

L'activation continue de SHP-1 dans les radeaux lipidiques des neutrophiles humains suite à une stimulation au GM-CSF contribue à l'altération de leurs fonctions effectrices observées avec le vieillissement.

Par
Carl Fortin
Service d'immunologie
Département de pédiatrie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc.) en Immunologie

Mars 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-25988-7
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-25988-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Table des matières	ii
Liste des illustrations	v
Liste des abréviations	vi
Résumé	vii
CHAPITRE 1 :INTRODUCTION	1
Partie 1 : Les neutrophiles humains	1
Généralités.....	1
Inflammation : définitions et contributions des PMN.....	3
Les fonctions effectrices des PMN.....	6
Migration et diapédèse.....	6
Phagocytose.....	6
Dégranulation.....	7
Production d'espèces réactives oxygénées (ROS).....	9
Synthèse protéique.....	10
Prolongation de la survie cellulaire.....	11
Partie 2 : Le Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	12
Généralités.....	12

Récepteur du GM-CSF.....	13
Signalisation du GM-CSF.....	14
Voies de signalisation activées.....	14
Régulation négative du récepteur du GM-CSF.....	18
Activités biologiques du GM-CSF.....	19
Activités granulopoïétiques.....	19
Activités directes et indirectes.....	19
Activités anti-apoptotiques.....	20
Partie 3 : les radeaux lipidiques dans les neutrophiles.....	22
Généralités.....	22
Molécules des PMN humains présents dans les radeaux lipidiques.....	23
Partie 4 : les protéines tyrosines phosphatases (PTPs).....	23
Généralités.....	23
Classification.....	24
Régulations.....	24
SHP-1.....	25
Partie 5 : Neutrophiles et vieillissement.....	28
Généralités.....	28
Changements dans les fonctions effectrices des PMN avec le vieillissement.....	28
Chimiotactisme.....	28

Production de radicaux libres	29
Apoptose.....	29
Altérations dans les voies de signalisation chez les PMN humains avec le vieillissement.....	32
Avant-propos.....	35
CHAPITRE 2 :ARTICLE.....	36
CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	86
Discussion.....	86
Conclusion.....	95
Liste des références hors articles.....	98

Liste des illustrations

Figure 1	Étapes de développement des neutrophiles.....	2
Figure 2	Phases de l'inflammation.....	5
Figure 3	Voies de signalisation activées par le GM-CSF.....	14
Figure 4	Importance du GM-CSF dans la différenciation des cellules de la lignée myéloïdes.....	19
Figure 5	Voies de signalisation qui sont altérées avec le vieillessement chez les neutrophiles humains.....	32

Liste des abréviations

PTPs : protéines tyrosines phosphatase

GM-CSF : granulocytes macrophages-colony stimulating factor

SHP-1 : sh2-domain containing protein tyrosine phosphatase-1

PMN : neutrophiles polymorphonucléaires

LPS : lipopolysaccharide

IL : interleukine

TNF : tumor necrosis factor

INF : intereron

TGF : tumor growth factor

fMLP : N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

CD : cluster of differentiation

FACS : fluorescence activated cell sorter

Jak : Janus kinase

LtB4 : leucotriène B4

MAPK : mitogen activated protein kinase

PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-biphosphate

Résumé

Il a été montré que les fonctions et la prolongation de la survie cellulaire des neutrophiles humains par les médiateurs de l'inflammation tendent à diminuer avec le vieillissement. Les protéines tyrosines phosphatase (PTPs), comme SHP-1, sont un des mécanismes qui permettent de moduler à la baisse et de terminer ces fonctions inflammatoires qui sont modulées par l'action des cytokines. Nous avons étudié le rôle des PTPs dans l'altération due au vieillissement des fonctions des neutrophiles humains. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique des PTPs a suggéré une dérégulation de l'activité phosphatasique avec le vieillissement. Cette dérégulation était confirmée aussi dans le cas de l'apoptose mesurée après 18 heures d'incubation. L'activité phosphatasique de SHP-1 purifiée par immunoprécipitation de neutrophiles de sujets jeunes ou âgés stimulés par le GM-CSF est altérée de façon significative après une minute de stimulation chez les sujets âgés. Dans les sujets jeunes SHP-1 est déplacée des radeaux lipidiques après 1 minute de stimulation par le GM-CSF alors que chez les sujets âgés, SHP-1 est présente à tout les temps de stimulation utilisés. Des immunoblots fait avec des anticorps anti-phosphotyrosine et anti-phosphosérine ont montré une augmentation de la phosphorylation en sérine dans les neutrophiles des sujets jeunes après une stimulation au GM-CSF alors que ce n'était pas le cas chez les sujets âgés. Nous avons aussi trouvés des altérations dans l'activation et le recrutement aux radeaux lipidiques de la Src kinase Lyn chez les neutrophiles des sujets âgés. De plus, nous avons démontré que SHP-1 est continuellement recrutée à Lyn chez les sujets âgés alors que cette interaction, qui est

