu'engendre la stimulation du TCR car elle est associée constitutivement avec Csk [100, 101]. Des études de surexpression transitoire dans des cellules T Jurkat suggèrent que PEP tout comme Csk est un régulateur négatif de l'activation des cellules T [102]. PEP semble coopérer avec Csk pour inhiber la signalisation induite par le TCR par un mécanisme qui requiert une interaction physique entre ces deux protéines. PEP agit tôt dans la cascade de signalisation du TCR en déphosphorylant les SFKs et ZAP-70 [101]. Le complexe Csk-PEP pourrait constituer un mécanisme très efficace

pour inactiver la signalisation induite par les SFKs. En effet, Csk peut phosphoryler le site de régulation négative des SFKs et PEP peut à son tour déphosphoryler le site de régulation positive des SFKs. Il est aussi possible que PEP ait d'autres substrats dans les cellules T comme le démontre une étude sur une lignée de cellules T humaines où la surexpression de PEP inhibe la phosphorylation sur tyrosine de c-Cbl [103].

#### 2.4.2.3.2 *PTP-PEST (PTP-P19, ou PTPG1)*

PTP-PEST est exprimée de façon ubiquitaire mais est cependant retrouvée en plus grande quantité dans les cellules du système immunitaire telles que les thymocytes, les cellules T et B de la rate, les cellules NK et les mastocytes (voir figure B). PTP-PEST s'associe physiquement avec plusieurs molécules impliquées dans la signalisation dont Shc, la protéine d'adhésion focale paxillin, Hic-5, Cas, CasL, Sin et Csk. Des études de surexpression dans des cellules T Jurkat ont permis de démontrer que PTP-PEST était un régulateur négatif efficace de la production de cytokines suite à la stimulation du TCR. De plus, des études biochimiques indiquent que l'action d'inhibition de PTP-PEST corrèle avec sa capacité à déphosphoryler certains substrats tels que Shc, Cas, Pyk2 et FAK et à prévenir l'activation de la cascade de signalisation Ras-MAPK [104]. Ainsi, PTP-PEST, contrairement à PEP, affecte plusieurs molécules dans la cascade de signalisation des immunorécepteurs.

#### 2.4.2.4 HePTP (LCPTP)

La HePTP (Hematopoietic protein tyrosine phosphatase) a été clonée à partir de lymphocytes T humains [105] et elle est exprimée dans le thymus, à un moindre niveau dans la

rate et dans la plupart des lignées cellulaires leucémiques dont les cellules T Jurkat. Cette phosphatase est retrouvée exclusivement dans le cytoplasme. La HePTP possède un seul domaine phosphatase (voir figure B). Des études récentes ont permis de comprendre les rôles biologiques de cette phosphatase dans les cellules hématopoïétiques. Il a été démontré que la HePTP se lie spécifiquement aux kinases Erk2 et p38 dans des cellules T intactes et déphosphoryle le résidu pTyr dans leur boucle d'activation [106]. La HePTP est donc un régulateur négatif de l'activation de la cellule T en réduisant l'activation de la voie des MAPKs Erk et p38 dans les cellules hématopoïétiques. Ainsi, puisque l'action des MAPKs est cruciale pour l'intégration des signaux dans l'activation des cellules T, la HePTP se retrouve à jouer un rôle important dans ces cellules.

## 2.5 Phosphatases à double spécificité

L'implication des phosphatases à double spécificité dans les lymphocytes T reste encore à découvrir pour la plupart de ces phosphatases. La VHR a été une des premières phosphatases à double spécificité à être découverte. La VHR peut déphosphoryler *in vitro* les résidus pTyr et pThr de phosphopeptides basés sur des séquences présentes chez des MAPKs. Cependant, ses substrats dans les cellules intactes sont inconnus. La plupart des phosphatases des MAPKs (MKPs) peuvent déphosphoryler *in vitro* tous les membres de cette famille. Toutefois, leur spécificité exacte à l'intérieur des cellules intactes n'est pas encore déterminée. Jusqu'à présent, aucune MKP constitutivement exprimée n'a été trouvée chez les lymphocytes et c'est ce qui explique en partie pourquoi les MKPs ne participent pas à la régulation négative de l'activité des MAPKs. En effet, l'activation de Erk2 dans les lymphocytes culmine après 5 minutes et revient au niveau basal après 10-15 minutes. Ainsi, puisque les MKPs telles que Pac-1 et MKP-1 ne sont

déTECTABLES qu'après 30-60 minutes suite à l'activation de la cellule, d'autres phosphatases devraient agir sur les MAPKs comme la HePTP.

Le groupe des CDC25 sont des phosphatases impliquées dans le cycle cellulaire qui vont avoir l'effet contraire des CDKs (cyclin-dépendant kinases). Les CDCs ne sont pas directement impliquées dans l'activation des lymphocytes (revue dans [62]).

### 2.5.1 PTEN (MMAC1)

PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) aussi connue sous le nom de MMAC1 (mutated in multiple advanced cancer) est un suppresseur de tumeur qui partage une homologie avec la famille des PTPs et avec la protéine tensine du cytosquelette [35] (voir figure B). Des altérations retrouvées au niveau du gène codant pour PTEN sont observées dans plusieurs types de cancers [35]. De plus, la délétion du gène chez des souris résulte en une mortalité embryonnaire probablement due à une hyperprolifération des cellules embryonnaires [107].

Bien que PTEN possède le motif signature des PTPs au sein d'un patron d'acides aminés qui ressemble à celui retrouvé chez les PTPs à double spécificité [108], PTEN déphosphoryle préférentiellement des phospholipides. En effet, des études ont démontré que PTEN déphosphoryle le phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>) spécifiquement à la position 3 de l'anneau inositol [109, 110]. Ainsi, PTEN agit *in vivo* comme un régulateur des PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> qui sont un des produits générés par la PI-3K [109]. En déphosphorylant les PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>, PTEN va catalyser la réaction contraire de celle produite par la PI-3K. PTEN

agit donc de façon opposée à l'action de la PI-3K. La PI-3K est impliquée positivement lors de plusieurs voies de signalisation qui promouvoient la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation et la réorganisation du cytosquelette [81]. Il n'est donc pas surprenant que l'activité enzymatique de PTEN soit nécessaire pour sa capacité à agir comme un suppresseur de tumeur puisque les mutations de PTEN retrouvées dans plusieurs cancers résultent en une activité phosphatase réduite ou défectueuse [111].

Dans les lymphocytes T, plusieurs données indiquent que PTEN agit comme une phosphatidylinositol 3-phosphatase. Premièrement, la transfection d'un PTEN actif dans des cellules Jurkat permet de diminuer la prolifération cellulaire. Une augmentation du taux d'apoptose est également observée. Ces deux derniers phénomènes sont complètement abolis en présence de la kinase Akt (aussi appelé PKB) constitutivement active [112]. Akt est un des effecteurs de PI-3K le mieux caractérisé qui est recruté à la membrane par les phosphatidylinositols (3,4) biphosphate [113, 114]. Une fois à la membrane, Akt est phosphorylé et, ainsi activé, il peut fournir entre autres un fort signal anti-apoptotique [115]. Deuxièmement, les effets de PTEN sur l'activation de Erk, mais non JNK, miment ce qui survient lors d'une inhibition de la PI-3K [116]. Troisièmement, une mutation dans PTEN qui permet d'abolir son activité phosphatase pour les lipides mais non celle pour les résidus pTyr, résulte en un PTEN fonctionnellement inactif [112]. Ensemble, ces résultats suggèrent que PTEN est avant tout une phosphatidylinositol 3-phosphatase qui va agir de façon opposée aux fonctions de la PI-3K dans les cellules T. Le rôle physiologique de PTEN est donc important dans la régulation de l'activation, la costimulation et la survie de la cellule T.

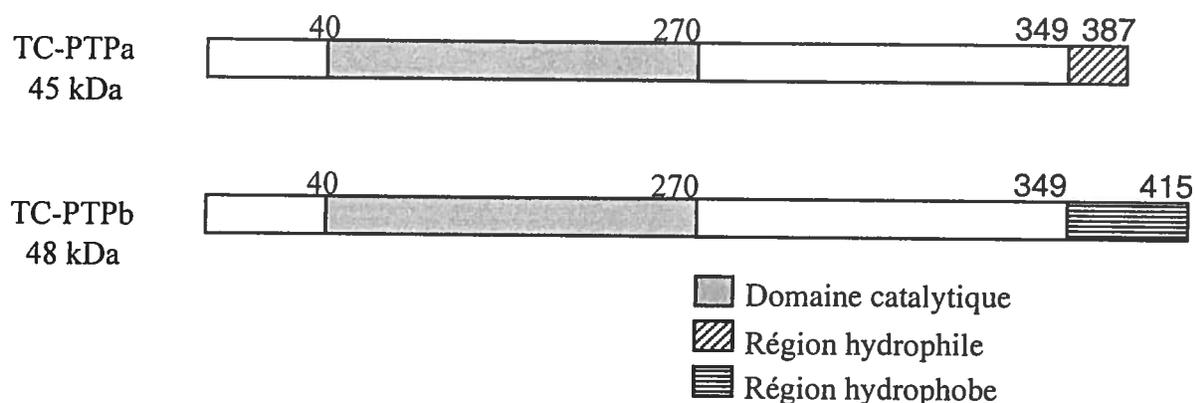
### 3. *T-cell protein tyrosine phosphatase (TC-PTP ou MPTP, PTP-S)*

#### 3.1 Découverte et description

La TC-PTP a été originalement clonée à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) provenant de cellules T périphériques humaines [117, 118]. Pour se faire, Cool et ses collègues ont utilisé des oligonucléotides synthétiques qui codent pour des régions d'acides aminés conservés retrouvées dans le domaine phosphatase de la PTP1B afin de cribler une banque d'ADNc. La nouvelle PTP clonée a été nommée TC-PTP et a une séquence homologue à 65% avec PTP1B.

La TC-PTP est une phosphatase intracellulaire non-transmembranaire qui est exprimée de façon ubiquiste et à tous les stades du développement des mammifères ainsi que dans la plupart des tissus adultes. Cette protéine est toutefois retrouvée en quantité plus importante dans les cellules lymphoïdes ce qui suggère que la TC-PTP pourrait jouer un rôle dans le système immunitaire. La protéine TC-PTP contient un domaine catalytique, typique des protéines tyrosine phosphatases, d'approximativement 250 acides aminés (voir figure D). Ce domaine est juxtaposé à un segment d'environ 40 acides aminés qui ne semble pas contenir aucun motif d'acides aminés connu et qui constitue la partie N-terminale de la protéine. La partie C-terminale varie au niveau de la taille et de ses fonctions suite à un épissage alternatif. En effet, l'ARNm de la TC-PTP humaine est épissé alternativement pour générer deux variants : une isoforme de 45-kDa (TC-PTPa) et une isoforme de 48-kDa (TC-PTPb). Bien que la partie C-terminale des deux isoformes contienne un domaine de localisation nucléaire, la TC-PTPb est localisée au réticulum

endoplasmique grâce à la présence d'un segment C-terminal hydrophobe (36 acides aminés) alors que la TC-PTPa ne contient pas ce segment C-terminal hydrophobe mais un segment hydrophile (12 acides aminés) et est localisée au noyau grâce à la présence d'une séquence de signalisation nucléaire [119-121]. Le niveau d'expression de TC-PTPb varie selon le type cellulaire et l'espèce de mammifères mais représente généralement une forme moins abondante que la TC-PTPa chez la souris [118] et l'humain [119]. Étant donné la faible présence de la TC-PTPb chez les organismes à l'étude, le reste de la discussion portera sur l'isoforme TC-PTPa.



**Figure D: Représentation schématique des deux isoformes de la TC-PTP**

## 3.2 Rôle de la TC-PTP

### 3.2.1 Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)

Jusqu'à présent, quelques études ont permis d'élucider le rôle que joue la TC-PTP dans plusieurs systèmes. L'identification des substrats est une étape cruciale dans la délimitation des voies de signalisation régulées par les PTPs *in vivo*. Pour atteindre ce but, la surexpression d'une forme mutante dominant négatif de la TC-PTP, dont la mutation rend l'enzyme catalytiquement inactive alors que l'affinité pour son substrat reste inchangée, a été utilisée dans des cellules COS1. Cette expérience a permis de démontrer que la TC-PTP s'associait avec des protéines d'environ 50, 57, 64 et 180 kDa phosphorylées sur résidus tyrosine dans des cellules COS1. Les protéines de 57 et 180 kDa ont été identifiées comme étant la protéine adaptatrice Shc et l'EGFR respectivement, ce qui implique que la TC-PTP peut avoir un rôle de modulation auprès de certains récepteurs [122]. Le récepteur à l'EGF est une protéine tyrosine kinase qui régule des processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire. L'activation du récepteur à l'EGF résulte en une transautophosphorylation de la partie C-terminale du récepteur, créant ainsi des sites de liaison pour le recrutement de protéines possédant des domaines SH2 comme Shc et Grb2 [123]. Grb2 s'associe via son domaine SH2 directement au récepteur ou à la protéine Shc phosphorylée sur résidu Tyr ce qui permet le recrutement de Sos par la suite et l'activation des MAPKs [89]. L'implication de l'association de la TC-PTP avec ces deux protéines est plus ou moins bien définie mais les résultats démontrent que la TC-PTP permet de diminuer l'association de Shc à Grb2 suite à une stimulation par l'EGF [122, 124]. Donc, la TC-PTP peut servir à moduler une voie de signalisation induite par le complexe Shc/Grb2. Toutefois, cette voie doit agir indépendamment de l'activation de la MAPK

Erk2 puisque que la surexpression de la TC-PTP ne semble pas agir sur l'activité de Erk2. Cette étude a également permis de déterminer que même si la majorité de l'isoforme de 45 kDa de la TC-PTP est localisée au niveau du noyau, celle-ci peut être relocalisée au cytoplasme en réponse à différents stimuli comme une stimulation via le récepteur à l'EGF.

D'autres études portant également sur la signalisation induite via le récepteur à l'EGF démontrent qu'en condition de stress, la TC-PTP peut non-seulement réguler à la baisse la signalisation induite via ce récepteur mais également diminuer l'activation de la MAPK, JNK [125]. Ainsi, il a pu être démontré que la TC-PTP peut réguler sélectivement des voies de signalisation des MAPKs qui émanent du récepteur à l'EGF. En effet, la surexpression de la TC-PTP dans des cellules COS-1 permet d'inhiber l'activité de JNK mais non celle de Erk2. Des études subséquentes ont permis de démontrer que la TC-PTP était impliquée dans la régulation négative de l'activation de la voie de la PI-3K et de la protéine kinase Akt suite à son induction par l'EGF [124]. La TC-PTP, en déphosphorylant le récepteur à l'EGF, inhibe l'association de la sous-unité de régulation p85 de la PI-3K et l'activation concomitante de cette dernière et de Akt [126]. L'utilisation de cellules de glioblastomes qui expriment une forme mutante du récepteur à l'EGF ( $\Delta$ EGFR) [127], qui n'a plus besoin de ligand pour être activé, a permis de démontrer que dans ce modèle, la TC-PTP inhibe l'activation de Erk2 ainsi que la signalisation induite par Akt. Il est à noter que lors d'études précédentes, aucun effet attribuable à la TC-PTP sur Erk2 n'avait été observé. Cette différence peut être attribuable au fait que différents types cellulaires sont utilisés mais également par le fait que lors de cette dernière étude, on utilise le  $\Delta$ EGFR qui peut utiliser des mécanismes différents pour activer Erk2 que ceux employés par la forme non-mutante du récepteur. Cette étude a permis également de démontrer, que seulement l'inhibition de l'activité de Erk2 causée par la surexpression de la TC-PTP permettait d'arrêter la prolifération des cellules du glioblastome.

### 3.2.2 Cycle cellulaire

Outre le rôle de la TC-PTP dans la signalisation induite par le récepteur à l'EGF, cette phosphatase est également impliquée dans le cycle cellulaire. Des études utilisant des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) déficients pour la TC-PTP (TC-PTP<sup>-/-</sup>) démontrent que ces derniers ont un taux de prolifération plus lent que les MEFs sauvages (TC-PTP<sup>+/+</sup>) [5]. Ce ralentissement lors de la prolifération est dû à une progression plus lente à travers la phase G1 du cycle cellulaire. La progression à travers le cycle cellulaire est contrôlée par les "cyclin dépendant kinases" (CDKs) [128] qui sont activées suite à leur association avec les cyclines et qui sont régulées négativement par les inhibiteurs des CDKs (CKIs) [129, 130]. La caractérisation du défaut dans la phase G1 du cycle cellulaire dans les cellules TC-PTP<sup>-/-</sup> a permis de démontrer que la cinétique d'induction de la cycline D1 était retardée et, qu'il y avait un retard dans l'activation de la CDK2 et dans l'inactivation de la protéine rétinoblastome (RB). La cycline D1 est reconnue pour s'associer à CDK4 suite à une stimulation par des facteurs de croissance. Il a été suggéré que la phosphorylation de RB par le complexe cyclineD/CDK4 est nécessaire pour induire sa dissociation du facteur de transcription E2F qui lui est responsable pour la transcription de plusieurs gènes importants pour la transition G1/S incluant la cyclineE et A [131, 132]. La progression à travers la phase G1 est également contrôlée par des CKIs, tel que la p27<sup>KIP1</sup> qui est exprimée fortement dans des cellules quiescentes pour inhiber les complexes cyclineD/CDK4 et cyclineE/CDK2 [133]. Dans les cellules TC-PTP<sup>-/-</sup> on retrouve un niveau élevé de p27<sup>KIP1</sup> pour une longue période [5]. Puisque le complexe cyclineE/CDK2 est requis pour la dégradation de p27<sup>KIP1</sup>, le fait que le taux de dégradation de p27<sup>KIP1</sup> soit ralenti dans les cellules TC-PTP<sup>-/-</sup> corrèle bien avec l'activation retardée de CDK2 et l'hypophosphorylation

de RB. Cette étude a également permis de trouver à quel niveau se situait le retard d'induction de la cycline D1. Ce problème d'induction de la cycline D1 est dû à une activation défectueuse de la voie Ikk/NF- $\kappa$ B, qui permet la transcription de cette cycline suite à une stimulation par le "platelet-derived growth factor" (PDGF). Ainsi, les résultats obtenus permettent de conclure que la TC-PTP a un rôle de régulateur positif dans la phase G1 du cycle cellulaire et ce, probablement au niveau de l'induction de l'expression de la cycline D1 via la voie d'activation de Ikk/NF- $\kappa$ B.

### **3.2.3 Signalisation induite par les cytokines**

Plusieurs études indiquent que la TC-PTP est impliquée au niveau de la régulation de la signalisation induite par les cytokines. La liaison des cytokines à leur récepteur mène à l'activation des Jaks et subséquentement à la phosphorylation sur résidus tyrosine des polypeptides de la famille Stat (signal transducer and activator of transcription). Cette phosphorylation est requise pour la dimérisation et la translocation des Stats au noyau où ils pourront permettre la transcription de certains gènes cibles [134]. Par la suite, les Stats seront déphosphorylés et seront exportés dans le cytoplasme où ils pourront prendre part à un autre cycle d'activation/inactivation [135, 136]. La régulation négative de la voie de signalisation des Jak/Stat survient à travers plusieurs mécanismes distincts. L'arrêt de la signalisation à partir de la surface cellulaire arrive suite à la dégradation du complexe récepteur/ligand via la voie de dégradation du protéasome et grâce aux suppresseurs de signalisation des cytokines (SOCS) qui inhibent l'activité des Jaks [137]. De plus, plusieurs phosphatases dont SHP-1, SHP-2, CD45 et PTP-1B peuvent déphosphoryler soit les récepteurs à cytokines ou les Jaks [52, 138, 139]. Il est connu également que les PTPs peuvent déphosphoryler les Stats dans le cytoplasme [140, 141].