observée dans des cellules non stimulées chez les sujets jeunes, est défaite par la stimulation au GM-CSF. En conclusion, les altérations observées dans la modulation de l'activité de SHP-1 par le GM-CSF dans les radeaux lipidiques sont un des facteurs qui contribuent à la diminution des effets du GM-CSF sur les neutrophiles humains avec le vieillissement.

Mots clés :

Neutrophiles humains

Médiateurs de l'inflammation

GM-CSF

Protéine tyrosine phosphatases

Influence du vieillissement sur le système immunitaire inné

Apoptose

Src kinase

Chapitre 1 : Introduction

Partie 1 : les neutrophiles humains

Généralités

Les neutrophiles sont des leucocytes hautement spécialisés du sang périphérique, ils sont aussi appelés leucocytes polymorphonucléaires (PMN) à cause de leur noyau multilobé. Les PMN font partie de la famille des granulocytes, c'est-à-dire des cellules du système immunitaire dont le cytoplasme contient des vésicules dont la coloration dense a donné le nom de ces cellules. Il y a trois types de granulocytes qui ont tous une durée de vie relativement courte et dont le nombre augmente pendant la réponse immune : les neutrophiles; les éosinophiles et les basophiles. Les neutrophiles sont les granulocytes les plus nombreux du sang périphérique, représentant entre soixante et soixante-dix pourcent de la population leucocytaire totale. Bien que leur demi-vie en circulation soit de très courte durée, entre huit et vingt heures, celle-ci peut être prolongée lorsque les neutrophiles pénètrent dans un site d'infection ou d'inflammation grâce aux médiateurs de l'inflammation tels que le LPS, le C5a, le GM-CSF ou le leukotriène B₄ (LEE et al., 1993; PETRIN et al., 2005).

Bien que toutes les cellules du système immunitaire proviennent de la moelle osseuse, les lymphocytes T et B proviennent de la lignée lymphoïde tandis que les cellules souches communes de la lignée myéloïde donnent naissance aux granulocytes, aux monocytes, aux cellules dendritiques, aux plaquettes et aux globules rouges. Les PMN qui sont originaires des cellules myéloïdes dérivées de cellules souches hématopoïétiques sont

constamment produites dans la moelle osseuse et ce, en grande quantité. Le développement des neutrophiles requiert trois étapes : la multiplication ; la maturation et le stade fonctionnel (DA SILVA et al., 1994). L'étape de la multiplication s'étend sur une période de 14 jours au cours de laquelle surviendra la mitose et où les précurseurs se diviseront. À ce stade, les cellules sont dans la moelle osseuse et sont appelées myéloblastes, promyélocytes et myélocytes (Figure 1). L'étape de maturation qui suit dure 6,5 jours environ. Les cellules précurseurs qui ne se divisent plus passent par trois étapes de développement : les métamyélocytes, les « band cells » et les cellules segmentées. Enfin, la troisième et dernière étape de la maturation neutrophilique est le stade fonctionnel. C'est à cette étape que les neutrophiles acquièrent la capacité de combattre les infections.