Un autre type de protéines retrouvées dans le noyau, les PIAS (protein inhibitor of activated Stat), sont impliquées dans la régulation négative de la voie des Jak/Stat grâce à leur capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle des Stats [142]. Une étude récente utilisant des MEFs TC-PTP<sup>-/-</sup> a permis de démontrer que la TC-PTP est la phosphatase requise pour la déphosphorylation de Stat1 dans le noyau [143]. La déphosphorylation de Stat3 par la TC-PTP est également observée dans cette étude. Un autre groupe a étudié plus en détail le phénomène de déphosphorylation de Stat1 par la TC-PTP. L'activation des protéines Stats 1, 3 et 5 requiert leur phosphorylation sur résidus tyrosine mais nécessitent aussi la phosphorylation de leur partie C-terminale sur résidus sérine pour avoir une transactivation maximale [144]. Suite à l'activation par les IFNs, on observe également une méthylation des résidus arginine de Stat1 [145]. Les résultats de cette étude démontrent que la méthylation des résidus arginine de Stat1 permet de contrôler le taux de déphosphorylation de Stat1 en modulant son interaction avec PIAS1 et la TC-PTP. En effet, l'inhibition de la méthylation des résidus arginine de Stat1 va résulter en une augmentation de l'association avec PIAS1 et une diminution concomitante de l'association de la TC-PTP avec Stat1. Ces derniers résultats suggèrent une compétition entre ces deux protéines pour la liaison de Stat1 [145].

Une autre étude utilisant une lignée de cellules T dépendantes de l'IL-2 (CTLL-2) a permis de montrer que les kinases associées au récepteur d'IL-2, Jak1 et Jak3, sont des substrats spécifiques de la TC-PTP [4]. De plus, lorsque ces cellules sont activées avec de l'IL-2, Stat5, qui est généralement recruté au récepteur d'IL-2 et phosphorylé par Jak1 et Jak3, se retrouve hyperphosphorylé dans des cellules TC-PTP<sup>-/-</sup>. Ces résultats concordent donc avec la fonction de régulation négative attribuée à la TC-PTP dans la signalisation induite par l'IL-2 notamment par la déphosphorylation de Jak1 et Jak3. Par contre, une expérience similaire effectuée sur des thymocytes ne permet pas de détecter un changement au niveau de la déphosphorylation de Stat5

[143]. Il est à noter également que des cellules T TC-PTP<sup>-/-</sup> présentent un niveau de Stat5 plus faible, ce qui dénote que la TC-PTP peut intervenir à différents niveaux dans la régulation de la signalisation induite par les cytokines. L'activation de thymocytes par l'IFN- $\gamma$  ou l'IFN- $\alpha$ , dont la voie de signalisation passe par l'activation de Jak-1, Jak-2 et finalement Stat1, résulte en une hyperphosphorylation de Stat1. D'autres expériences effectuées sur des macrophages dérivés de la moëlle osseuse de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> ont permis de trouver que Jak1, et non Jak-2, était hyperphosphorylé suite à leur activation par l'IFN- $\gamma$ . Cette hyperphosphorylation de Jak1 est probablement responsable de l'augmentation de l'expression d'iNOS dans ces cellules [4]. Parallèlement, une étude sur la signalisation induite par le récepteur prolactine (PRL) dans des cellules COS-7 cotransfectées avec le récepteur PRL et Stat5a ou Stat5b a permis de déterminer que la TC-PTP déphosphorylait et ainsi désactivait les deux types de Stat5 dans le noyau [146]. La TC-PTP peut donc cibler certains membres de la famille des Jaks et des Stats dans certaines voies de signalisation induites par les cytokines et les hormones.

### 3.3 Rôle de la TC-PTP dans le système immunitaire

#### 3.3.1 Modèle d'étude: Souris déficientes pour la TC-PTP [3]

La génération de souris déficientes pour l'expression de la TC-PTP a permis de montrer que la TC-PTP joue un rôle important dans le système immunitaire. L'inactivation du gène codant pour la TC-PTP a été fait par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires en utilisant un vecteur qui permet d'enlever environ 5kb de ce gène incluant 3 exons essentiels codant pour le domaine catalytique de l'enzyme. Le croisement de souris TC-PTP <sup>+/-</sup> permet d'obtenir des souris homozygotes pour la mutation TC-PTP avec une fréquence mendélienne normale d'environ 25%. Toute la descendance, incluant les nouveau-nés TC-PTP -

/-, apparaît normale, cependant après 10 à 14 jours, les souris TC-PTP -/- ont un retard de croissance important. Entre 3 et 5 semaines, toutes les souris TC-PTP-/- développent une posture anormale, une fermeture progressive des paupières, un problème de pelage, une diminution de mobilité ainsi que des problèmes de diarrhée. Toutes les souris TC-PTP-/- meurent entre la 3<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> semaine.

### 3.3.2 Phénotype

L'analyse du phénotype des souris TC-PTP-/- montre que des altérations majeures sont observées dans les cellules d'origine hématopoïétique alors que des souris TC-PTP +/- ont un phénotype normal. L'observation anatomique de souris TC-PTP-/- âgées de 3 semaines montrent une splénomégalie sévère qui est accompagnée par une expansion de la pulpe rouge due à une augmentation de la séquestration des globules rouges. Les ganglions lymphatiques ont également une taille supérieure à la normale suite à une augmentation du nombre d'immunoblastes. De plus, une analyse détaillée des cellules hématopoïétiques des souris TC-PTP-/- montre que la cellularité de la rate et des ganglions lymphatiques est augmentée contrairement à ce qui survient dans la moëlle osseuse où la cellularité est dramatiquement réduite avec l'âge. L'hématocrite des souris TC-PTP-/- diminue avec l'âge et une anémie sévère est observée chez ces souris vers 21 jours [3].

### 3.3.3 Développement et fonctions des lymphocytes T

Dans le thymus, une importante réduction de thymocytes double positif ( $CD4^+CD8^+$ ) survient vers 3 semaines due à l'involution de cet organe. Cependant, chez les souris TC-PTP<sup>-/-</sup>, le nombre total de cellules T matures  $CD4^+$  et  $CD8^+$  n'est qu'un peu réduit dans le thymus et les organes lymphoïdes secondaires alors que le ratio de cellules T  $CD4^+/CD8^+$  est similaire à celui retrouvé chez des souris TC-PTP<sup>+/+</sup> (voir Tableau A).

Bien que le nombre de cellules T soit normale dans la rate, la stimulation des splénocytes totaux suite à l'engagement du CD3 avec un anticorps anti-CD3 (nos résultats) ou suite à l'engagement du TCR avec de la Con A [3] ne permet pas la prolifération des cellules T. La prolifération cellulaire n'est pas restaurée par l'ajout d'IL-2 exogène (nos résultats). Toutefois, les évènements initiaux qui se déroulent suite à une activation des cellules T semblent normaux chez les cellules T TC-PTP<sup>-/-</sup>. En effet, la phosphorylation sur résidus tyrosine et la mobilisation de calcium suite à une stimulation via le CD3 sont comparables à celles retrouvées chez les cellules T sauvages (nos résultats). Dans des études de surexpression, il a été démontré que la TC-PTP n'affecte pas les évènements qui surviennent tôt dans la cascade de signalisation du TCR ainsi que la transcription du gène de l'IL-2 [106, 147].

### 3.3.4 Développement et fonctions des lymphocytes B

Chez les souris TC-PTP<sup>-/-</sup>, une augmentation de la cellularité totale est observée. Le pourcentage des cellules pré-B ainsi que leur nombre absolu ( $B220^+IgM^-$ ) et des cellules B matures ( $B220^+IgM^+$ ) dans les ganglions lymphatiques est augmenté de 3 à 10 fois aux jours

13, 17 et 21. Le pourcentage de la population des lymphocytes B de la rate est un peu plus faible au 13<sup>ème</sup> et au 17<sup>ème</sup> jour, alors qu'il est réduit dramatiquement au 21<sup>ème</sup> jour. Dans la moëlle osseuse, la cellularité ainsi que le pourcentage des cellules pré-B (B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) et des cellules B matures (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) des souris TC-PTP<sup>-/-</sup> déclinent avec l'âge (voir Tableau A). Tout comme les cellules T, les cellules B suite à une stimulation appropriée (LPS) des splénocytes totaux TC-PTP<sup>-/-</sup> sont incapables de proliférer.

		Moëlle osseuse	Thymus	Ganglions lymphatiques	Rate
Cellules T	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	ND	Diminution	ND	ND
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	ND	SC	SC	SC
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	ND	SC	SC	SC
	Rapport CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	ND	SC	SC	SC
Cellules B immatures	B220 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup>	Diminution	ND	Augmentation	Diminution
Cellules B matures	B220 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>	Diminution	ND	Augmentation	Diminution

ND: non-disponible; SC: sans changement; Diminution/Augmentation : nombre inférieur et nombre supérieur respectivement de cellules par rapport à la population équivalente chez la souris TC-PTP<sup>+/+</sup>

**Tableau A: Caractérisation de la population lymphocytaire chez des souris TC-PTP<sup>-/-</sup> au jour 21, d'après You-Ten et collaborateurs [3]**

### 3.3.5 Hématopoïèse

Étant donné qu'il y a une diminution sévère de cellularité dans la moëlle osseuse et en particulier des cellules pré-B, la TC-PTP semble jouer un rôle important dans le développement hématopoïétique. Afin d'évaluer où se situe le défaut retrouvé lors de l'hématopoïèse, des expériences de transplantation de moëlle osseuse ont été effectuées [3]. Ces études démontrent que la transplantation de moëlle osseuse provenant de souris sauvages à des souris TC-PTP<sup>-/-</sup> ne permet pas de les empêcher de mourir. Toutefois, après transplantation de la moëlle osseuse de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> chez des souris sauvages qui ont été irradiées, les cellules T et B se développent normalement. Ceci démontre que les cellules souches des souris TC-PTP<sup>-/-</sup> peuvent avoir une hématopoïèse normale et que le défaut observé se situe au niveau de l'environnement de la moëlle osseuse. Le nombre inférieur de cellules stromales de la moëlle osseuse chez les souris TC-PTP<sup>-/-</sup> permettrait d'expliquer pourquoi la moëlle osseuse est défectueuse dans son habileté à soutenir le développement d'une hématopoïèse normale [3]. De plus, même si les cellules T et les cellules B se développent normalement dans les souris TC-PTP<sup>+/+</sup> irradiées qui ont été transplantées par de la moëlle osseuse provenant de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>, les cellules demeurent incapables de proliférer suite à une stimulation mitogénique. La TC-PTP est donc une protéine importante pour le développement et les compétences fonctionnelles des cellules B et T.

## 4. *Inhibition de la prolifération des lymphocytes*

L'immunosuppression est observée dans plusieurs situations : la réaction du greffon contre l'hôte [7], des souris immunisées avec des vaccins viraux [148], la présence de certaines bactéries et parasites [6, 10, 11], des souris traitées avec des superantigènes [9], et des souris

ayant des tumeurs [12]. Plusieurs médiateurs solubles incluant les cytokines inhibitrices, les prostaglandines, les intermédiaires d'oxygène réactifs, les peroxydes d'hydrogène et le NO ont été impliqués dans ces situations d'immunosuppression parmi lesquels le NO semble particulièrement important.

## 4.1 Oxyde nitrique (NO)

### 4.1.1 Principales caractéristiques du NO

Le NO est généré par une famille d'isoenzymes de la NO synthase (NOS) qui convertit la L-arginine en L-citrulline et en NO. Une de ces isoenzymes, iNOS, peut être induite dans un grand nombre de cellules dont les macrophages, hépatocytes, neutrophiles, cellules musculaires et endothéliales et par une variété de stimuli immunologiques tels que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou  $\beta$ , l'IL-2 et le LPS [13-17]. L'oxyde nitrique est impliqué dans plusieurs fonctions biologiques et est principalement reconnu pour son activité anti-microbienne et anti-tumorale. En plus de ces rôles cytotoxiques, le NO peut également être un inhibiteur de la prolifération cellulaire des lymphocytes T [149-156]. Le NO ne rend pas les lymphocytes T anergiques. En effet, l'inhibition de la prolifération cellulaire ne peut être rétablie par l'ajout d'IL-2 exogène et la production de cytokines (incluant l'IFN- $\gamma$ ) par les lymphocytes inhibés n'est presque pas diminuée par la présence de cellules produisant du NO [155]. Des études ont démontré que le NO pouvait interférer avec la voie de signalisation Jak3/Stat5 [152] ou directement avec des composants du cycle cellulaire [157]. En réagissant avec l'ADN, les protéines et les lipides, le

NO endommage les fonctions cellulaires normales et a ainsi son effet cytotoxique sur les cellules [16, 17, 158]. Étant donné que l'effet cytotoxique du NO est non-spécifique, une production excessive de NO peut entraîner différentes conséquences physiologiques et certaines pathologies. Il est donc important que l'expression d'iNOS soit régulée de façon très précise.

#### 4.1.2 Régulation d'iNOS

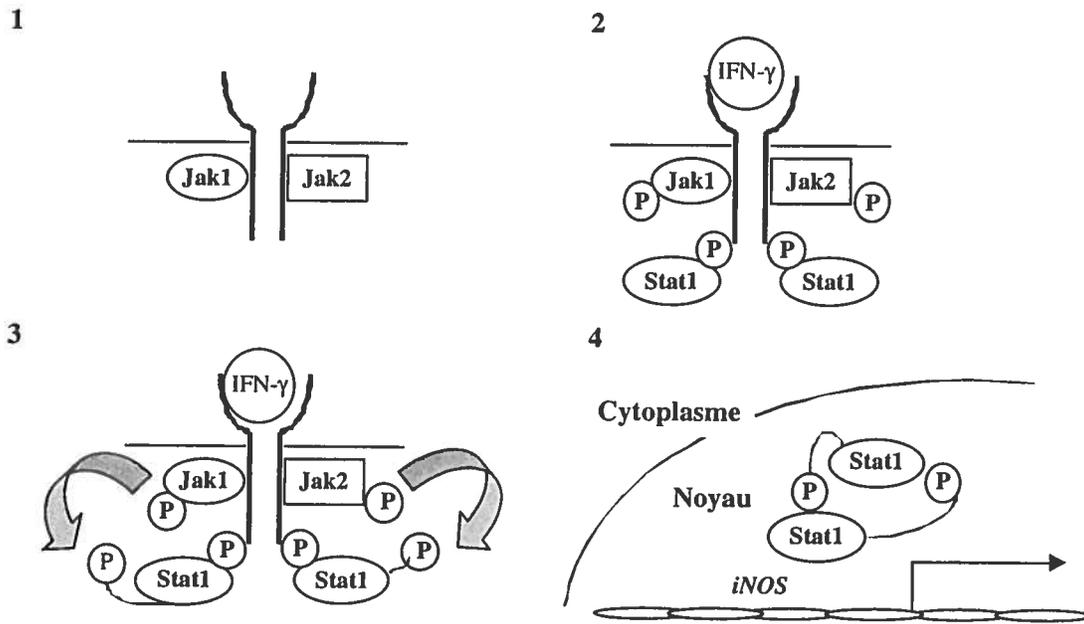
Plusieurs stimuli comme le LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-2 induisent l'expression d'iNOS dans les macrophages murins. Aucun de ces stimuli employés séparément induisent une production optimale de NO. Par exemple, le LPS, lorsqu'utilisé seul, permet un faible niveau d'expression d'iNOS alors que l'ajout d'IFN- $\gamma$  permet d'augmenter à un niveau maximal cette expression. Il existe donc une coopération entre le LPS et l'IFN- $\gamma$  pour l'expression de l'ARNm et pour l'activité de l'enzyme dans les macrophages [15]. Néanmoins dans certains cas particuliers, chacun de ces stimuli induisent à eux seuls une expression importante d'iNOS. Par exemple, il a été démontré que dans des macrophages inflammatoires murins péritonéaux, l'IFN- $\gamma$  induit l'expression d'iNOS alors que le LPS est suffisant dans une lignée cellulaire phagocytaire RAW 264.7. Un grand nombre de cytokines telles que le TGF- $\beta$ 1 [159], l'IL-4 [160], l' IL-10 [161-163] et l'IL-13 [164], sont capables d'inhiber l'expression d'iNOS dans des macrophages murins.

##### 4.1.2.1 Interféron-gamma (IFN- $\gamma$ )

L'IFN- $\gamma$  est produit principalement par les cellules T CD4<sup>+</sup>Th1, les cellules NK et plusieurs autres types de cellules T (i.e cellules T  $\gamma\delta$ , cellules NKT et cellules T CD8<sup>+</sup>).

Cependant, il a été découvert récemment que suite à une stimulation appropriée, les cellules B, les macrophages et les cellules dendritiques produisent de l'IFN- $\gamma$ . La différenciation en Th1, seules cellules T CD4<sup>+</sup> à produire de l'IFN- $\gamma$ , dépend de la présence de l'IL-12 et de l'activation de Stat4 [165-167]. L'IL-12 et l'IL-18 sont produits par les macrophages durant une réponse immunitaire innée. L'IL-18 n'induit pas le développement en Th1 comme l'IL-12 [166, 168] mais peut agir en synergie avec l'IL-12 pour augmenter la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules Th1 [169] et les cellules NK [170].

L'interféron- $\gamma$  augmente les défenses de l'hôte contre les pathogènes bactériens et viraux [171]. L'IFN- $\gamma$  après liaison à son récepteur induit la voie de signalisation Jak/Stat comme schématisé dans la Figure E. L'IFN- $\gamma$  induit l'expression des CMH de classe II pour une meilleure présentation des antigènes et augmente leurs activités anti-microbienne et anti-tumorale [172-174]. De plus, comme mentionné précédemment, l'IFN- $\gamma$  est nécessaire chez les macrophages murins pour obtenir une expression maximale de l'ARNm d'iNOS en présence de LPS, l'induction de l'ARNm d'iNOS étant dépendant, en partie, de l'activation de Stat1 (voir figure E).



**Figure E: Signalisation induite par l'IFN- $\gamma$**

Suite à une exposition à l'IFN- $\gamma$ , Jak1 et Jak2 deviennent phosphorylés sur résidus tyrosine ce qui permet par la suite la phosphorylation de Stat1. Stat1 phosphorylé va former un homodimère qui ira se lier à des séquences spécifiques de liaison présentes dans des promoteurs de différents gènes tels que *iNOS* et IRF-1. IRF-1 (non-représenté sur cette figure) est un facteur de transcription intermédiaire qui est nécessaire pour la régulation de la transcription du gène d'*iNOS* [175].

#### 4.3 Cytokines inhibitrices et autres médiateurs

Une des cytokines importantes souvent impliquée dans les cas d'immunosuppression est le TGF- $\beta$  qui est produit principalement par les lymphocytes T et les monocytes. Lorsque les lymphocytes T naïfs arrivent à un site d'inflammation, ils sont exposés à une quantité

appréciable de TGF- $\beta$ , et pourront être costimulés par cette cytokine. Cependant, suite à l'activation des lymphocytes T, l'expression du récepteur TGF- $\beta$  est augmentée, ce qui rend ces cellules plus sensibles à l'arrêt de croissance ou à l'inhibition. Ainsi, cette cytokine peut inhiber ou stimuler la croissance de certains types cellulaires selon leur état de différenciation et le niveau d'expression du récepteur TGF- $\beta$  à leur surface. Des études récentes ont permis de conclure que l'IL-10 agit de façon coopérative avec le TGF- $\beta$  lors de l'inhibition de prolifération des lymphocytes T [176, 177]. Un autre des effets immunomodulateurs attribués au TGF- $\beta$  est la suppression de la production de NO par les macrophages *in vitro* [159]. Dans certains cas particuliers, les cytokines comme l'IFN- $\gamma$  [178, 179] et le TNF- $\alpha$  [180] peuvent également induire l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T.

#### 4.4 Cellules myéloïdes suppressives (MSC)

Les cellules impliquées dans les cas mentionnés précédemment, où l'on retrouve une inhibition de la prolifération des lymphocytes, appartiennent généralement à la lignée monocyte/macrophage. Ces cellules sont nommées cellules myéloïdes suppressives (MSC) ou dans certains cas, macrophages inhibiteurs (iMACs), et expriment des marqueurs myéloïdes de surface communs aux granulocytes Gr-1 (Ly-6G) et aux macrophages CD11b [8]. Généralement ces précurseurs myéloïdes immatures sont normalement retrouvés dans la moëlle osseuse mais peuvent s'accumuler dans la rate sous l'influence du "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF) produit durant une stimulation lymphocytaire intense ou dans le cas de tumeurs croissantes.

Tous les macrophages suppresseurs se ressemblent phénotypiquement et partagent des fonctions suppressives similaires. Malgré ces similarités, il existe deux sous-populations de

macrophages suppresseurs : 1) les macrophages activés classiquement (CA), qui sont dépendants de l'IFN- $\gamma$ ; et 2) les macrophages activés alternativement (AA), qui sont dépendants de l'IL-4. Généralement, les CA sont retrouvés dans la réaction du greffon contre l'hôte, les souris immunisées avec des vaccins viraux, les souris traitées avec des superantigènes et des souris ayant des tumeurs, alors que les AA sont retrouvés principalement lors de la présence de certains parasites. Le NO semble dans tous les cas jouer un rôle majeur dans ce phénomène d'immunosuppression.

## ARTICLE

## ***Participation des auteurs***

Maryse Dupuis, premier auteur de l'article intitulé "**Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells lacking TC-PTP inhibit lymphocyte proliferation by an IFN- $\gamma$  and NO-dependant mechanism**" a effectué toutes les expériences ayant mené aux résultats rapportés aux figures 1, 3-8 ainsi que la rédaction du manuscrit.

Maria de Jesus Ibarra-Sanchez est une étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr Michel L. Tremblay avec lequel nous avons entrepris une collaboration. Cette étudiante croise les souris TC-PTP<sup>+/-</sup> et effectue leur génotypage.

Le Dr Pascale Duplay a réalisé les expériences sur la réponse au calcium ainsi que la cinétique d'activation des lymphocytes T qui sont représentées par la figure 2. Le Dr Pascale Duplay a également supervisé le projet et a contribué à le mener à terme par ses judicieux conseils. Finalement, le Dr Duplay a contribué à la correction du manuscrit.

**Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells lacking TC-PTP inhibit lymphocyte proliferation by an IFN- $\gamma$  and NO-dependent mechanism<sup>1</sup>**

Maryse Dupuis,<sup>2\*</sup> María de Jesús Ibarra-Sánchez,<sup>†</sup> Michel L. Tremblay,<sup>†</sup> and Pascale Duplay<sup>3\*</sup>

\* INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC H7V 1B7, Canada

† Department of Biochemistry and McGill Cancer Centre, McGill University  
Montréal, QC H3G 1Y6, Canada

To whom correspondence should be addressed:

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier

531 Boulevard des Prairies

Laval, QC H7V 1B7

Canada

Tel : (450) 687 5010

Fax : (450) 686 5301

e-mail : [pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca)

Key words: T Lymphocytes, Monocytes/Macrophages, Nitric Oxide, Protein Phosphatases

Running title: TC-PTP function in lymphocyte proliferation

## **Abstract**

The T cell protein tyrosine phosphatase is involved in the immune system regulation as evidenced by defective function and development of several hematopoietic cell populations in TC-PTP-deficient mice. In particular, B and T cell proliferation is greatly inhibited when total splenocytes are stimulated by LPS or anti-CD3 mAb. To define the functional defect of TC-PTP<sup>-/-</sup> lymphocytes, we isolated T and B cells from the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. We show that the proliferative response of lymphocytes was greatly increased when cultured as a purified population indicating that an inhibitory population is present in TC-PTP<sup>-/-</sup> spleen. However, TC-PTP<sup>-/-</sup> lymphocytes have a 2- to 3-fold lower proliferation rate compared to TC-PTP<sup>+/+</sup> lymphocytes suggesting that as shown previously in embryonic fibroblasts, TC-PTP is involved in the control of cell cycle in lymphocytes.

We have characterized phenotypically and functionally the inhibitory population present in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. We show that a Gr-1<sup>+</sup>-enriched cell population isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice suppress the CD3-induced proliferation of T cells in coculture *in vitro*. The specific inhibition of NO synthesis with L-NMMA restored splenocyte responses and there is a strict correlation between NO levels and the degree of suppression. Neutralization of IFN- $\gamma$  with specific mAb almost completely abolished the inhibitory activity of Gr-1<sup>+</sup> cells and concomitantly high levels of NO secretion. Moreover, inhibition of lymphocyte proliferative responses required cell-cell contact to achieve sufficient levels of NO. These findings demonstrate an important function of TC-PTP in the induction of the NO pathway that mediates inhibition of T cell proliferation.

## ***Introduction***

T cell protein tyrosine phosphatase (TC-PTP), an intracellular tyrosine-specific protein phosphatase, is expressed ubiquitously (1). However, higher levels are found in hematopoietic tissues suggesting that it plays an important role in the regulation of hematopoietic cell functions (1, 2). Indeed, homozygous null TC-PTP mutant animals show hematopoietic abnormalities manifested in splenomegaly, lymphadenopathy and loss of bone marrow cellularity (2). The bone marrow defect, likely due to stroma cell deficiency, results in the failure to support the development of B cells and erythrocytes but does not seem to affect myeloid development (2). T cell development appears also to be normal as judged by normal numbers and ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells both in the thymus and spleen (2).

In addition to its role in hematopoiesis, TC-PTP is involved in the regulation of lymphocyte functions since there is a specific defect in T and B cell proliferation of TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes following Con A and LPS stimulation respectively (2). Recently, TC-PTP has also been implicated in cytokine signaling through the negative regulation of Jak1 and Jak3 (3). Importantly, in response to IFN- $\gamma$ , there is hyperphosphorylation of Jak1 and elevated expression of iNOS in BMDMs from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. Since NO has been shown to be an important mediator of T cell suppression by activated macrophages (4-8), it is possible that the inhibition of T and B cell proliferation in response to activation signal is mediated by TC-PTP<sup>-/-</sup> macrophages that are likely to be hypersensitive to IFN- $\gamma$ . Alternatively but not exclusively, TC-PTP might play an important role in regulating lymphocyte activation. In murine embryonic fibroblasts, TC-PTP is a positive regulator of proliferation for the progression of G1 phase of the cell cycle through the NF- $\kappa$ B pathway (9). It is therefore possible that TC-PTP has the same function in lymphocytes. This might explain, at least in part, the proliferation defect of TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes.

In the present study, we examined whether the TC-PTP is involved in the regulation of lymphocyte and/or macrophage signaling. Our results clearly demonstrate that although TC-PTP<sup>-/-</sup> lymphocytes have a reduced proliferation rate compared to TC-PTP<sup>+/+</sup> lymphocytes, there is a cell population in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice that inhibits proliferative response induced by CD3 or BCR ligation. Since Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells have been shown to be involved in

the suppression of lymphocyte activation (10-16), we purified these cells and studied their involvement in the regulatory mechanism of T and B cell activation in the TC-PTP<sup>-/-</sup> background. We found that NO induced by IFN- $\gamma$  is the inhibitory effector of the TC-PTP<sup>-/-</sup> lymphocyte proliferation.

## ***Materials and Methods***

### **Mice**

TC-PTP-deficient mice of BALB/c background were previously described (2). Two- to three-week-old TC-PTP<sup>-/-</sup> and TC-PTP<sup>+/+</sup> mice were used in this study.

### **Cell preparation**

Single-cell suspensions were prepared from spleens. RBC were removed by incubating the cells 5 min in ACK lysis buffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub> and 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.2) and the cell suspensions were passed through a 30 μM nylon mesh. T, B and Gr-1<sup>+</sup> cells were obtained by sequential purification using anti-CD90 microbeads, anti-CD19 microbeads and biotinylated anti-Gr-1 mAb (0.5 μg mAb/10<sup>6</sup> cells, eBioscience, San Diego, CA) plus streptavidin microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) respectively. Positive and negative cell populations were separated on a MACS column according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). The last negative fraction which corresponds to splenocytes depleted of T, B and Gr-1<sup>+</sup> cells is called Fr.3. Purity of the various populations was determined by flow cytometry analysis and was always > 80% for T cells, > 95% for B cells and varied from 64% to 75% for Gr-1<sup>+</sup> cells.

### **Proliferation assays**

Splenocytes (4x10<sup>5</sup> cells/well) were stimulated with 25 μg/ml plate-bound anti-CD3 mAb (145.2C11) or with 10 μg/ml of LPS (Sigma, St-Louis, MO). Assays were performed in 96-well plates, 200 μl/well in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, 50 μM 2-ME (Sigma), glutamine, antibiotics, 10 mM HEPES pH 7.3, and 0.1 mM Non-Essential Amino Acid (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). In all coculture, an equal number of Gr-1<sup>+</sup> cells (1x10<sup>5</sup> cells) was added to purified T and B cells (1x10<sup>5</sup> cells). Cells were cultured for 24 h at 37°C, then pulsed with 2 μCi/ml [<sup>3</sup>H]thymidine (ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, CA) for an additional 18 h. Data are expressed as cpm (mean ± SD of triplicate cultures). Where indicated, IFN-γ at 100 U/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), 0.5 mM N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine

(Alexis, San Diego, CA) or recombinant mouse IL-2 (Roche Diagnostics, Laval, Canada) were added to cultures. Neutralizing anti-mouse IFN- $\gamma$  mAb (R4-6A2) was used at 100  $\mu$ g/ml. In some experiments, splenocytes were treated with L-leucine methyl ester (Sigma) as described previously (30). Some experiments were performed in 24-well transwell cell culture insert (0.4  $\mu$ m pore, Costar, Cambridge, MA) in a final volume of 800  $\mu$ l. T cells ( $5 \times 10^5$  cells) were in the lower compartment of the well and Gr-1<sup>+</sup> cells ( $5 \times 10^5$  cells) were in the upper compartment. T cells were stimulated with 25  $\mu$ g/ml plate-bound anti-CD3 mAb (145.2C11). Where indicated, IFN- $\gamma$  (100 U/ml, R&D Systems) was added to cultures. The same numbers of cells were cultured together in the lower compartment in 24-well plates. Cells were cultured for 24 h at 37°C, then pulsed with 2  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]thymidine (ICN Biomedicals Inc) for an additional 18 h. Cells in the lower compartment were transferred to 96-well plates to be harvested and counted.

#### NO measurements

In proliferation assays, supernatants were harvested after 18 h or 42 h of culture and levels of NO were measured as the nitrite concentration by mixing equal volumes of culture supernatants (100  $\mu$ l) and Griess reagent (17). Nitrite concentrations were determined by comparing the absorbance values of the test samples to a standard curve generated by serial dilution of 200  $\mu$ M sodium nitrite.

#### Flow cytometry

Cells were surface stained using the following mAbs: PE-anti-CD8 (Rat IgG2a, eBioscience), FITC-anti-F4/80 (Rat IgG2b, Serotec, Hornby, ON), PE-anti-CD80 (Armenian hamster IgG, eBioscience) PE-anti-Gr-1 (Rat IgG2b, eBioscience), FITC-anti-CD11b (Rat IgG2b, kindly provided by Suzanne Lemieux, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada). Acquisition of cells was performed using an EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Dead cells were gated out based on the vital colorant 7-amino-actinomycin D staining (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada).

#### Western blot analysis

Splenocytes ( $2 \times 10^6$  cells) were washed in RPMI 1640 and resuspended at  $4 \times 10^7$  cells/ml in RPMI 1640. Cells were left unstimulated or stimulated with anti-CD3 (145.2C11, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 30 min at 4°C. Cells were washed in RPMI 1640 and resuspended at  $4 \times 10^7$  cells/ml in RPMI 1640. Cells were left unstimulated or stimulated with goat anti-hamster (30  $\mu\text{g/ml}$ , Jackson ImmunoResearch Inc, West Grove, PA) for the time indicated. Cells were harvested and solubilized for 30 min at 4°C in 1% Nonidet P-40 containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 1 mM EGTA in the presence of inhibitors of proteases and phosphatases (10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin and aprotinin, 1 mM Pefabloc-sc, 50 mM NaF, 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Immunoblotting was performed as described previously (18).

#### Measurement of intracellular $\text{Ca}^{2+}$

Spleen cells were enriched in T cells by removing B cells with Collect<sup>TM</sup> mouse T cell column (Cytovax, biotechnologies Inc., Edmonton, AB, Canada). B cells-depleted splenocytes were washed twice with HBSS and incubated at  $10^7$  cells/ml with 3  $\mu\text{M}$  Indo-1 (Molecular Probes, Eugene, OR) and 0.4 mg/ml Pluronic acid F-127 (Molecular Probes) for 30 min at room temperature. Cells were washed in HBSS and resuspended at  $10^6$  cells/ml, and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization was conducted on an EPICS ELITE ESP cell sorter (Coulter Electronics). Cells were stimulated with anti-CD3 mAb (145.2C11, 5  $\mu\text{g/ml}$ ) for 2 min at 37°C and goat anti-hamster mAb (30  $\mu\text{g/ml}$ , Jackson ImmunoResearch Inc) was added.

## **Results**

### **T and B cells purified from TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes proliferate in response to CD3 or LPS stimulation**

It has been previously demonstrated that splenocytes isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice failed to proliferate in response to Con A and LPS (2). In order to define whether this defective proliferative response is due to an intrinsic defect of lymphocytes or to a suppressive population present in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice, we purified the T and B cell population and tested their capacity to proliferate in response to CD3 or LPS stimulation. As expected, we found a dramatic defective proliferative response of TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes to CD3 stimulation. CD3-induced proliferation was more than 20 times lower than the response of cells from TC-PTP<sup>+/+</sup> control splenocytes despite the fact that the percentage of T cells were equivalent (Fig. 1A). Moreover, IL-2 addition to TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes did not restore proliferation (Fig. 1B) indicating that the defective signaling pathway, if any, is downstream of IL-2 secretion. When T lymphocytes are purified from TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes their CD3-induced proliferation was greatly increased (Fig. 1A). As found for T cells, B cells failed to proliferate in response to LPS when tested within the total spleen cell population whereas their proliferation was restored when present as a purified population (Fig 1C). However, TC-PTP<sup>-/-</sup> T or B cells have an approximately two- to three-fold lower proliferative response compared to the response of T or B cells purified from TC-PTP<sup>+/+</sup> splenocytes. This is likely due to the positive regulatory role of TC-PTP in proliferation (9).

### **Early TCR signaling is not affected in TC-PTP<sup>-/-</sup> T cells**

To test the possibility that TC-PTP<sup>-/-</sup> T cells have a defect in TCR signaling that will be translated by a low proliferation rate, we examined early signaling events of splenic T cells initiated in response to CD3 cross-linking. As shown in Fig. 2A, the pattern and intensity of protein tyrosine phosphorylation induced by CD3 stimulation are similar in T cells from TC-PTP<sup>+/+</sup> or TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes. Moreover, CD3-induced calcium mobilization is not

affected in TC-PTP<sup>-/-</sup> T cells (Fig. 2B). These results indicate that any potential defect in TC-PTP<sup>-/-</sup> T cells is downstream of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization responses.

### **Gr-1<sup>+</sup> cells isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes inhibit T cell proliferation**

To identify the suppressive cell population present in the TC-PTP<sup>-/-</sup> spleen, we used magnetic beads sorting. Since CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells have the ability to inhibit T cell function (10-16, 19-21), we first asked whether the Gr-1<sup>+</sup> population in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice was responsible for the observed inhibition of T cell proliferation. TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes were positively and sequentially purified for Thy-1 (T cells), CD19 (B cells) and Gr-1 (macrophages, NK, neutrophils) cell surface expression. Gr-1<sup>+</sup> and cells depleted in T, B and Gr-1<sup>+</sup> (Fr. 3) were tested for their capacity to inhibit T cell proliferation. We used T cells isolated from TC-PTP<sup>+/+</sup> mice in these experiments to ensure that inhibitory activities are solely due to the tested population and avoid potential additional inhibitory effect resulting from the absence of TC-PTP in the TC-PTP<sup>-/-</sup> lymphocytes. Our results demonstrate that T cell proliferation after CD3 stimulation is completely abolished when T cells are cocultured with positively magnetic beads sorted enriched Gr-1<sup>+</sup> cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes whereas the remaining cells depleted of Gr-1<sup>+</sup> had no effect (Fig. 3A). Importantly, the same Gr-1<sup>+</sup> cell population from TC-PTP<sup>+/+</sup> did not inhibit cell proliferation when added to T cells (Fig. 3A). Moreover, the inhibitory Gr-1<sup>+</sup> cell population is sensitive to L-leucine methyl ester (LME) since treatment of TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes with LME restored CD3-induced T cell proliferation (Fig. 3C). Since NO is known to be involved in immunosuppression (4-8, 22), we tested whether it plays a role in the inhibition of lymphocyte proliferation mediated by TC-PTP<sup>-/-</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells. The NO production correlated with the intensity of the inhibition (Fig. 3B). Altogether these results demonstrate that a Gr-1<sup>+</sup> population present in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice inhibits T cell proliferation likely by a NO-dependent mechanism.

### **Inhibition of T cell proliferation mediated by Gr-1<sup>+</sup> splenocytes from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice is NO-dependent and requires IFN- $\gamma$**

To confirm that NO produced by Gr-1<sup>+</sup> TC-PTP<sup>-/-</sup> cells was the main mechanism for the suppression of proliferation, we asked whether L-NMMA, a competitive inhibitor of inducible NO synthase (iNOS), was able to restore proliferation. The inhibition of proliferation could be completely reversed when L-NMMA was added to TC-PTP<sup>+/+</sup> T cells cocultured with TC-PTP<sup>-/-</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells (Fig. 4B). As shown in Fig. 4A, although there is the same number of T cells in TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes, the CD3-induced proliferation of TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes was reduced in presence of L-NMMA compared to TC-PTP<sup>+/+</sup> splenocytes. As mentioned above, this is likely due to the defective proliferation of TC-PTP<sup>-/-</sup> T cells. Moreover, the production of NO correlated with the levels of inhibition and was dependent of IFN- $\gamma$  since a blocking anti-IFN- $\gamma$  mAb prevented NO production and reversed completely the inhibition of proliferation mediated by Gr-1<sup>+</sup> cells (Fig. 4C and 4D). These results suggest that NO production is dependent of IFN- $\gamma$  and is involved in Gr-1<sup>+</sup> cell-mediated inhibition of T cell responses in TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. This NO-mediated anti-proliferative effect is partially reversed when T cells have been preactivated with anti-CD3 mAbs for 6 h prior contact with the Gr-1<sup>+</sup> cells (Fig. 5).