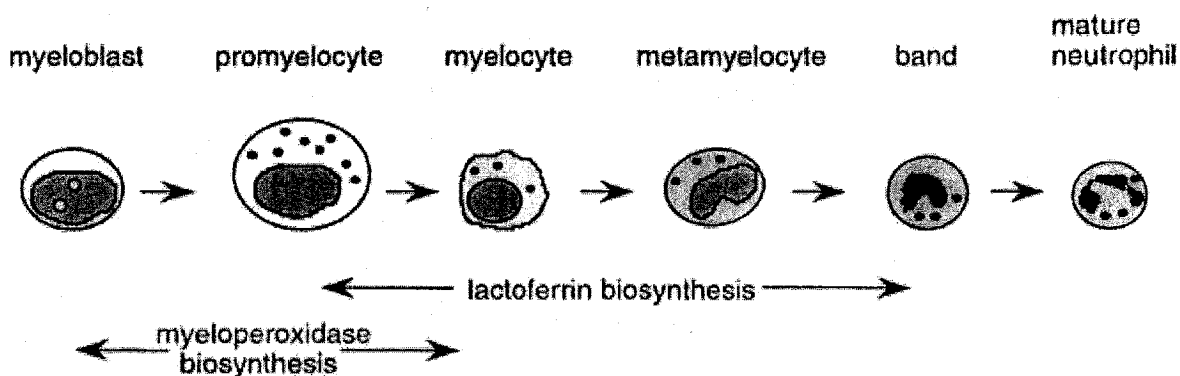


Figure 1

Étapes de développement des neutrophiles.

2003 by LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS
Fundamental Immunology chapter 35

Plusieurs cytokines libérées lors des réactions inflammatoires (GM-CSF, IL-3, G-CSF) participent au développement et à la maturation des neutrophiles. C'est le cas, des

« colony stimulating factors » (CSF), reconnus pour réguler deux procédés essentiels : la prolifération et la différenciation des précurseurs hématopoïétiques, de même que l'activité fonctionnelle des cellules matures de cette lignée. Quand les neutrophiles sont matures, ils sont dirigés vers la circulation sanguine à partir de laquelle ils sont recrutés vers les sites d'agressions grâce aux médiateurs de l'inflammation, dont l'IL-8 est le plus connu (FULOP et al., 1985b).

L'abondance des neutrophiles dans le sang et leur habileté à migrer rapidement confère d'importants rôles aux neutrophiles dans la réponse immune innée. Ces cellules phagocytaires représentent une première ligne de défense contre les infections bactériennes ou fongiques locales. Ils ont la capacité de repousser un pathogène ou même une infection. Les neutrophiles occupent l'avant-scène de la défense immunitaire jusqu'à ce qu'une réponse adaptative soit organisée quelques jours plus tard. Malgré leur rôle important dans la défense de l'hôte, il y a des exemples où les neutrophiles sont impliqués dans des maladies inflammatoires, telles l'asthme sévère (MCKINLEY et al., 2005; YEH et al., 2005), la fibrose kystique (MORRIS et al., 2005; WATT et al., 2005), les maladies inflammatoires de l'intestin (KASAMA et al., 2005; ECKMANN, 2005) et le psoriasis (KELLER et al., 2005 ; BOS et al., 2005).

Inflammation : définition et contribution des PMN

L'inflammation est un mécanisme de défense, en réponse à une agression, qui met en jeu une variété de médiateurs, nommés médiateurs de l'inflammation. Elle est caractérisée classiquement par quatre symptômes cliniques soit la chaleur, la rougeur, la douleur et

l'œdème. L'inflammation aiguë est rapide et de courte durée (quelques minutes à quelques jours) et est caractérisée par une accumulation de protéines plasmatiques, de fluides et de PMN. Lors d'une inflammation chronique, la durée beaucoup plus longue amène la croissance des fibroblastes, un influx de lymphocytes et de macrophages et la formation du granulome, *ie*, une capsule fibreuse contenant des cellules de l'inflammation. Il existe plusieurs voies d'entrée pouvant causer l'inflammation : les pathogènes et les matériaux organiques vont activer directement les protéases du plasma, tandis que les blessures physiques (meurtrissures, brûlures) vont causer des altérations dans l'intégrité des tissus qui amèneront l'activation des protéases du plasma. Ces protéases (comme le complément, la kinines et la plasmine) activées vont permettre la synthèse et la libération de peptides médiateurs de l'inflammation (comme l'histamine et la sérotonine), lesquels engendreront à leur tour divers effets. Parmi les effets de ces peptides notons la : fièvre, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et vasodilatation; de même que la libération de médiateurs d'inflammation (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , INF γ , leucotriènes, prostaglandines et le Platelet-activating factor) qui recruteront et activeront les cellules effectrices de l'inflammation (Figure 2). L'issue de la crise initiale peut mener soit : si elle est favorable, à la résolution de l'inflammation qui se fera par l'apoptose des cellules effectrices, par la réparation des tissus endommagés et par l'angiogénèse sous l'influence de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, TGF β); soit par contre, l'inflammation peut s'installer à demeure par une expansion du répertoire de cellules et de médiateurs qui provoqueront la formation de granulomes. L'inflammation, si elle se dérègle violemment, peut avoir des conséquences fatales par la venue d'un choc septique et la défaillance d'organes multiples.