### **Gr-1<sup>+</sup> cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice inhibit T cell proliferation through a contact-dependent mechanism**

We noticed repeatedly that Gr-1<sup>+</sup> enriched cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> but not from TC-PTP<sup>+/+</sup> mice stimulated by IFN- $\gamma$  added exogenously at 100 U/ml produced approximately half the amount of NO as when cultured with CD3-stimulated T cells (Fig. 6A ). By contrast, resting T cells did not enhance the IFN- $\gamma$ -induced NO production of Gr-1<sup>+</sup> TCP-PTP<sup>-/-</sup> cells (Fig. 6B). These data suggest that additional signals mediated by activated T cells are required to achieve high levels of NO production by Gr-1<sup>+</sup> cells isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> spleen. To determine whether these signals involve cell-cell contact or only soluble mediators, we either cocultured the Gr-1<sup>+</sup> enriched cells with the T cells in the same well or separated by a semipermeable membrane. Suppression of CD3-induced proliferation occurred only if TC-PTP<sup>-/-</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells were in contact with T lymphocytes (Fig. 6C). Similarly, high levels of NO production required a contact between the Gr-1<sup>+</sup> cell population and T lymphocytes even in the presence of high amount of IFN- $\gamma$  added exogenously (Fig. 6D).

### **Characterization of the Gr-1<sup>+</sup> cell population isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice**

Suppression of immune responses in pathological or non-pathological situations results often from the accumulation of CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> suppressive myeloid cell populations in the spleen (10, 19). By contrast, flow cytometry analysis revealed that there was not an accumulation of CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice (Fig. 7). To further characterize functionally the Gr-1<sup>+</sup> population, we tested whether secretion of NO was differently regulated in cells isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> than in those isolated from TC-PTP<sup>+/+</sup> splenocytes. As shown in Fig. 8A, LPS alone or IFN- $\gamma$  alone induced NO production in TC-PTP<sup>-/-</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells but only when added in combination in TC-PTP<sup>+/+</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells. These results indicate that TC-PTP<sup>-/-</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells are in a different state of activation than TC-PTP<sup>+/+</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells. In an attempt to characterize further the state of activation of Gr-1<sup>+</sup> cells, we compared their B7.1 (CD80) expression. The expression of B7.1, a marker which is up-regulated in B cells and macrophages when activated, was present in higher levels at the cell surface of unstimulated Gr-1<sup>+</sup> cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice than Gr-1<sup>+</sup> cells from TC-PTP<sup>+/+</sup> mice (Fig. 8B). By contrast, there was not a significant difference in the percentage and level of expression of Gr-1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> or F4/80<sup>+</sup> cells between TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> Gr-1<sup>+</sup> population (Fig. 8C). The Gr-1<sup>+</sup> inhibitory cell population, i. e. Gr-1<sup>+</sup> purified cells depleted for T and B cells, is more than 83% CD11b<sup>+</sup> double positive (Fig. 8C ). Altogether, these results demonstrate that there is in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice a Gr-1<sup>+</sup> cell population with the functional and phenotypic characteristics of activated cells.

## ***Discussion***

In this study, we have identified the cell population and examined the mechanism that leads to deficient proliferative responses to CD3 or LPS stimulation of TC-PTP<sup>-/-</sup> spleen cells. Our results clearly demonstrate that an inhibitory Gr-1<sup>+</sup> cell population in the spleen of TC-PTP-deficient mice prevents the proliferation of lymphocytes. This inhibitory activity is not linked to a phenotypic or functional defect of TC-PTP<sup>-/-</sup> lymphocytes since proliferation of TC-PTP<sup>+/+</sup> lymphocytes are inhibited to the same extent.

This inhibition is likely mediated by NO since L-NMMA, an iNOS inhibitor, completely restores proliferation. Moreover, there is a strict correlation between NO levels and the degree of suppression. In myeloid cells, NO is produced by the inducible enzyme, NO synthase (iNOS), during the conversion of L-arginine to L-citrulline (23, 24). iNOS message and protein are induced by a variety of stimuli such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 and LPS in macrophages (24-26). In our study, IFN- $\gamma$ , produced by anti-CD3 activated T cells, is required for Gr-1<sup>+</sup> cell-mediated suppressive activity. Indeed, neutralization of IFN- $\gamma$  with a specific mAb almost completely abolished the inhibitory activity of Gr-1<sup>+</sup> cells and concomitantly high levels of NO secretion. Moreover, IFN- $\gamma$ -induced NO production required cell-cell contact to achieve the levels of NO sufficient for inhibition of lymphocyte proliferative responses. This cell-mediated signal is present on activated T cells but not on resting cells. Moreover, CD3-stimulation of T lymphocytes 6 hours before coculture with Gr-1<sup>+</sup> cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice rescued the proliferation of the cells almost completely. Therefore, NO-mediated proliferative suppression likely acts by preventing the cells from entering the cell cycle or arresting the cells before the first G1/S transition. Additional experiments are required to identify the molecules involved in the increase of IFN- $\gamma$ -induced NO secretion by Gr-1<sup>+</sup> cells, to characterize the cellular targets of NO and determine the effector mechanisms involved in the inhibition.

The Gr-1<sup>+</sup> inhibitory cell population in the spleen is heterogeneous and contains NK cells, macrophages and neutrophils (27-29). There is not a significant difference in the percentage and level of expression of Gr-1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> or F4/80<sup>+</sup> cells between TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> Gr-1<sup>+</sup> populations. Depletion of the Gr-1<sup>+</sup> population of cells expressing the pan-NK marker DX5 did

not abrogate inhibitory activity (data not shown). Moreover, treatment of splenocytes from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice with LME, which kills selectively cells with high lysosomal content (30), restored T cell proliferation of splenocytes from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. Taken together these results indicate that in the TC-PTP<sup>-/-</sup> spleen, the population of Gr-1<sup>+</sup> cells that inhibits T and B cell proliferation through an NO<sup>-</sup> and IFN- $\gamma$ -dependent mechanism is likely to correspond to suppressor macrophages that express the granulocyte-monocyte markers CD11b and Gr-1 which have been studied in other experimental systems such as mice injected with superantigens, tumors, virus, cyclophosphamide and bacteria (11-16, 20). This Gr-1<sup>+</sup> enriched population likely corresponds to an heterogeneous population and the cells responsible for the inhibition might correspond to a fraction of the Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> cells present in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. The equivalent inhibitory cell population might be present in the TC-PTP<sup>+/+</sup> spleen but likely at much lower numbers. Moreover, as reflected by the increased expression of the cell surface marker B7.1, the Gr-1<sup>+</sup> enriched population from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice had a more activated phenotype than TC-PTP<sup>+/+</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells. Therefore, due to these quantitative and qualitative differences among TC-PTP<sup>-/-</sup> and TC-PTP<sup>+/+</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells, much higher ratio of TC-PTP<sup>+/+</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells will be required for efficient inhibition of T cell proliferation.

We demonstrate that Gr-1<sup>+</sup> cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice display an altered sensitivity towards IFN- $\gamma$  or LPS signals compared to Gr-1<sup>+</sup> cells from TC-PTP<sup>+/+</sup> mice. One possible explanation for the preactivation state of macrophages is an excess of IFN- $\gamma$  secretion by T cells in vivo in TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. Our experimental data support this hypothesis since, when stimulated with anti-CD3 mAb, TC-PTP<sup>-/-</sup> T cells produce larger amount of IFN- $\gamma$  than TC-PTP<sup>+/+</sup> T cells (data not shown). Alternatively, altered development of these cells in the bone marrow of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice might lead to the differentiation of these myeloid suppressor cells. The reported defect of stroma cells in the bone marrow of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice might be responsible for the impaired development of myeloid cells (2). Moreover, TC-PTP has been shown to be a negative regulator of Jak1 and Jak3 (3) and the nuclear isoform of TC-PTP was identified as the Stat1 nuclear phosphatase (31, 32). Therefore, the expected high activity of Jak1 and Stat1 in TC-PTP<sup>-/-</sup> mice may explain, at least in part, the enhanced Stat1/Jak1/2-mediated response to IFN- $\gamma$  and Stat1/Tyk2 mediated response to LPS in TC-PTP<sup>-/-</sup> macrophages. The hyperphosphorylation of Jak1 and elevated expression of iNOS of BMDM treated by IFN- $\gamma$  support this hypothesis (3).

Moreover, our results indicate that in TC-PTP<sup>-/-</sup> T lymphocytes, early (i.e. calcium mobilization, tyrosine phosphorylation and ERK1/2 activation, Fig. 2 and data not shown) and late (i.e. IL-2 secretion, data not shown) TCR signaling events were not affected. These results are in agreement with studies showing that overexpression of TC-PTP does not affect IL-2 transcription (33). Nevertheless, it should be noted that as found in embryonic fibroblasts (9), TC-PTP may play also an important role in the regulation of DNA synthesis of T and B cells.

In conclusion, we demonstrate that TC-PTP is involved in the functional and/or developmental regulation of both lymphocytes and macrophages and highlight the important role that TC-PTP may play in controlling immune responses. The inhibition of TC-PTP activity in macrophages is associated with immunosuppressive properties and may therefore represent a novel approach to control lymphocyte proliferation associated with autoimmune diseases and transplant rejection.

### ***Acknowledgments***

We thank Ailsa Lee Loy for her technical assistance with the mice. We also thank Annie Bourdeau for critical reading of the manuscript.

## References

1. Ibarra-Sanchez, M. J., P. D. Simoncic, F. R. Nestel, P. Duplay, W. S. Lapp, and M. L. Tremblay. 2000. The T-cell protein tyrosine phosphatase. *Semin Immunol* 12:379.
2. You-Ten, K. E., E. S. Muise, A. Itie, E. Michaliszyn, J. Wagner, S. Jothy, W. S. Lapp, and M. L. Tremblay. 1997. Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J Exp Med* 186:683.
3. Simoncic, P. D., A. Lee-Loy, D. L. Barber, M. L. Tremblay, and C. J. McGlade. 2002. The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 12:446.
4. Albina, J. E., J. A. Abate, and W. L. Henry, Jr. 1991. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J Immunol* 147:144.
5. Allione, A., P. Bernabei, M. Bosticardo, S. Ariotti, G. Forni, and F. Novelli. 1999. Nitric oxide suppresses human T lymphocyte proliferation through IFN- gamma-dependent and IFN-gamma-independent induction of apoptosis. *J Immunol* 163:4182.
6. Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt, and U. R. Kees. 1998. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 160:5729.
7. Krenger, W., G. Falzarano, J. Delmonte, Jr., K. M. Snyder, J. C. Byon, and J. L. Ferrara. 1996. Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 88:1113.
8. van der Veen, R. C., T. A. Dietlin, L. Pen, and J. D. Gray. 1999. Nitric oxide inhibits the proliferation of T-helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion. *Cell Immunol* 193:194.

9. Ibarra-Sanchez, M. J., J. Wagner, M. T. Ong, C. Lampron, and M. L. Tremblay. 2001. Murine embryonic fibroblasts lacking TC-PTP display delayed G1 phase through defective NF-kappaB activation. *Oncogene* 20:4728.
10. Bronte, V., M. Wang, W. W. Overwijk, D. R. Surman, F. Pericle, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo. 1998. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* 161:5313.
11. Cauley, L. S., E. E. Miller, M. Yen, and S. L. Swain. 2000. Superantigen-induced CD4 T cell tolerance mediated by myeloid cells and IFN-gamma. *J Immunol* 165:6056.
12. Young, M. R., M. A. Wright, J. P. Matthews, I. Malik, and M. Prechel. 1996. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte- macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide. *J Immunol* 156:1916.
13. al-Ramadi, B. K., M. A. Brodtkin, D. M. Mosser, and T. K. Eisenstein. 1991. Immunosuppression induced by attenuated Salmonella. Evidence for mediation by macrophage precursors. *J Immunol* 146:2737.
14. Bobe, P., K. Benihoud, D. Grandjon, P. Opolon, L. L. Pritchard, and R. Huchet. 1999. Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction. *Blood* 94:1028.
15. Schleifer, K. W., and J. M. Mansfield. 1993. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J Immunol* 151:5492.
16. Dasgupta, S., A. Mookerjee, S. K. Chowdhury, and A. C. Ghose. 1999. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis: an evaluation of the role of nitric oxide toward impairment of the lymphoproliferative response. *Parasitol Res* 85:594.
17. Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131.
18. Nemorin, J. G., and P. Duplay. 2000. Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. *J Biol Chem* 275:14590.

19. Atochina, O., T. Daly-Engel, D. Piskorska, E. McGuire, and D. A. Harn. 2001. A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 167:4293.
20. Bronte, V., E. Apolloni, A. Cabrelle, R. Ronca, P. Serafini, P. Zamboni, N. P. Restifo, and P. Zanovello. 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96:3838.
21. Kusmartsev, S. A., Y. Li, and S. H. Chen. 2000. Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J Immunol* 165:779.
22. Albina, J. E., and W. L. Henry, Jr. 1991. Suppression of lymphocyte proliferation through the nitric oxide synthesizing pathway. *J Surg Res* 50:403.
23. Nathan, C., and Q. W. Xie. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269:13725.
24. MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323.
25. Cox, G. W., G. Melillo, U. Chattopadhyay, D. Mullet, R. H. Fertel, and L. Varesio. 1992. Tumor necrosis factor-alpha-dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN-gamma plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. *J Immunol* 149:3290.
26. Deng, W., B. Thiel, C. S. Tannenbaum, T. A. Hamilton, and D. J. Stuehr. 1993. Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 151:322.
27. Fleming, T. J., M. L. Fleming, and T. R. Malek. 1993. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151:2399.
28. Hestdal, K., F. W. Ruscetti, J. N. Ihle, S. E. Jacobsen, C. M. Dubois, W. C. Kopp, D. L. Longo, and J. R. Keller. 1991. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 147:22.
29. Lagasse, E., and I. L. Weissman. 1996. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197:139.

30. Thiele, D. L., M. Kurosaka, and P. E. Lipsky. 1983. Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *J Immunol* 131:2282.
31. ten Hoeve, J., M. de Jesus Ibarra-Sanchez, Y. Fu, W. Zhu, M. Tremblay, M. David, and K. Shuai. 2002. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22:5662.
32. Zhu, W., T. Mustelin, and M. David. 2002. Arginine methylation of STAT1 regulates its dephosphorylation by T cell protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 277:35787.
33. Gjorloff-Wingren, A., M. Saxena, S. Han, X. Wang, A. Alonso, M. Renedo, P. Oh, S. Williams, J. Schnitzer, and T. Mustelin. 2000. Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells. *Eur J Immunol* 30:2412.

## **Footnotes**

<sup>1</sup>This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to P.D. and by an operating grant of the National Cancer Institute of Canada to M.L.T. P.D. is a CIHR New Investigator, M.L.T. is a scientist of the CIHR.

<sup>2</sup>M. D. was partly supported by a studentship from the Fondation Armand-Frappier.

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed:

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier

531 Boulevard des Prairies

Laval, QC H7V 1B7

Canada

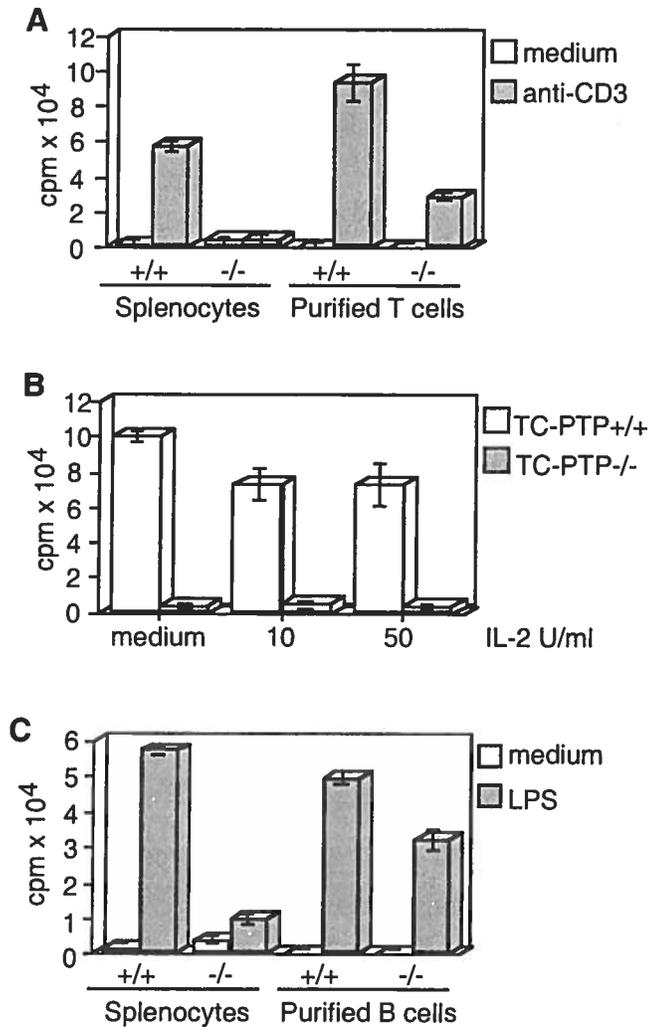
Tel : (450) 687 5010

Fax : (450) 686 5301

e-mail : [pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca)

<sup>4</sup>Abbreviations used in this paper: BMDM, bone marrow-derived macrophage; iNOS, inducible NO synthase; Jak, Janus kinase; L-NMMA, N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine.monoacetate; LME, L-leucine methyl ester; TC-PTP, T cell protein tyrosine phosphatase.

### Figures and figure legends



**Figure 1: Purified T and B cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes proliferate after mitogen stimulation**

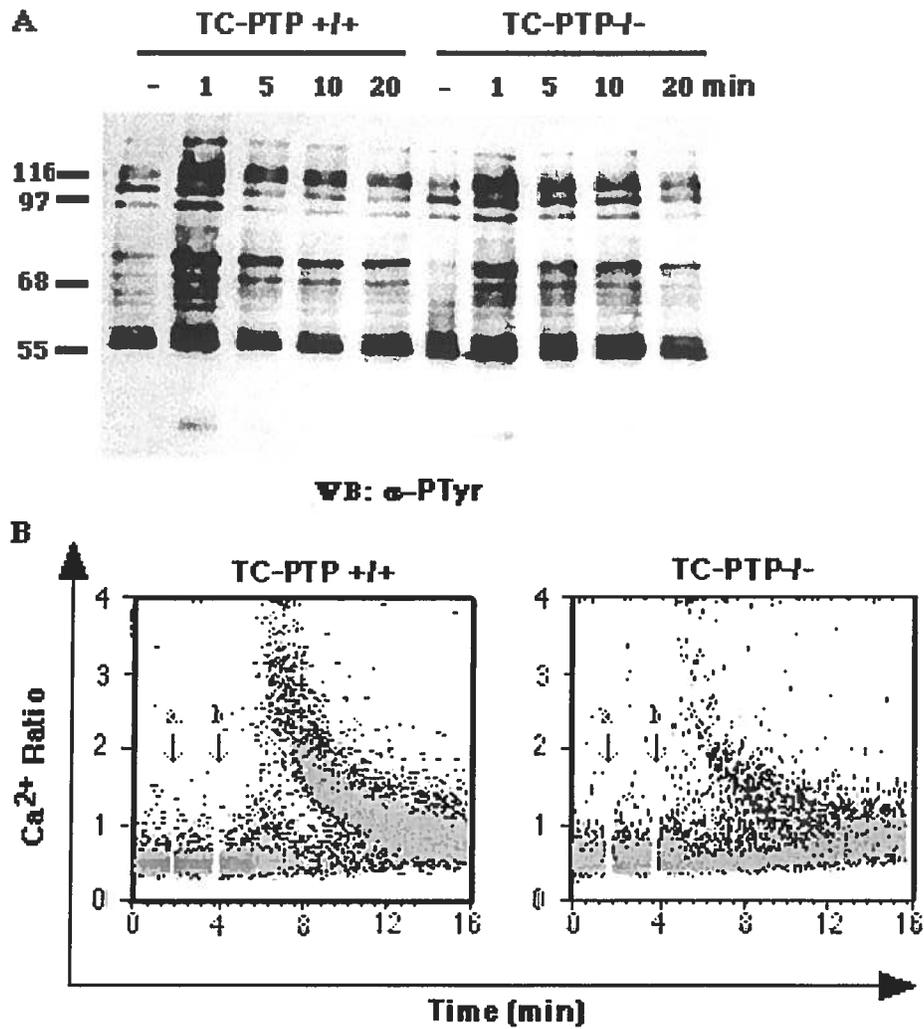
(A) Splenocytes ( $4 \times 10^5$ ) and purified T cells ( $2 \times 10^5$ ) from spleen of TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> mice were left unstimulated (medium) or stimulated on mAbs-coated plate with anti-CD3 ( . After 24 h cells were pulsed with [<sup>3</sup>H]thymidine and harvested 18 h later. Data represent

means  $\pm$  SD of triplicate cultures and are representative of ten experiments. In the experiment shown, the percentage of CD3<sup>+</sup> and B220<sup>+</sup> cells was respectively 20% and 63% for TC-PTP<sup>+/+</sup> and 19% and 60% for TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes.

(B) Splenocytes ( $4 \times 10^5$ ) from spleen of TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> mice were stimulated on mAbs-coated plate with anti-CD3 in absence (-) or presence of IL-2 as indicated. Data represent means  $\pm$  SD of triplicate cultures and are representative of two separate experiments. In the experiment shown, the percentage of CD3<sup>+</sup> cells was respectively 12% for TC-PTP<sup>+/+</sup> and 22% for TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes.

(C) Splenocytes ( $4 \times 10^5$ ) and B cells ( $2 \times 10^5$ ) from spleen of TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> mice were left unstimulated (medium) or stimulated with LPS. The percentage of CD3<sup>+</sup> and B220<sup>+</sup> cells was as in (A).

After 24 h, cells were pulsed with [<sup>3</sup>H]thymidine and harvested 18 h later.

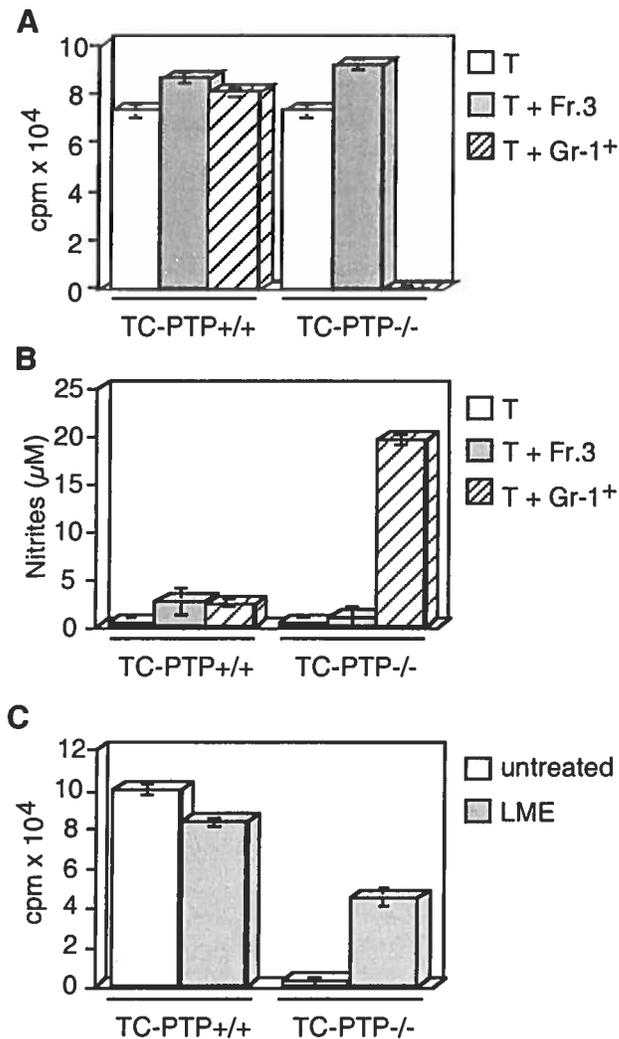


**Figure 2: CD3-induced tyrosine phosphorylation and calcium response is not affected in T cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice**

(A) Total cell lysates from T cells purified from splenocytes of TC-PTP<sup>+/+</sup> or TC-PTP<sup>-/-</sup> mice were analyzed by phosphotyrosine immunoblotting. Cells were left unstimulated (-) or

stimulated with anti-CD3 mAb (145.2C11) for indicated time. Left, positions of molecular mass markers are shown in kilodaltons.

(B) T cells enriched splenocytes isolated from TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> mice were loaded with indo-1 and stimulated with anti-CD3 (arrow a) and goat anti-hamster (arrow b) at the indicated time. Intracellular calcium was measured by comparing the ratio of Indo-1 emission at 381 nm (calcium-bound Indo-1) and 525 nm (free Indo-1) with excitation at 325 nm.



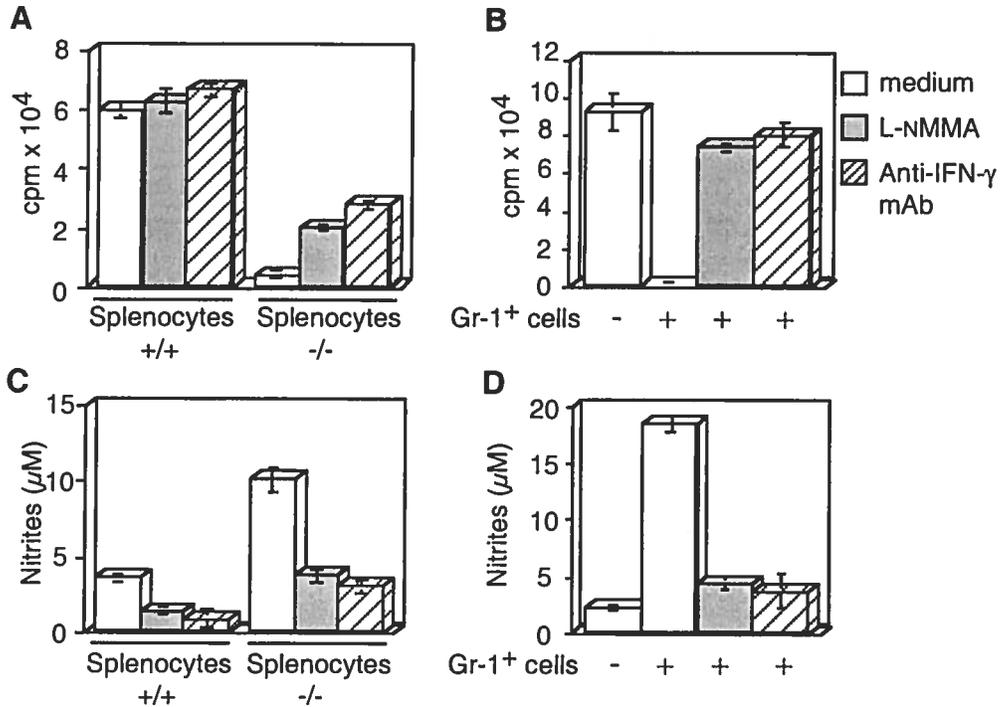
**Figure 3: Gr-1<sup>+</sup> cells purified from splenocytes of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice inhibit T cell proliferation**

(A) Purified T cells from TC-PTP<sup>+/+</sup> splenocytes were stimulated on mAbs-coated plate with anti-CD3 with no additional cells (T) and in presence of the Fr.3 (T + Fr.3) or Gr-1<sup>+</sup> (T + Gr-1<sup>+</sup>) cell population isolated from TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. Gr-1<sup>+</sup> cells were purified with magnetic beads and Fr.3 represents splenocytes depleted of T, B and Gr-1<sup>+</sup> cells. The proliferation was measured by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation as described in Fig. 1.

(B) After 42 h, supernatants were harvested and the amount of NO secreted was detected using Griess reagent.

Data are the average of triplicate wells and are representative of four separate experiments.

(C) Splenocytes ( $4 \times 10^5$ ) from TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> mice were treated (LME) or untreated (untreated) with L-leucine-methyl ester and they were stimulated on mAbs-coated plate with anti-CD3. After 24 h, cells were pulsed with [<sup>3</sup>H]thymidine and harvested 18 h later. Data represent means  $\pm$  SD of triplicate cultures and are representative of two experiments.



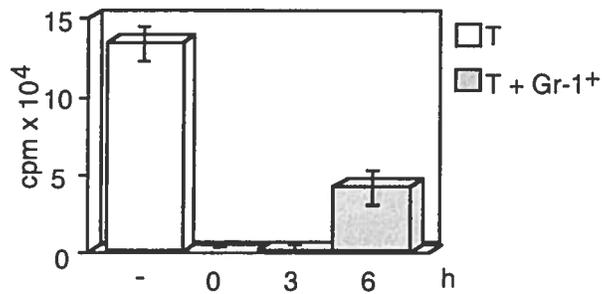
**Figure 4: Involvement of IFN- $\gamma$  and NO secretion in Gr-1<sup>+</sup> immune suppression**

(A) Splenocytes (T and B cell numbers as in Fig. 1) from TC-PTP<sup>-/-</sup> and TC-PTP<sup>+/+</sup> mice were stimulated on mAbs-coated plate with anti-CD3 alone (medium) or in presence of L-NMMA (N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine monoacetate; 0.5 mM), a competitive inhibitor of inducible NO synthase (iNOS), or a neutralizing anti-IFN- $\gamma$  mAb (100  $\mu$ g/ml). The proliferation was measured by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation as described in Fig. 1.

(B) Purified T cells from TC-PTP<sup>+/+</sup> splenocytes were stimulated with anti-CD3 and incubated with Gr-1<sup>+</sup> cells isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> spleen when indicated (+) and were treated as in (A). The proliferation was measured by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation as described in Fig. 1.

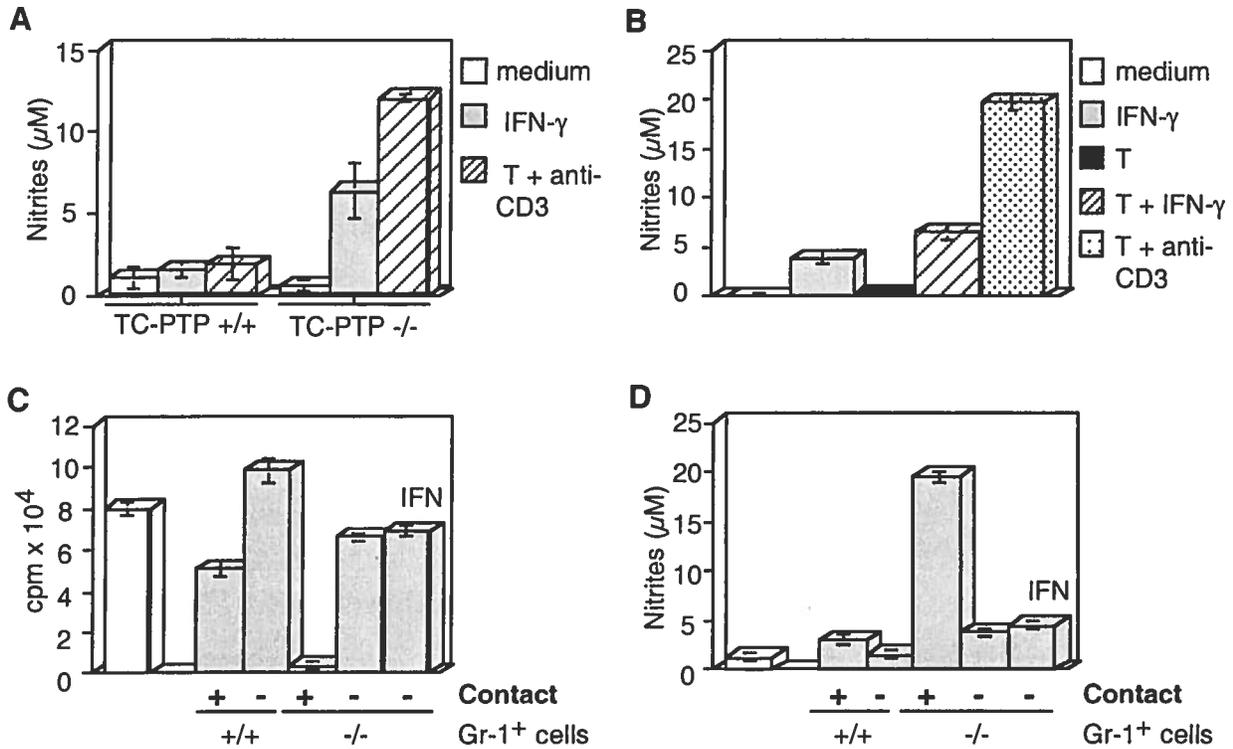
After 42 h, supernatants were harvested and the amount of NO secreted into the culture supernatants was detected using Griess reagent (C and D).

Data are the average of triplicate wells and are representative of three separate experiments.



**Figure 5: Preactivation of T cells prevents the inhibition of their proliferation by Gr-1<sup>+</sup> cells from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice**

Purified T cells ( $2 \times 10^5$ ) from TC-PTP<sup>+/+</sup> mice were stimulated with anti-CD3 alone (T) or in presence of Gr-1<sup>+</sup> cells ( $2 \times 10^5$ ) from TC-PTP<sup>-/-</sup> mice (T + Gr-1<sup>+</sup>) after indicated time of preactivation on mAbs-coated plate with anti-CD3. After 24 h, cells were pulsed with [<sup>3</sup>H]thymidine and harvested 18 h later. Data represent means  $\pm$  SD of triplicate cultures and are representative of two experiments.



**Figure 6: Suppression of T cell proliferation by Gr-1 $^+$  cells purified from TC-PTP $-/-$  splenocytes requires a cell-cell contact**

(A) Purified Gr-1 $^+$  cells ( $1 \times 10^5$ ) from TC-PTP $+/+$  splenocytes or TC-PTP $-/-$  splenocytes were cultured alone (medium), with IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or with  $1 \times 10^5$  CD3-activated T cells isolated from TC-PTP $+/+$  splenocytes (T + anti-CD3). After 18 h, supernatants were harvested and the amount of NO secreted was detected using Griess reagent.

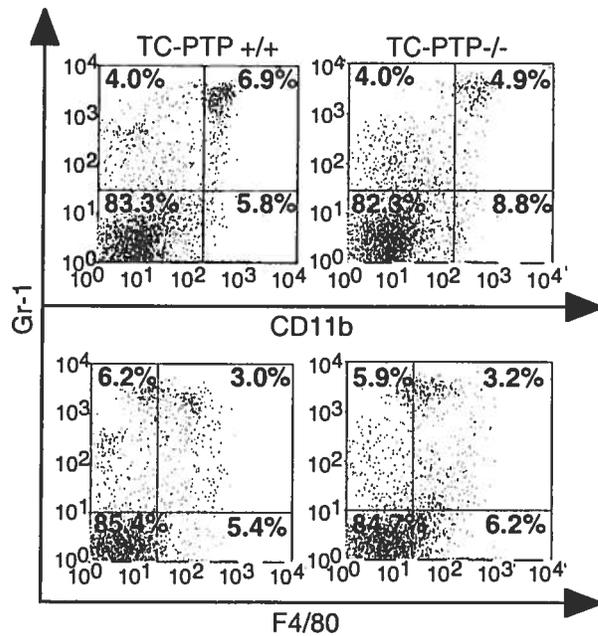
(B) Purified Gr-1 $^+$  cells ( $1 \times 10^5$ ) from TC-PTP $-/-$  mice were cultured alone (medium), with IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), with unstimulated purified T cells from TC-PTP $+/+$  mice (T) or CD3-stimulated purified T cells from TC-PTP $+/+$  mice (T + anti-CD3). After 42 h, supernatants were harvested and the amount of NO secreted was detected using Griess reagent.

(C) Purified T cells ( $5 \times 10^5$ ) from TC-PTP $+/+$  splenocytes (T) were stimulated on mAbs-coated plate with anti-CD3. T cells were cultured alone (open columns) or with Gr-1 $^+$  cells (filled columns) purified from TC-PTP $-/-$  or TC-PTP $+/+$  splenocytes as indicated. Where indicated, T cells were cultured with Gr-1 $^+$  cells in the same well (+) or in separate compartments (-) of a

transwell plate. IFN- $\gamma$  was added in the upper compartment where indicated (IFN). The proliferation was measured by [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation as described in Fig. 1.