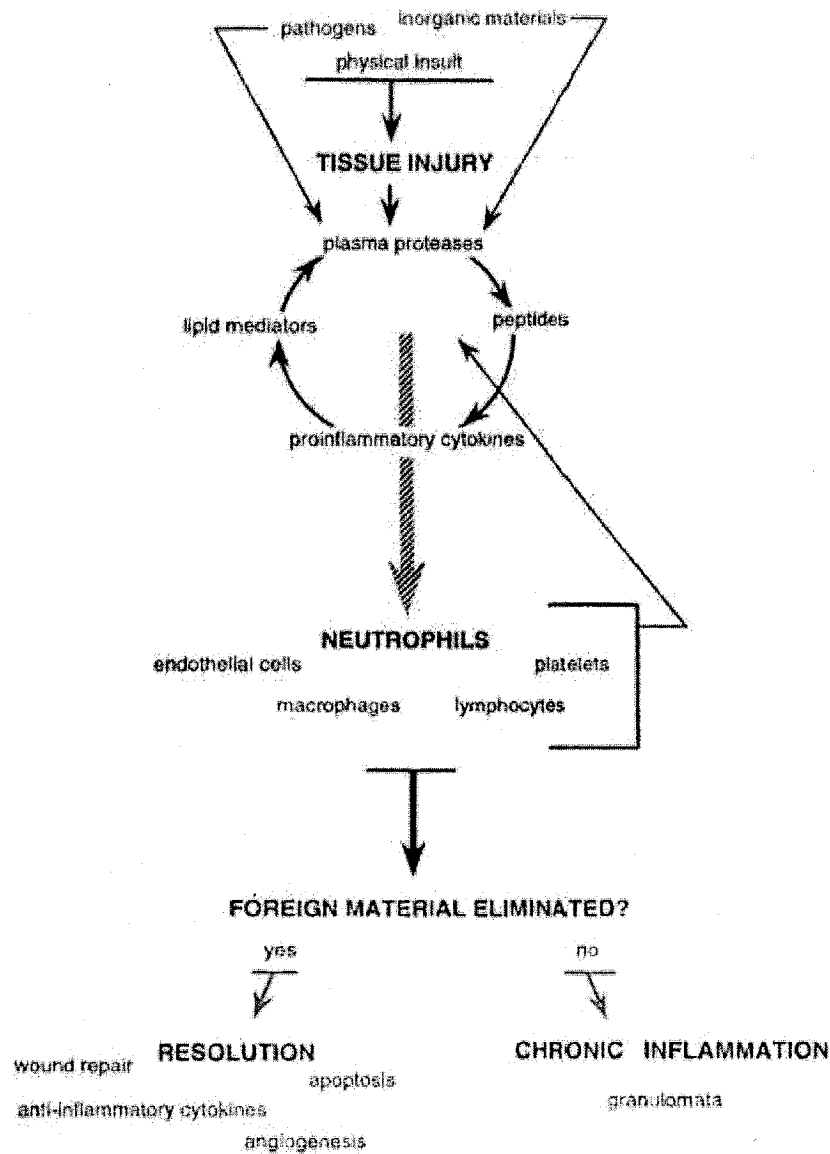


Figure 2

Phases de l'inflammation.

2003 by LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS

Fundamental Immunology chapter 37

Parmi les cellules effectrices de l'inflammation qui sont recrutées, les premières sont, comme il a été mentionné plus tôt, les PMN. L'apparition de ces cellules au site d'agression aura des conséquences dramatiques. En effet, par leurs mécanismes effecteurs, comme la phagocytose, la dégranulation, la production d'espèces oxygénées

réactives, les PMN auront un effet de rétroaction positive sur l'inflammation (ROSENBERG et GALLIN, 2003). Par exemple, lorsque les PMN auront libéré leurs granules, il y aura relâche de puissantes cytokines pro inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α et GM-CSF).

Les fonctions effectrices des PMN

Migration et diapédèse

Trois étapes caractérisent la migration leucocytaires, soit le roulement des PMN sur l'endothélium, l'adhésion ferme des PMN aux cellules endothéliales, et la transmigration entre les cellules endothéliales ou au travers de celles-ci par le phénomène de diapédèse (ROSENBERG et GALLIN, 2003). De l'autre côté du miroir, les PMN migreront, guidés par un gradient de chimioattractants, dont l'IL-8 et les leucotriènes, au travers des tissus vers le site d'agression locale. Lorsque les PMN arrivent au site d'agression, ils sont alors en mesure de mener à bien leurs fonctions effectrices.

Phagocytose

La phagocytose est considérée comme la principale fonction effectrice des PMN en milieu inflammatoire. Pour réussir à engloutir une particule, les neutrophiles l'entourent de pseudopodes ce qui piège le matériel dans un compartiment particulier de la cellule appelé phagosome (BROWN et GRESHAM, 2003). Lorsque les particules à phagocyter sont recouvertes d'immunoglobulines et/ou recouvertes de fragments de protéolyse du système du complément, la phagocytose se fait d'une manière hautement efficace et est le résultat de la reconnaissance de ces molécules par des récepteurs à immunoglobulines

Fc γ RIIA et Fc γ RIIIb (CD16/32) ou les récepteurs du complément (CR1 et CR3). L'activation des récepteurs Fc par leurs ligands amène la phosphorylation en tyrosine de leurs ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motif) par des kinases de la famille Src, en particulier Syk. L'activation de Syk cause l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui produit le PIP₃, important pour la phagocytose (LEE et al., 2003). Après que le phagosome soit formé autour de la cible, il y a une période de maturation du phagosome où il acquiert la machinerie nécessaire pour se débarrasser du microorganisme internalisé.

Dégranulation (FAURSCHOU et BORREGAARD, 2003)

Les PMN possèdent quatre types de granules : les granules primaires (granules azurophiles); secondaires (granules spécifiques); tertiaires (granules à gélatinases) et vésicules sécrétoires. Les granules azurophiles se forment au stade myélocyte et promyélocyte (Figure 1). Parmi leurs principaux constituants figure la myéloperoxidase (MPO), les alpha-défensines, qui sont des peptides anti-microbiens, et des sérines protéases anti-microbiennes comme les serprodicines et l'azurodicine. L'azurodicine est en plus un chimioattractant pour les monocytes, les fibroblastes et les cellules T. Les granules spécifiques commencent à se développer pendant les stades myélocytes et métamyélocytes. Elles sont riches en substances antibiotiques et participent surtout aux activités anti-microbiennes des neutrophiles par la mobilisation de leur arsenal dans le phagosome ou à l'extérieur de la cellule. En effet, les granules spécifiques contiennent dans leurs membranes des récepteurs (fMLP-R, TNF-R) et des intégrines (CD11b/CD18); alors qu'elles contiennent des peptides anti-microbiens (lactoferrine, lipocaline) et des

métalloprotéases (collagénase) dans la matrice. Les granules à gélatinase, quant à elles, sont un réservoir d'enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire et de récepteurs membranaires utiles lors de l'extravasation et la diapédèse des neutrophiles (Gélatinase, Lysozyme, CD11b/CD18). Les vésicules sécrétoires sont mobilisées à la surface des neutrophiles en réponse aux stimuli pro inflammatoires. Elles sont riches en intégrines, en récepteurs : complément (CR1); fMLP; LPS (CD14); Fc γ III (CD16) et en leukolysine. La mobilisation de ces granules a un effet profond dans les conditions pro inflammatoires. Elle est accompagnée de la disparition à la surface des neutrophiles du L-sélectine et les changements induits à la surface permettent aux neutrophiles d'adhérer fermement à l'endothélium activé (LEY, 2002).

Il existe une hiérarchie dans l'ordre de dégranulation des granules des neutrophiles selon la puissance des stimulants utilisés. Les vésicules sécrétoires sont les plus facilement mobilisables, suivit par les granules à gélatinase, les granules spécifiques et les granules azurophiles. Par exemple, le fMLP cause une relâche rapide et presque complète des vésicules sécrétoires sans relâche significative d'autres granules; alors que le PMA cause une faible relâche de granules azurophiles (FAURSCHOU et BORREGAARD, 2003). La stimulation du récepteur TREM-1 par un anticorps monoclonal cause une puissante mobilisation des granules spécifiques et des granules azurophiles, mesurée par un dosage de MPO et par la mesure à la surface de CD66 et CD11b (RADSAK et al., 2004; BOUCHON et al., 2000).