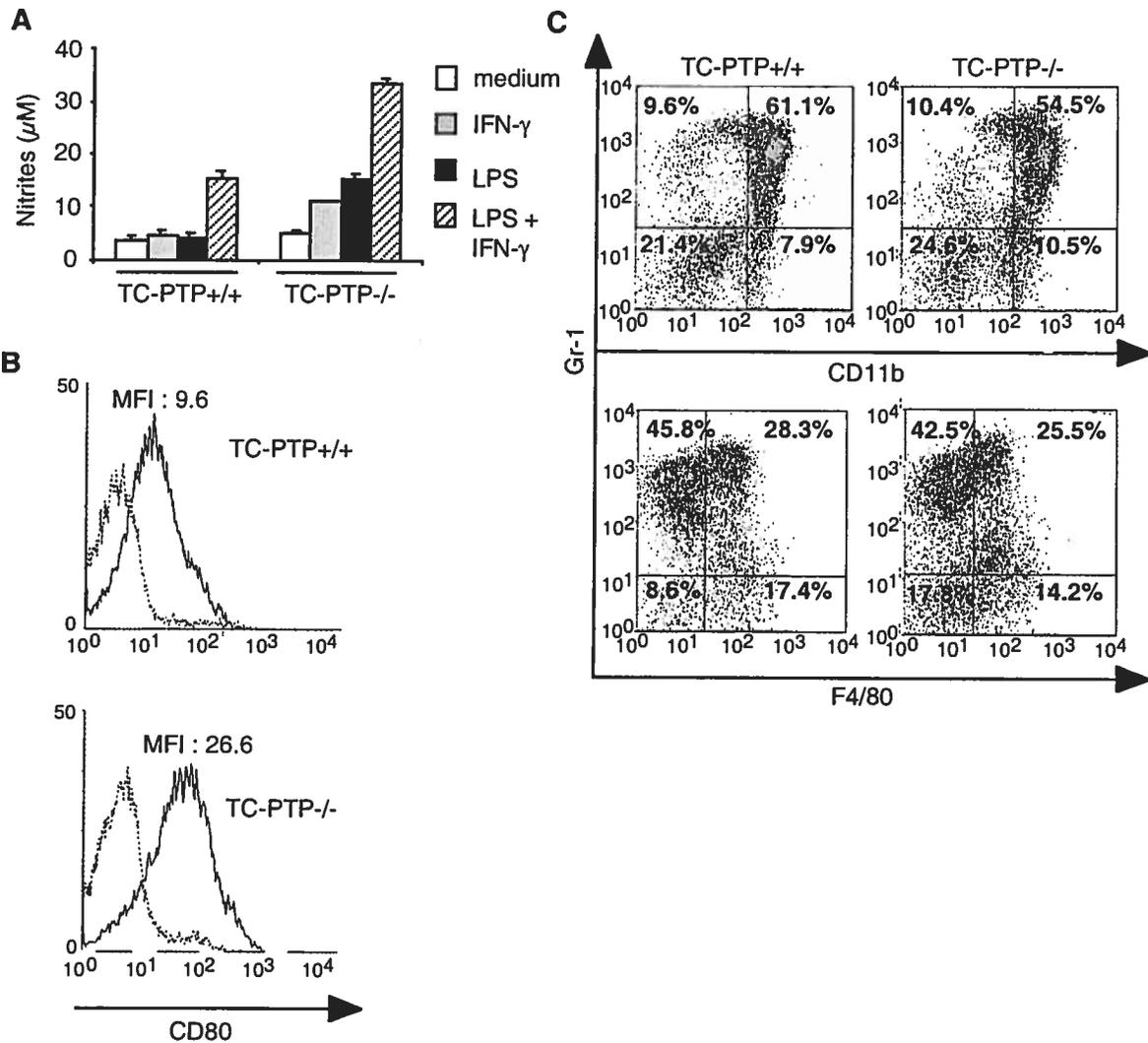
(D) After 42 h, supernatants were harvested and the amount of NO secreted was detected using Griess reagent.

Data were the average of triplicates and were confirmed by one other independently performed experiment.



**Figure 7: Gr-1<sup>+</sup> cells do not accumulate in the spleen of TC-PTP<sup>-/-</sup> mice**

Flow cytometry analysis of the Gr-1<sup>+</sup> cell population from the spleen of TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. Splenocytes were stained with FITC-anti-CD11b and PE-anti-Gr-1 mAbs or FITC-anti-F4/80 and PE-anti-Gr-1 mAbs. In each plot, 10000 events were analyzed. The experiment was repeated five times with similar results.



**Figure 8: Functional and phenotypic characterization of Gr-1<sup>+</sup> cells isolated from TC-PTP<sup>-/-</sup> spleen**

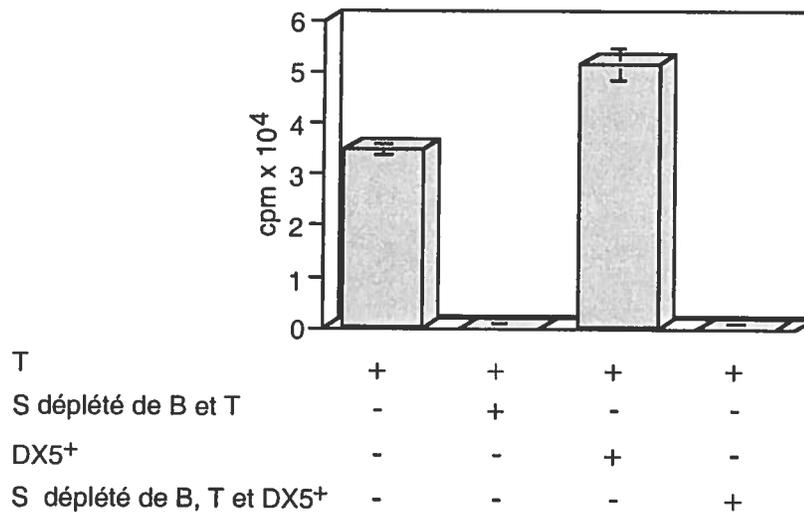
(A) Gr-1<sup>+</sup> cells ( $2 \times 10^5$ ) purified from TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> splenocytes were left unstimulated (-) or were stimulated with 100 U/ml IFN- $\gamma$ , 10  $\mu$ g/ml LPS or IFN- $\gamma$  and LPS as indicated. After 42 h culture, supernatants were harvested and the amount of NO secreted was detected using Griess reagent

(B) Flow cytometry analysis of B7.1 (CD80) expression at the cell surface of TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells. Gr-1<sup>+</sup> cells were stained with PE-anti-B7.1 mAb (thick line). PE-anti-CD8 were used as controls for background staining (dotted line).

(C) Flow cytometry analysis of purified Gr-1<sup>+</sup> cells from spleen of TC-PTP<sup>+/+</sup> and TC-PTP<sup>-/-</sup> mice. Purified Gr-1<sup>+</sup> cells were stained with FITC-anti-CD11b and PE-anti-Gr-1 mAbs or with FITC-anti-F4/80 and PE-anti-Gr-1 mAbs. In each plot, 10000 events were analyzed. The experiment was repeated four times with similar results.

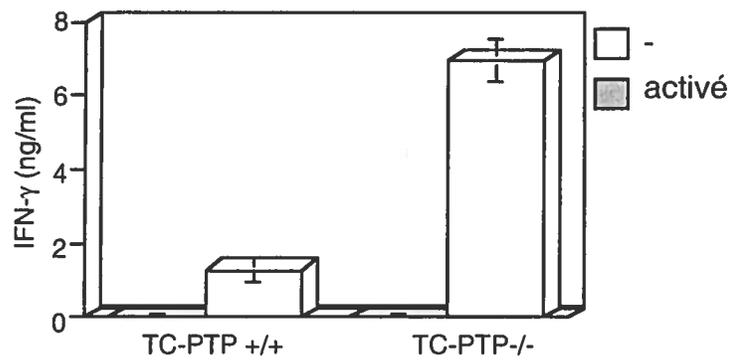
## **RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES**

Les résultats présentés dans l'article démontrent que chez des souris TC-PTP<sup>-/-</sup>, une population cellulaire Gr1<sup>+</sup> dans la rate inhibe la prolifération des lymphocytes B et T par un mécanisme qui est dépendant d'un contact cellule-cellule et de la production de NO par les cellules Gr-1<sup>+</sup>. De plus, notre étude montre que les cellules Gr-1<sup>+</sup> provenant de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> sont hypersensibles aux stimuli tels que le LPS ou l'IFN- $\gamma$ . Les résultats auxquels on se réfère mais qui ne sont pas présentés se trouvent dans cette section.



**Figure 9: Les cellules DX5<sup>+</sup> ne sont pas impliquées dans l'inhibition de la prolifération des cellules par les splénocytes de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>**

Les cellules T ( $1 \times 10^5$ ) de souris TC-PTP<sup>+/+</sup> sont cultivées seules ou en présence de splénocytes (S) provenant de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> qui ont été déplétés de cellules B et T ( $3 \times 10^5$ ), de splénocytes (S) provenant de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> qui ont été déplétés de cellules B, T et DX5<sup>+</sup> ( $3 \times 10^5$ ) ou avec la population DX5<sup>+</sup> purifiées de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> ( $3 \times 10^5$ ). Après 24 h, l'ADN des cellules est marqué avec la [<sup>3</sup>H] thymidine et les cellules sont récoltées 18 h plus tard. Les données représentent les moyennes de culture en triplicata  $\pm$  l'écart-type. Dans cette expérience les splénocytes déplétés de cellules B, T et DX5<sup>+</sup> ont un taux résiduel de ces cellules <5% alors que la fraction cellulaire DX5<sup>+</sup> est enrichie à 30%.



**Figure 10: Les cellules T purifiées de splénocytes TC-PTP-/- produisent plus d'IFN- $\gamma$  que les cellules T purifiées de splénocytes TC-PTP+/+**

Les cellules T ( $2 \times 10^5$ ) sont cultivées en plaque de 96-puits, en présence (activé) ou en absence (-) d'anticorps anti-CD3. Après 24 h les surnageants sont récoltés et la concentration en IFN- $\gamma$  est déterminée en comparant la mesure trouvée avec une courbe standard.

## DISCUSSION

La phosphorylation sur résidus tyrosine joue un rôle central et critique dans la traduction de l'information environnementale en réponse cellulaire. Ce phénomène de phosphorylation est assuré par deux grandes familles de protéines qui ont des rôles contraires, les PTKs et les PTPs. Le maintien des cellules T dans un état de repos est un processus actif qui nécessite un équilibre dynamique entre les PTKs et les PTPs alors que l'activation de la cellule T représente un changement dans cet équilibre. Dans le système immunitaire, la régulation précise et coordonnée de cet équilibre est nécessaire pour une réponse rapide contre les antigènes étrangers alors qu'un débalancement entre les PTKs et les PTPs peut avoir des conséquences pathologiques comme l'auto-immunité et l'immunodéficience. Depuis quelques années, de nombreuses recherches ont apporté de précieuses informations quant à la régulation et aux fonctions attribuées aux PTKs. Quant aux PTPs, les travaux des dernières années prouvent qu'elles jouent des rôles essentiels dans la signalisation cellulaire.

Le but de ce projet de maîtrise était d'étudier le rôle de la phosphatase TC-PTP dans la signalisation cellulaire induite suite à l'activation des lymphocytes T. Ce projet a été initié suite à des études préliminaires démontrant que la prolifération cellulaire des lymphocytes T et B était inhibée quand les splénocytes totaux isolés de souris déficientes pour la TC-PTP (TC-PTP<sup>-/-</sup>) étaient stimulés par la Con A et le LPS respectivement [3]. Ce résultat pouvait laisser présager un rôle positif de la TC-PTP lors de l'activation des lymphocytes. Toutefois, nous avons montré que la purification des lymphocytes permet de rétablir la prolifération de ces derniers. Ce résultat suggère que le défaut de prolifération observé n'est pas dû à une propriété intrinsèque des lymphocytes mais est plutôt dû à la présence d'une population inhibitrice dans les splénocytes. En accord avec cette hypothèse, les lymphocytes T de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> ne semblent pas avoir de défauts dans les événements initiaux de la cascade de signalisation intracellulaire tels que la

phosphorylation sur résidus tyrosine et la mobilisation de calcium intracellulaire. Également, l'absence de prolifération cellulaire des lymphocytes T de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> ne peut pas être attribuée à une absence de production d'IL-2, qui est un facteur de croissance essentiel pour les lymphocytes T, puisque l'ajout de cette cytokine ne permet pas de rétablir la prolifération. Un autre fait important à noter, est que ce défaut de prolifération cellulaire n'est pas lié à un défaut au niveau fonctionnel ou phénotypique des lymphocytes TC-PTP<sup>-/-</sup> puisque la prolifération cellulaire des lymphocytes TC-PTP<sup>+/+</sup> est inhibée de façon similaire par la population inhibitrice présente dans la rate de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>. Il est important de souligner que même si la purification des lymphocytes rétablit la prolifération cellulaire suite à leur activation, il n'en demeure pas moins qu'ils ont un taux de prolifération de 2 à 3 fois plus faible que les lymphocytes purifiés de splénocytes TC-PTP<sup>+/+</sup>. Ce défaut de prolifération des lymphocytes TC-PTP<sup>-/-</sup> est probablement attribuable au rôle positif que joue la TC-PTP dans le cycle cellulaire [5]. À cause de cette dernière considération, les expériences portant sur l'étude du mécanisme d'inhibition ont été réalisées avec les lymphocytes T provenant de souris TC-PTP<sup>+/+</sup> pour s'assurer que l'activité inhibitrice observée est seulement due à la population testée en évitant ainsi d'éventuels effets additionnels dû à l'absence de la TC-PTP dans les lymphocytes TC-PTP<sup>-/-</sup>.

Nous avons donc identifié dans la rate des souris TC-PTP<sup>-/-</sup>, une population cellulaire, les cellules Gr-1<sup>+</sup> qui empêchent la prolifération des lymphocytes. Afin d'établir le mécanisme d'action de l'inhibition observée, nous avons évalué le rôle du NO puisque cette molécule a déjà été reconnue comme étant un inhibiteur de la prolifération lymphocytaire [149, 151-153, 155] et étant produite par les cellules Gr-1<sup>+</sup> dans de nombreux systèmes [6, 7, 9-12, 148]. Pour ce faire, l'effet d'un inhibiteur d'iNOS, le L-NMMA, sur les splénocytes de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> a été testé.

Les résultats permettent de conclure que l'inhibition est attribuable au NO puisque le L-NMMA permet de rétablir complètement la prolifération cellulaire des splénocytes de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>. De plus, il y a une corrélation entre les niveaux de NO retrouvés dans les surnageants et le degré de suppression de prolifération cellulaire observée. Dans les cellules myéloïdes, le NO est produit par une enzyme inductible, la NO synthase (iNOS), suite à la conversion de la L-arginine en L-citrulline. L'ARNm d'iNOS ainsi que la protéine sont induits par une variété de stimuli comme IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 et le LPS dans les macrophages. Dans notre étude, l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules T qui ont été activées suite à une stimulation via le CD3 est requis pour l'obtention de la suppression de la part des cellules Gr-1<sup>+</sup>. En effet, la neutralisation de l'IFN- $\gamma$  avec un anticorps neutralisant, abolit presque complètement l'activité inhibitrice des cellules Gr-1<sup>+</sup> et la sécrétion de forts niveaux de NO.

En plus de l'IFN- $\gamma$ , la production de NO requiert un contact cellule-cellule pour permettre la production de niveaux de NO suffisants pour inhiber la réponse cellulaire des lymphocytes. Ce signal cellulaire est présent seulement à la surface de lymphocytes T activés et non sur les cellules non-activées. Une molécule présente à la surface cellulaire des lymphocytes T activés qui pourrait être un candidat pour fournir ce signal est le CD40L (CD154) (revue dans [181]). Il a été démontré dans différents modèles d'étude que les cellules myéloïdes peuvent produire de grandes quantités de NO suite à une stimulation par l'IFN- $\gamma$  et par la liaison de la molécule CD40 présente à la surface de ces cellules [182, 183]. De plus, il est important de noter qu'une préactivation des lymphocytes T avec un anti-CD3, 6 heures avant la coculture avec les cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>, permet de rétablir en partie la prolifération cellulaire des lymphocytes. Cette dernière observation concorde bien avec le mécanisme d'inhibition attribué au NO puisque la suppression de la prolifération cellulaire par ce dernier semble agir en empêchant les cellules d'entrer dans le cycle cellulaire ou en les arrêtant avant la première

transition, dans la phase G1/S. Ainsi, les lymphocytes T qui ont été préactivés, semblent être dans une phase du cycle cellulaire où le NO n'a plus d'effet. Des expériences additionnelles seront requises pour identifier les molécules impliquées dans l'augmentation de la sécrétion de NO suite à la stimulation des cellules Gr-1<sup>+</sup> par l'IFN- $\gamma$ , caractériser les cibles cellulaires du NO et déterminer les mécanismes effecteurs impliqués lors de l'inhibition.

La population cellulaire inhibitrice Gr-1<sup>+</sup> retrouvée dans la rate est hétérogène et contient des cellules NK, des macrophages et des neutrophiles [184-186]. Il n'y a pas de différences significatives dans le pourcentage et le niveau d'expression des marqueurs Gr-1<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> ou CD11b<sup>+</sup> entre les populations Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>+/+</sup> et TC-PTP<sup>-/-</sup>. La déplétion des cellules exprimant le marqueur de sélection pan-NK, le marqueur DX5, dans la population cellulaire Gr-1<sup>+</sup> ne permet pas d'abolir l'activité inhibitrice. Ce qui permet d'affirmer que l'activité inhibitrice n'est pas reliée à la présence des cellules NK dans la population cellulaire Gr-1<sup>+</sup>. De plus, le traitement des splénocytes de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> avec le LME qui tue sélectivement les cellules avec un fort contenu lysosomal [187], rétablit la prolifération des splénocytes de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>. L'ensemble de ces résultats indiquent que, dans la rate des souris TC-PTP<sup>-/-</sup>, la population cellulaire Gr-1<sup>+</sup> qui inhibe la prolifération des lymphocytes T et B suite à un mécanisme NO- et IFN- $\gamma$ -dépendant correspond probablement à des macrophages. Ces cellules expriment les marqueurs monocyttaire et granulocytaire CD11b et Gr-1 et correspondent probablement aux macrophages suppresseurs décrits dans d'autres systèmes expérimentaux comme les souris injectés avec des superantigènes, souris immunisées avec des vaccins viraux, souris infectées avec des bactéries et parasites, et des souris qui portent des tumeurs [6-12].

Nous nous sommes demandé par la suite pourquoi les cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> n'agissaient pas comme les cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>+/+</sup>. Une des premières hypothèses

qui a été testée est l'absence de production d'un facteur de régulation qui agirait négativement sur l'activation des cellules Gr-1<sup>+</sup>. Un candidat potentiel de ce facteur qui pourrait permettre de désactiver les cellules myéloïdes et/ou de réguler à la baisse la production de NO est le TGF- $\beta$  [159]. Cependant, la coculture de cellules Gr-1<sup>+</sup> provenant de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> avec des splénocytes de souris TC-PTP<sup>+/+</sup> ne permet pas d'enlever l'inhibition de la prolifération cellulaire. La dérégulation des cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> ne peut donc pas être attribuée à l'absence d'un facteur de régulation négative de l'activation.

L'activité inhibitrice qui permet de différencier les cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> de celle des souris TC-PTP<sup>+/+</sup> est plutôt attribuable à une hypersensibilité de ces cellules à certains stimuli. En effet, nos résultats démontrent que les cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> présentent une sensibilité accrue à l'IFN- $\gamma$  et au LPS comparé aux cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>+/+</sup>. Cette différence dans l'état d'activation des cellules est reflétée par une augmentation de l'expression du marqueur membranaire B7.1. Une explication possible pour cet état de préactivation des macrophages est un excès de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T *in vivo* dans la souris TC-PTP<sup>-/-</sup>. Nos données expérimentales sont en accord avec cette hypothèse puisque la stimulation avec un anticorps anti-CD3 des cellules T de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> produisent des quantités d'IFN- $\gamma$  beaucoup plus importante que celles produites par des cellules T de souris TC-PTP<sup>+/+</sup>. Alternativement, mais non exclusivement, le développement altéré de ces cellules dans la moëlle osseuse de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> peut mener à la différenciation de ces cellules myéloïdes suppressives. Le défaut des cellules stromales de la moëlle osseuse de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> pourrait être responsable du développement anormal de ces cellules myéloïdes [3].

D'autres études permettent également d'apporter des éléments de réponse quant à l'hypersensibilité des cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> suite à une stimulation par l'IFN- $\gamma$ .

Comme mentionné précédemment, la liaison de l'IFN- $\gamma$  à son récepteur, induit l'activation des tyrosine kinases Jak1 et de Jak2. Comme décrit dans la Figure E, l'activation de Jak1/2 va déclencher une série d'évènements aboutissant à la phosphorylation et la translocation de Stat1 au noyau et sa liaison à des séquences cibles pour permettre la transcription de certains gènes comme iNOS (revue dans [188]). La protéine Stat1 est par la suite déphosphorylée et retourne au niveau du cytoplasme, [136]. Une étude récente identifie la TC-PTP comme la tyrosine phosphatase qui va permettre la déphosphorylation dans le noyau de Stat1 [143]. Ainsi, en absence de la TC-PTP dans les cellules Gr-1<sup>+</sup>, la déphosphorylation de Stat1 n'aurait pas lieu. La sensibilité accrue des cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> suite à leur stimulation par l'IFN- $\gamma$  pourrait donc en partie s'expliquer par une absence de régulation négative de la réponse induite par l'IFN- $\gamma$  au niveau de Stat1.

L'implication de la TC-PTP à un autre niveau lors de la signalisation induite en réponse à l'IFN- $\gamma$  permettrait d'expliquer également l'hypersensibilité des cellules Gr-1<sup>+</sup> de souris TC-PTP<sup>-/-</sup>. La TC-PTP a été montrée récemment comme étant un régulateur négatif de Jak1 et Jak3 [4]. Ainsi, dans les macrophages TC-PTP<sup>-/-</sup>, la réponse à l'IFN- $\gamma$  qui est régulée par Jak1 et Jak2 devrait être augmentée. L'hyperphosphorylation de Jak1 observée ainsi qu'une expression élevée d'iNOS dans les BMDMs traités avec de l'IFN- $\gamma$  sont en accord avec cette hypothèse [4]. La réponse au LPS est aussi augmentée dans les macrophages de souris TC-PTP<sup>-/-</sup> comparé aux macrophages TC-PTP<sup>+/+</sup>. Puisque la réponse au LPS passe en partie par l'activation de Stat1 suite à l'activation de Tyk-2 [189], il est tentant d'envisager que Tyk-2 pourrait être aussi un substrat de la TC-PTP.

En conclusion, nos résultats indiquent que la TC-PTP est impliquée dans la fonction et/ou la régulation du développement des macrophages. De plus, la TC-PTP semble jouer un rôle dans les lymphocytes puisque, comme montré dans les fibroblastes, la TC-PTP contrôle la vitesse de

prolifération de ces cellules. D'autres recherches sont requises pour déterminer précisément les bases moléculaires de la contribution de la TC-PTP dans la régulation des cellules myéloïdes et des lymphocytes.

## **LISTE DES RÉFÉRENCES**

1. Li, L., et J. E. Dixon. 2000. "Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases". Semin Immunol, Vol. 12, p.75-84.
2. Ibarra-Sanchez, M. J., P. D. Simoncic, F. R. Nestel, P. Duplay, W. S. Lapp, et M. L. Tremblay. 2000. "The T-cell protein tyrosine phosphatase". Semin Immunol, Vol. 12, p.379-386.
3. You-Ten, K. E., E. S. Muise, A. Itie, E. Michaliszyn, J. Wagner, S. Jothy, W. S. Lapp, et M. L. Tremblay. 1997. "Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice". J Exp Med, Vol. 186, p.683-693.
4. Simoncic, P. D., A. Lee-Loy, D. L. Barber, M. L. Tremblay, et C. J. McGlade. 2002. "The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3". Curr Biol, Vol. 12, p.446-453.
5. Ibarra-Sanchez, M. J., J. Wagner, M. T. Ong, C. Lampron, et M. L. Tremblay. 2001. "Murine embryonic fibroblasts lacking TC-PTP display delayed G1 phase through defective NF-kappaB activation". Oncogene, Vol. 20, p.4728-4739.
6. al-Ramadi, B. K., M. A. Brodtkin, D. M. Mosser, et T. K. Eisenstein. 1991. "Immunosuppression induced by attenuated Salmonella. Evidence for mediation by macrophage precursors". J Immunol, Vol. 146, p.2737-2746.
7. Bobe, P., K. Benihoud, D. Grandjon, P. Opolon, L. L. Pritchard, et R. Huchet. 1999. "Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction". Blood, Vol. 94, p.1028-1037.
8. Bronte, V., E. Apolloni, A. Cabrelle, R. Ronca, P. Serafini, P. Zamboni, N. P. Restifo, et P. Zanovello. 2000. "Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells". Blood, Vol. 96, p.3838-3846.
9. Cauley, L. S., E. E. Miller, M. Yen, et S. L. Swain. 2000. "Superantigen-induced CD4 T cell tolerance mediated by myeloid cells and IFN-gamma". J Immunol, Vol. 165, p.6056-6066.

10. Dasgupta, S., A. Mookerjee, S. K. Chowdhury, et A. C. Ghose. 1999. "Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis: an evaluation of the role of nitric oxide toward impairment of the lymphoproliferative response". Parasitol Res, Vol. 85, p.594-596.
11. Schleifer, K. W., et J. M. Mansfield. 1993. "Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins". J Immunol, Vol. 151, p.5492-5503.
12. Young, M. R., M. A. Wright, J. P. Matthews, I. Malik, et M. Prechel. 1996. "Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte- macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide". J Immunol, Vol. 156, p.1916-1922.
13. MacMicking, J., Q. W. Xie, et C. Nathan. 1997. "Nitric oxide and macrophage function". Annu Rev Immunol, Vol. 15, p.323-350.
14. Cox, G. W., G. Melillo, U. Chattopadhyay, D. Mullet, R. H. Fertel, et L. Varesio. 1992. "Tumor necrosis factor-alpha-dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN-gamma plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity". J Immunol, Vol. 149, p.3290-3296.
15. Deng, W., B. Thiel, C. S. Tannenbaum, T. A. Hamilton, et D. J. Stuehr. 1993. "Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages". J Immunol, Vol. 151, p.322-329.
16. Nathan, C., et Q. W. Xie. 1994. "Regulation of biosynthesis of nitric oxide". J Biol Chem, Vol. 269, p.13725-13728.
17. Xie, Q., et C. Nathan. 1994. "The high-output nitric oxide pathway: role and regulation". J Leukoc Biol, Vol. 56, p.576-582.
18. Sprent, J., et M. Schaefer. 1989. "Antigen-presenting cells for unprimed T cells". Immunol Today, Vol. 10, p.17-23.

19. Chambers, C. A., et J. P. Allison. 1999. "Costimulatory regulation of T cell function". Curr Opin Cell Biol, Vol. 11, p.203-210.
20. Lenardo, M., K. M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang, et L. Zheng. 1999. "Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment". Annu Rev Immunol, Vol. 17, p.221-253.
21. Kane, L. P., J. Lin, et A. Weiss. 2000. "Signal transduction by the TCR for antigen". Curr Opin Immunol, Vol. 12, p.242-249.
22. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, et J. B. Bolen. 1988. "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck". Cell, Vol. 55, p.301-308.
23. Chan, A. C., M. Iwashima, C. W. Turck, et A. Weiss. 1992. "ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain". Cell, Vol. 71, p.649-662.
24. Chu, D. H., C. T. Morita, et A. Weiss. 1998. "The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development". Immunol Rev, Vol. 165, p.167-180.
25. Iwashima, M., B. A. Irving, N. S. van Oers, A. C. Chan, et A. Weiss. 1994. "Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases". Science, Vol. 263, p.1136-1139.
26. Chan, A. C., M. Dalton, R. Johnson, G. H. Kong, T. Wang, R. Thoma, et T. Kurosaki. 1995. "Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function". Embo J, Vol. 14, p.2499-2508.
27. Mege, D., V. Di Bartolo, V. Germain, L. Tuosto, F. Michel, et O. Acuto. 1996. "Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways". J Biol Chem, Vol. 271, p.32644-32652.
28. Qian, D., M. N. Mollenauer, et A. Weiss. 1996. "Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling". J Exp Med, Vol. 183, p.611-620.

29. Wong, J., D. Straus, et A. C. Chan. 1998. "Genetic evidence of a role for Lck in T-cell receptor function independent or downstream of ZAP-70/Syk protein tyrosine kinases". Mol Cell Biol, Vol. 18, p.2855-2866.
30. Hsi, E. D., J. N. Siegel, Y. Minami, E. T. Luong, R. D. Klausner, et L. E. Samelson. 1989. "T cell activation induces rapid tyrosine phosphorylation of a limited number of cellular substrates". J Biol Chem, Vol. 264, p.10836-10842.
31. Secrist, J. P., L. Karnitz, et R. T. Abraham. 1991. "T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1". J Biol Chem, Vol. 266, p.12135-12139.
32. Janes, P. W., S. C. Ley, A. I. Magee, et P. S. Kabouridis. 2000. "The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling". Semin Immunol, Vol. 12, p.23-34.
33. Mustelin, T., et P. Burn. 1993. "Regulation of src family tyrosine kinases in lymphocytes". Trends Biochem Sci, Vol. 18, p.215-220.
34. Vogel, W., R. Lammers, J. Huang, et A. Ullrich. 1993. "Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation". Science, Vol. 259, p.1611-1614.
35. Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliareisis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler, et R. Parsons. 1997. "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer". Science, Vol. 275, p.1943-1947.
36. Tonks, N. K., et B. G. Neel. 2001. "Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases". Curr Opin Cell Biol, Vol. 13, p.182-195.
37. Flint, A. J., T. Tiganis, D. Barford, et N. K. Tonks. 1997. "Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 94, p.1680-1685.

38. Garton, A. J., A. J. Flint, et N. K. Tonks. 1996. "Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST". Mol Cell Biol, Vol. 16, p.6408-6418.
39. Alexander, D. R. 2000. "The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function". Semin Immunol, Vol. 12, p.349-359.
40. Thomas, M. L., et E. J. Brown. 1999. "Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45". Immunol Today, Vol. 20, p.406-411.
41. Koretzky, G. A., J. Picus, T. Schultz, et A. Weiss. 1991. "Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 88, p.2037-2041.
42. Tchilian, E. Z., D. L. Wallace, R. S. Wells, D. R. Flower, G. Morgan, et P. C. Beverley. 2001. "A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID". J Immunol, Vol. 166, p.1308-1313.
43. Byth, K. F., L. A. Conroy, S. Howlett, A. J. Smith, J. May, D. R. Alexander, et N. Holmes. 1996. "CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation". J Exp Med, Vol. 183, p.1707-1718.
44. Kishihara, K., J. Penninger, V. A. Wallace, T. M. Kundig, K. Kawai, A. Wakeham, E. Timms, K. Pfeffer, P. S. Ohashi, M. L. Thomas, et et al. 1993. "Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45- exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice". Cell, Vol. 74, p.143-156.
45. Mustelin, T., S. Williams, P. Taylor, C. Couture, G. Zenner, P. Burn, J. D. Ashwell, et A. Altman. 1995. "Regulation of the p70zap tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase". Eur J Immunol, Vol. 25, p.942-946.

46. Furukawa, T., M. Itoh, N. X. Krueger, M. Streuli, et H. Saito. 1994. "Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3 zeta chain". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 91, p.10928-10932.
47. Cooper, J. A., et A. MacAuley. 1988. "Potential positive and negative autoregulation of p60c-src by intermolecular autophosphorylation". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 85, p.4232-4236.
48. Chan, A. C., D. M. Desai, et A. Weiss. 1994. "The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction". Annu Rev Immunol, Vol. 12, p.555-592.
49. Trowbridge, I. S., et M. L. Thomas. 1994. "CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development". Annu Rev Immunol, Vol. 12, p.85-116.
50. Chow, L. M., M. Fournel, D. Davidson, et A. Veillette. 1993. "Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk". Nature, Vol. 365, p.156-160.
51. D'Oro, U., et J. D. Ashwell. 1999. "Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes". J Immunol, Vol. 162, p.1879-1883.
52. Irie-Sasaki, J., T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C. D. Richardson, K. Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D. M. Rothstein, et J. M. Penninger. 2001. "CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling". Nature, Vol. 409, p.349-354.
53. Leonard, W. J., et J. J. O'Shea. 1998. "Jaks and STATs: biological implications". Annu Rev Immunol, Vol. 16, p.293-322.
54. Serra-Pages, C., N. L. Kedersha, L. Fazikas, Q. Medley, A. Debant, et M. Streuli. 1995. "The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions". Embo J, Vol. 14, p.2827-2838.

55. Skarnes, W. C., J. E. Moss, S. M. Hurtley, et R. S. Beddington. 1995. "Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 92, p.6592-6596.
56. den Hertog, J., S. Tracy, et T. Hunter. 1994. "Phosphorylation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha on Tyr789, a binding site for the SH3-SH2-SH3 adaptor protein GRB-2 in vivo". Embo J, Vol. 13, p.3020-3032.
57. Su, J., A. Batzer, et J. Sap. 1994. "Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-alpha is tyrosine-phosphorylated and associated with the adaptor protein Grb2". J Biol Chem, Vol. 269, p.18731-18734.
58. Zheng, X. M., R. J. Resnick, et D. Shalloway. 2000. "A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha". Embo J, Vol. 19, p.964-978.
59. Zheng, X. M., Y. Wang, et C. J. Pallen. 1992. "Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase". Nature, Vol. 359, p.336-339.
60. Ponniah, S., D. Z. Wang, K. L. Lim, et C. J. Pallen. 1999. "Targeted disruption of the tyrosine phosphatase PTPalpha leads to constitutive downregulation of the kinases Src and Fyn". Curr Biol, Vol. 9, p.535-538.
61. Su, J., M. Muranjan, et J. Sap. 1999. "Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts". Curr Biol, Vol. 9, p.505-511.
62. Mustelin, T., J. Brockdorff, A. Gyorloff-Wingren, P. Taylor, S. Han, X. Wang, et M. Saxena. 1998. "Lymphocyte activation: the coming of the protein tyrosine phosphatases". Front Biosci, Vol. 3, p.D1060-1096.
63. Bignon, J. S., et K. A. Siminovitch. 1994. "Identification of PTP1C mutation as the genetic defect in motheaten and viable motheaten mice: a step toward defining the roles of

protein tyrosine phosphatases in the regulation of hemopoietic cell differentiation and function". Clin Immunol Immunopathol, Vol. 73, p.168-179.

64. Feng, G. S., et T. Pawson. 1994. "Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction". Trends Genet, Vol. 10, p.54-58.

65. Neel, B. G. 1993. "Structure and function of SH2-domain containing tyrosine phosphatases". Semin Cell Biol, Vol. 4, p.419-432.

66. Moran, M. F., C. A. Koch, D. Anderson, C. Ellis, L. England, G. S. Martin, et T. Pawson. 1990. "Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 87, p.8622-8626.

67. Pawson, T. 1995. "Protein modules and signalling networks". Nature, Vol. 373, p.573-580.

68. Lorenz, U., K. S. Ravichandran, D. Pei, C. T. Walsh, S. J. Burakoff, et B. G. Neel. 1994. "Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells". Mol Cell Biol, Vol. 14, p.1824-1834.

69. Tsui, H. W., K. A. Siminovitch, L. de Souza, et F. W. Tsui. 1993. "Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene". Nat Genet, Vol. 4, p.124-129.

70. Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, T. V. Rajan, T. Yi, J. N. Ihle, R. J. Matthews, M. L. Thomas, et D. R. Beier. 1993. "Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene". Cell, Vol. 73, p.1445-1454.

71. Green, M. C., et L. D. Shultz. 1975. "Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology". J Hered, Vol. 66, p.250-258.

72. 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, Vol. 116, p.936-943.

73. Sidman, C. L., L. D. Shultz, et E. R. Unanue. 1978. "The mouse mutant "motheaten." II. Functional studies of the immune system". J Immunol, Vol. 121, p.2399-2404.
74. Pani, G., K. D. Fischer, I. Mlinaric-Rascan, et K. A. Siminovitch. 1996. "Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase". J Exp Med, Vol. 184, p.839-852.
75. Zhang, J., A. K. Somani, D. Yuen, Y. Yang, P. E. Love, et K. A. Siminovitch. 1999. "Involvement of the SHP-1 tyrosine phosphatase in regulation of T cell selection". J Immunol, Vol. 163, p.3012-3021.
76. Lorenz, U., K. S. Ravichandran, S. J. Burakoff, et B. G. Neel. 1996. "Lack of SHPTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 93, p.9624-9629.
77. Perez-Villar, J. J., G. S. Whitney, M. A. Bowen, D. H. Hewgill, A. A. Aruffo, et S. B. Kanner. 1999. "CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1". Mol Cell Biol, Vol. 19, p.2903-2912.
78. Tarakhovsky, A., S. B. Kanner, J. Hombach, J. A. Ledbetter, W. Muller, N. Killeen, et K. Rajewsky. 1995. "A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection". Science, Vol. 269, p.535-537.
79. Plas, D. R., R. Johnson, J. T. Pingel, R. J. Matthews, M. Dalton, G. Roy, A. C. Chan, et M. L. Thomas. 1996. "Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling". Science, Vol. 272, p.1173-1176.
80. Cuevas, B., Y. Lu, S. Watt, R. Kumar, J. Zhang, K. A. Siminovitch, et G. B. Mills. 1999. "SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity". J Biol Chem, Vol. 274, p.27583-27589.

81. Auger, K. R., et L. C. Cantley. 1991. "Novel polyphosphoinositides in cell growth and activation". Cancer Cells, Vol. 3, p.263-270.
82. Kon-Kozlowski, M., G. Pani, T. Pawson, et K. A. Siminovitch. 1996. "The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells". J Biol Chem, Vol. 271, p.3856-3862.
83. Clements, J. L., B. Yang, S. E. Ross-Barta, S. L. Eliason, R. F. Hrstka, R. A. Williamson, et G. A. Koretzky. 1998. "Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development". Science, Vol. 281, p.416-419.
84. Crespo, P., K. E. Schuebel, A. A. Ostrom, J. S. Gutkind, et X. R. Bustelo. 1997. "Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product". Nature, Vol. 385, p.169-172.
85. Tuosto, L., F. Michel, et O. Acuto. 1996. "p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen- stimulated T cells". J Exp Med, Vol. 184, p.1161-1166.
86. Clements, J. L., N. J. Boerth, J. R. Lee, et G. A. Koretzky. 1999. "Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins". Annu Rev Immunol, Vol. 17, p.89-108.
87. Rudd, C. E. 1999. "Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling". Cell, Vol. 96, p.5-8.
88. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, et L. E. Samelson. 1998. "LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation". Cell, Vol. 92, p.83-92.
89. Buday, L., et J. Downward. 1993. "Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor". Cell, Vol. 73, p.611-620.

90. Migone, T. S., N. A. Cacalano, N. Taylor, T. Yi, T. A. Waldmann, et J. A. Johnston. 1998. "Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 95, p.3845-3850.
91. Qu, C. K. 2000. "The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions". Cell Res, Vol. 10, p.279-288.
92. Bennett, A. M., T. L. Tang, S. Sugimoto, C. T. Walsh, et B. G. Neel. 1994. "Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 91, p.7335-7339.
93. Li, W., R. Nishimura, A. Kashishian, A. G. Batzer, W. J. Kim, J. A. Cooper, et J. Schlessinger. 1994. "A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase". Mol Cell Biol, Vol. 14, p.509-517.
94. You, M., D. H. Yu, et G. S. Feng. 1999. "Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway". Mol Cell Biol, Vol. 19, p.2416-2424.
95. Marengere, L. E., P. Waterhouse, G. S. Duncan, H. W. Mittrucker, G. S. Feng, et T. W. Mak. 1996. "Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4". Science, Vol. 272, p.1170-1173.
96. Lee, K. M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattri, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson, et J. A. Bluestone. 1998. "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4". Science, Vol. 282, p.2263-2266.
97. Feng, G. S. 1999. "Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many". Exp Cell Res, Vol. 253, p.47-54.
98. Sato, T., S. Irie, S. Kitada, et J. C. Reed. 1995. "FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas". Science, Vol. 268, p.411-415.

99. Matthews, R. J., D. B. Bowne, E. Flores, et M. L. Thomas. 1992. "Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine- rich sequences". Mol Cell Biol, Vol. 12, p.2396-2405.
100. Cloutier, J. F., et A. Veillette. 1996. "Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells". Embo J, Vol. 15, p.4909-4918.
101. Cloutier, J. F., et A. Veillette. 1999. "Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase". J Exp Med, Vol. 189, p.111-121.
102. Gjorloff-Wingren, A., M. Saxena, S. Williams, D. Hammi, et T. Mustelin. 1999. "Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP". Eur J Immunol, Vol. 29, p.3845-3854.
103. Cohen, S., H. Dadi, E. Shaoul, N. Sharfe, et C. M. Roifman. 1999. "Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp". Blood, Vol. 93, p.2013-2024.
104. Davidson, D., et A. Veillette. 2001. "PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates". Embo J, Vol. 20, p.3414-3426.
105. Zanke, B., H. Suzuki, K. Kishihara, L. Mizzen, M. Minden, A. Pawson, et T. W. Mak. 1992. "Cloning and expression of an inducible lymphoid-specific, protein tyrosine phosphatase (HePTPase)". Eur J Immunol, Vol. 22, p.235-239.
106. Saxena, M., S. Williams, J. Brockdorff, J. Gilman, et T. Mustelin. 1999. "Inhibition of T cell signaling by mitogen-activated protein kinase- targeted hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP)". J Biol Chem, Vol. 274, p.11693-11700.

107. Stambolic, V., A. Suzuki, J. L. de la Pompa, G. M. Brothers, C. Mirtsos, T. Sasaki, J. Ruland, J. M. Penninger, D. P. Siderovski, et T. W. Mak. 1998. "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN". Cell, Vol. 95, p.29-39.
108. Myers, M. P., J. P. Stolarov, C. Eng, J. Li, S. I. Wang, M. H. Wigler, R. Parsons, et N. K. Tonks. 1997. "P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 94, p.9052-9057.
109. Maehama, T., et J. E. Dixon. 1998. "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate". J Biol Chem, Vol. 273, p.13375-13378.
110. Myers, M. P., I. Pass, I. H. Batty, J. Van der Kaay, J. P. Stolarov, B. A. Hemmings, M. H. Wigler, C. P. Downes, et N. K. Tonks. 1998. "The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 95, p.13513-13518.
111. Furnari, F. B., H. Lin, H. S. Huang, et W. K. Cavenee. 1997. "Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 94, p.12479-12484.
112. Wang, X., A. Gyorloff-Wingren, M. Saxena, N. Pathan, J. C. Reed, et T. Mustelin. 2000. "The tumor suppressor PTEN regulates T cell survival and antigen receptor signaling by acting as a phosphatidylinositol 3-phosphatase". J Immunol, Vol. 164, p.1934-1939.
113. Burgering, B. M., et P. J. Coffey. 1995. "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction". Nature, Vol. 376, p.599-602.
114. Franke, T. F., S. I. Yang, T. O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D. K. Morrison, D. R. Kaplan, et P. N. Tsichlis. 1995. "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase". Cell, Vol. 81, p.727-736.

115. Cantley, L. C., et B. G. Neel. 1999. "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 96, p.4240-4245.
116. Von Willebrand, M., T. Jascur, N. Bonnefoy-Berard, H. Yano, A. Altman, Y. Matsuda, et T. Mustelin. 1996. "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase blocks T cell antigen receptor/CD3-induced activation of the mitogen-activated kinase Erk2". Eur J Biochem, Vol. 235, p.828-835.
117. Cool, D. E., N. K. Tonks, H. Charbonneau, K. A. Walsh, E. H. Fischer, et E. G. Krebs. 1989. "cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 86, p.5257-5261.
118. Mosinger, B., Jr., U. Tillmann, H. Westphal, et M. L. Tremblay. 1992. "Cloning and characterization of a mouse cDNA encoding a cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 89, p.499-503.
119. Kamatkar, S., V. Radha, S. Nambirajan, R. S. Reddy, et G. Swarup. 1996. "Two splice variants of a tyrosine phosphatase differ in substrate specificity, DNA binding, and subcellular location". J Biol Chem, Vol. 271, p.26755-26761.
120. Lorenzen, J. A., C. Y. Dadabay, et E. H. Fischer. 1995. "COOH-terminal sequence motifs target the T cell protein tyrosine phosphatase to the ER and nucleus". J Cell Biol, Vol. 131, p.631-643.
121. Faure, R., et B. I. Posner. 1993. "Differential intracellular compartmentalization of phosphotyrosine phosphatases in a glial cell line: TC-PTP versus PTP-1B". Glia, Vol. 9, p.311-314.
122. Tiganis, T., A. M. Bennett, K. S. Ravichandran, et N. K. Tonks. 1998. "Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase". Mol Cell Biol, Vol. 18, p.1622-1634.

123. Cohen, G. B., R. Ren, et D. Baltimore. 1995. "Modular binding domains in signal transduction proteins". Cell, Vol. 80, p.237-248.
124. Tiganis, T., B. E. Kemp, et N. K. Tonks. 1999. "The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling". J Biol Chem, Vol. 274, p.27768-27775.
125. Lam, M. H., B. J. Michell, M. T. Fodero-Tavoletti, B. E. Kemp, N. K. Tonks, et T. Tiganis. 2001. "Cellular stress regulates the nucleocytoplasmic distribution of the protein-tyrosine phosphatase TCPTP". J Biol Chem, Vol. 276, p.37700-37707.
126. Klingler-Hoffmann, M., M. T. Fodero-Tavoletti, K. Mishima, Y. Narita, W. K. Cavenee, F. B. Furnari, H. J. Huang, et T. Tiganis. 2001. "The protein tyrosine phosphatase TCPTP suppresses the tumorigenicity of glioblastoma cells expressing a mutant epidermal growth factor receptor". J Biol Chem, Vol. 276, p.46313-46318.
127. Holland, E. C. 2001. "Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models". Nat Rev Genet, Vol. 2, p.120-129.
128. Sherr, C. J. 1996. "Cancer cell cycles". Science, Vol. 274, p.1672-1677.
129. Sherr, C. J., et J. M. Roberts. 1999. "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression". Genes Dev, Vol. 13, p.1501-1512.
130. Vidal, A., et A. Koff. 2000. "Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause". Gene, Vol. 247, p.1-15.
131. Hsiao, K. M., S. L. McMahon, et P. J. Farnham. 1994. "Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F1 promoter". Genes Dev, Vol. 8, p.1526-1537.
132. Fagan, R., K. J. Flint, et N. Jones. 1994. "Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein". Cell, Vol. 78, p.799-811.

133. Hengst, L., et S. I. Reed. 1996. "Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle". Science, Vol. 271, p.1861-1864.
134. Darnell, J. E., Jr. 1997. "STATs and gene regulation". Science, Vol. 277, p.1630-1635.
135. Haspel, R. L., M. Salditt-Georgieff, et J. E. Darnell, Jr. 1996. "The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase". Embo J, Vol. 15, p.6262-6268.
136. Haspel, R. L., et J. E. Darnell, Jr. 1999. "A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1". Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 96, p.10188-10193.
137. Hilton, D. J. 1999. "Negative regulators of cytokine signal transduction". Cell Mol Life Sci, Vol. 55, p.1568-1577.
138. Myers, M. P., J. N. Andersen, A. Cheng, M. L. Tremblay, C. M. Horvath, J. P. Parisien, A. Salmeen, D. Barford, et N. K. Tonks. 2001. "TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B". J Biol Chem, Vol. 276, p.47771-47774.
139. Ward, A. C., I. Touw, et A. Yoshimura. 2000. "The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis". Blood, Vol. 95, p.19-29.
140. Aoki, N., et T. Matsuda. 2000. "A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated STAT5a and STAT5b". J Biol Chem, Vol. 275, p.39718-39726.
141. Yu, C. L., Y. J. Jin, et S. J. Burakoff. 2000. "Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation". J Biol Chem, Vol. 275, p.599-604.
142. Shuai, K. 2000. "Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins". Oncogene, Vol. 19, p.2638-2644.
143. ten Hoeve, J., M. de Jesus Ibarra-Sanchez, Y. Fu, W. Zhu, M. Tremblay, M. David, et K. Shuai. 2002. "Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase". Mol Cell Biol, Vol. 22, p.5662-5668.

144. Wen, Z., Z. Zhong, et J. E. Darnell, Jr. 1995. "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation". Cell, Vol. 82, p.241-250.
145. Zhu, W., T. Mustelin, et M. David. 2002. "Arginine methylation of STAT1 regulates its dephosphorylation by T cell protein tyrosine phosphatase". J Biol Chem, Vol. 277, p.35787-35790.
146. Aoki, N., et T. Matsuda. 2002. "A nuclear protein tyrosine phosphatase TC-PTP is a potential negative regulator of the PRL-mediated signaling pathway: dephosphorylation and deactivation of signal transducer and activator of transcription 5a and 5b by TC-PTP in nucleus". Mol Endocrinol, Vol. 16, p.58-69.
147. Saxena, M., S. Williams, J. Gilman, et T. Mustelin. 1998. "Negative regulation of T cell antigen receptor signal transduction by hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP)". J Biol Chem, Vol. 273, p.15340-15344.
148. Bronte, V., M. Wang, W. W. Overwijk, D. R. Surman, F. Pericle, S. A. Rosenberg, et N. P. Restifo. 1998. "Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells". J Immunol, Vol. 161, p.5313-5320.
149. Albina, J. E., J. A. Abate, et W. L. Henry, Jr. 1991. "Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway". J Immunol, Vol. 147, p.144-148.
150. Albina, J. E., et W. L. Henry, Jr. 1991. "Suppression of lymphocyte proliferation through the nitric oxide synthesizing pathway". J Surg Res, Vol. 50, p.403-409.
151. Allione, A., P. Bernabei, M. Bosticardo, S. Ariotti, G. Forni, et F. Novelli. 1999. "Nitric oxide suppresses human T lymphocyte proliferation through IFN- gamma-dependent and IFN-gamma-independent induction of apoptosis". J Immunol, Vol. 163, p.4182-4191.

152. Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt, et U. R. Kees. 1998. "Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway". J Immunol, Vol. 160, p.5729-5734.
153. Krenger, W., G. Falzarano, J. Delmonte, Jr., K. M. Snyder, J. C. Byon, et J. L. Ferrara. 1996. "Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease". Blood, Vol. 88, p.1113-1121.
154. O'Connor, R. A., J. S. Jenson, et E. Devaney. 2000. "NO contributes to proliferative suppression in a murine model of filariasis". Infect Immun, Vol. 68, p.6101-6107.
155. van der Veen, R. C., T. A. Dietlin, L. Pen, et J. D. Gray. 1999. "Nitric oxide inhibits the proliferation of T-helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion". Cell Immunol, Vol. 193, p.194-201.
156. van der Veen, R. C., T. A. Dietlin, J. Dixon Gray, et W. Gilmore. 2000. "Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells". Cell Immunol, Vol. 199, p.43-49.
157. Ishida, A., T. Sasaguri, C. Kosaka, H. Nojima, et J. Ogata. 1997. "Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells". J Biol Chem, Vol. 272, p.10050-10057.
158. Schmidt, H. H., et U. Walter. 1994. "NO at work". Cell, Vol. 78, p.919-925.
159. Ding, A., C. F. Nathan, J. Graycar, R. Derynck, D. J. Stuehr, et S. Srinivasan. 1990. "Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 - beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma". J Immunol, Vol. 145, p.940-944.
160. Liew, F. Y., Y. Li, A. Severn, S. Millott, J. Schmidt, M. Salter, et S. Moncada. 1991. "A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity

via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages". Eur J Immunol, Vol. 21, p.2489-2494.

161. Bogdan, C., Y. Vodovotz, et C. Nathan. 1991. "Macrophage deactivation by interleukin 10". J Exp Med, Vol. 174, p.1549-1555.

162. Cenci, E., L. Romani, A. Mencacci, R. Spaccapelo, E. Schiaffella, P. Puccetti, et F. Bistoni. 1993. "Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*". Eur J Immunol, Vol. 23, p.1034-1038.

163. Cunha, F. Q., S. Moncada, et F. Y. Liew. 1992. "Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages". Biochem Biophys Res Commun, Vol. 182, p.1155-1159.

164. Chang, C. I., B. Zoghi, J. C. Liao, et L. Kuo. 2000. "The involvement of tyrosine kinases, cyclic AMP/protein kinase A, and p38 mitogen-activated protein kinase in IL-13-mediated arginase I induction in macrophages: its implications in IL-13-inhibited nitric oxide production". J Immunol, Vol. 165, p.2134-2141.

165. Abbas, A. K., K. M. Murphy, et A. Sher. 1996. "Functional diversity of helper T lymphocytes". Nature, Vol. 383, p.787-793.

166. Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra, et K. M. Murphy. 1993. "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*- induced macrophages". Science, Vol. 260, p.547-549.

167. Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld, et J. N. Ihle. 1996. "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells". Nature, Vol. 382, p.171-174.

168. Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, et S. Romagnani. 1993. "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T

helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells". J Exp Med, Vol. 177, p.1199-1204.

169. Robinson, D., K. Shibuya, A. Mui, F. Zonin, E. Murphy, T. Sana, S. B. Hartley, S. Menon, R. Kastelein, F. Bazan, et A. O'Garra. 1997. "IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB". Immunity, Vol. 7, p.571-581.

170. Zhang, T., K. Kawakami, M. H. Qureshi, H. Okamura, M. Kurimoto, et A. Saito. 1997. "Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells". Infect Immun, Vol. 65, p.3594-3599.

171. Bach, E. A., M. Aguet, et R. D. Schreiber. 1997. "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling". Annu Rev Immunol, Vol. 15, p.563-591.

172. Adams, D. O., et T. A. Hamilton. 1984. "The cell biology of macrophage activation". Annu Rev Immunol, Vol. 2, p.283-318.

173. De Maeyer, E., et J. De Maeyer-Guignard. 1992. "Interferon-gamma". Curr Opin Immunol, Vol. 4, p.321-326.

174. Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, et B. R. Bloom. 1993. "An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection". J Exp Med, Vol. 178, p.2249-2254.

175. Coccia, E. M., E. Stellacci, G. Marziali, G. Weiss, et A. Battistini. 2000. "IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation". Int Immunol, Vol. 12, p.977-985.

176. Miller, C., J. A. Ragheb, et R. H. Schwartz. 1999. "Anergy and cytokine-mediated suppression as distinct superantigen- induced tolerance mechanisms in vivo". J Exp Med, Vol. 190, p.53-64.

177. Cottrez, F., et H. Groux. 2001. "Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10". J Immunol, Vol. 167, p.773-778.
178. Cauley, L. S., K. A. Cauley, F. Shub, G. Huston, et S. L. Swain. 1997. "Transferable anergy: superantigen treatment induces CD4+ T cell tolerance that is reversible and requires CD4-CD8- cells and interferon gamma". J Exp Med, Vol. 186, p.71-81.
179. Liu, Y., et C. A. Janeway, Jr. 1990. "Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance". J Exp Med, Vol. 172, p.1735-1739.
180. Sarin, A., M. Conan-Cibotti, et P. A. Henkart. 1995. "Cytotoxic effect of TNF and lymphotoxin on T lymphoblasts". J Immunol, Vol. 155, p.3716-3718.
181. Grewal, I. S., et R. A. Flavell. 1998. "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity". Annu Rev Immunol, Vol. 16, p.111-135.
182. Angulo, I., J. Rullas, J. A. Campillo, E. Obregon, A. Heath, M. Howard, M. A. Munoz-Fernandez, et J. L. Subiza. 2000. "Early myeloid cells are high producers of nitric oxide upon CD40 plus IFN-gamma stimulation through a mechanism dependent on endogenous TNF- alpha and IL-1alpha". Eur J Immunol, Vol. 30, p.1263-1271.
183. Pelaez, B., J. A. Campillo, J. A. Lopez-Asenjo, et J. L. Subiza. 2001. "Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism". J Immunol, Vol. 166, p.6608-6615.
184. Fleming, T. J., M. L. Fleming, et T. R. Malek. 1993. "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family". J Immunol, Vol. 151, p.2399-2408.
185. Hestdal, K., F. W. Ruscetti, J. N. Ihle, S. E. Jacobsen, C. M. Dubois, W. C. Kopp, D. L. Longo, et J. R. Keller. 1991. "Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells". J Immunol, Vol. 147, p.22-28.

186. Lagasse, E., et I. L. Weissman. 1996. "Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes". J Immunol Methods, Vol. 197, p.139-150.
187. Thiele, D. L., M. Kurosaka, et P. E. Lipsky. 1983. "Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester". J Immunol, Vol. 131, p.2282-2290.
188. Ramana, C. V., M. Chatterjee-Kishore, H. Nguyen, et G. R. Stark. 2000. "Complex roles of Stat1 in regulating gene expression". Oncogene, Vol. 19, p.2619-2627.
189. Karaghiosoff, M., H. Neubauer, C. Lassnig, P. Kovarik, H. Schindler, H. Pircher, B. McCoy, C. Bogdan, T. Decker, G. Brem, K. Pfeffer, et M. Muller. 2000. "Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice". Immunity, Vol. 13, p.549-560.

## **Appendice A**

### **Lettre de confirmation de publication**



**The Journal of Immunology**  
9650 Rockville Pike  
Bethesda, MD 20814-3994  
Phone: (301) 634-7197 FAX: (301) 571-1813

May 12, 2003

Dr. Pascale Duplay  
Universite du Quebec  
INRS-Institut Armand-Frappier  
531 Boulevard des Prairies  
Laval QC H7V 1B7,  
CANADA

FAX: 450-686-5301  
EMAIL: pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca

RE: Manuscript No. 02-4528

Dear Dr. Duplay:

I am pleased to inform you that your manuscript entitled "Gr-1+ myeloid cells lacking TC-PTP inhibit lymphocyte proliferation by an IFN-gamma and NO-dependent mechanism" has been accepted for publication in *The Journal of Immunology*.

Page proofs will be sent to you from Cadmus Professional Communications by e-mail in PDF format within 14-17 days after receipt of this notification. There will be a charge of \$60.00 per page (for up to 8 pages) at that time. After you receive your page proofs from the printer, please return them WITHIN 48 HOURS to avoid delay in publication.

If you will not be available during the 14-17 day period, an alternate contact must be supplied. Please contact Karyn Shackelford at 410-691-6254 or shackelfordk@cadmus.com with an alternate email address or contact information for another author on your manuscript. We will not reschedule or delay the delivery date of the manuscript proofs. Please check your email address printed on this letter to ensure delivery to the correct address.

Thank you for submitting your manuscript to *The Journal of Immunology*.

Sincerely,

Robert R. Rich, M.D.  
(for the Editors)



## **Appendice B**

### **Remerciements**

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Pascale Duplay, qui m'a permis de réaliser un bon projet de maîtrise grâce à son expertise. Je tiens également à la remercier pour la compréhension et les encouragements qu'elle m'a prodigués tout au long de ma maîtrise. Je voudrais également remercier tout particulièrement Joanne Roger pour ses précieux conseils techniques et nos précieuses discussions horticoles...

Merci aux étudiants du laboratoire Duplay pour leur soutien, leur camaraderie et leurs taquineries...