Production d'espèces réactives oxygénées (ROS)

Les ROS sont produits par une série d'enzymes des granules ou de la membrane plasmique. La principale responsable est la NADPH oxidase, qui est une enzyme à plusieurs composants qui transfère des électrons du NADPH cytoplasmique vers de l'oxygène moléculaire extracellulaire, ou intraphagosome, ce qui génère des superoxydes anions (ROOS et al., 2003). Le transport des électrons se fait d'une façon séquentielle au travers de plusieurs composantes de l'oxidase. Le centre réducteur de l'enzyme est le cytochrome b_{558} qui est composé de deux sous unités : $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$. Ces deux sous unités sont recrutées à la membrane de la surface des neutrophiles ou de leurs phagolysosomes lorsque les membranes des granules et des vésicules sécrétoires fusionnent lors de l'activation des neutrophiles. Les stimuli de cette activation sont la reconnaissance de microorganismes opsonisés par les récepteurs Fc ou de haute concentration de chimioattractants (IL-8, LtB_4 , fMLP) qui se lient aux récepteurs de surface des neutrophiles. L'activation des neutrophiles par ces stimuli va mener au recrutement des parties cytosoliques de la NADPH oxidase à la membrane plasmique, complétant cette enzyme et menant à son activation. La translocation de $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$ est initiée par une phosphorylation en sérine et est contrôlée par des GTPases de type Rho. Il y aura changement de conformation de $gp91^{phox}$ qui permettra la liaison du NADPH, activant ainsi l'enzyme (ROOS et al., 2003). Il a été montré que les composantes cytosoliques de la NADPH oxidase sont recrutées aux radeaux lipidiques lors de l'activation déterminée par la liaison du récepteur Fc γ , les radeaux lipidiques jouant un rôle dans la rapidité d'activation mais pas dans l'efficacité enzymatique (SHAO et al., 2003).

Ce n'est pas le superoxide anion en lui-même qui tue les microbes, ayant un faible potentiel microbicide. Le superoxide anion est converti dans les phagosomes, spontanément ou par l'action enzymatique de la superoxide dismutase (SOD), en peroxide d'hydrogène (H_2O_2) qui peut alors réagir avec d'autres superoxides pour générer des radicaux hydrogénés et des oxygènes singulets. Entre autres, la MPO des granules azurophiles catalyse la transformation du H_2O_2 en composés hautement toxiques avec des halogénés (I, Br, Cl) pour former, en particulier, l'acide hypochlorique ($OHCl^-$) bien connue (EL-BENNA et al., 2005). D'autres voies dévastatrices s'offrent au superoxide anion pour augmenter son pouvoir microbicide : il peut réagir avec l'oxide nitreux (NO) pour former la peroxyinitrite ou peut être converti en ozone (O_3). De plus en plus de doutes s'élèvent sur les rôles physiologiques véritables de ces produits dans le nettoyage du site d'agression (SEGAL, 2005). L'activation de la NADPH oxidase crée un flux d'ions dans les vacuoles, ce qui permet d'avoir des conditions propices pour l'activation des protéases anti-microbiennes des granules qui sont alors solubilisées et deviennent fonctionnelles (SEGAL, 2005).

Synthèse protéique

Les neutrophiles participent activement au déroulement et à l'amplification de l'inflammation par la relâche de ROS, mais aussi par les protéines qui sont synthétisées par eux. De fait, il est maintenant connu que les neutrophiles ont une synthèse protéique fonctionnelle qui est inhibée par l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription) et par la cycloheximide (inhibiteur de la traduction) lorsque les neutrophiles sont activés par le fMLP (HUGHES et al., 1987). De plus, il est connu que les neutrophiles, lorsqu'ils sont

stimulés par du zymosan ou des stimulants solubles tels que le PMA (phorbol myristic acetate), produisent de l'IL-1 lequel est capable d'induire la prolifération de thymocytes murins (TIKU et al., 1986). Une courte liste de ce que les neutrophiles peuvent relâcher comme produit avec une rétroaction positive sur la réaction inflammatoire comprend des facteurs de croissances, des récepteurs de surface, des molécules d'adhésion, des cytokines comme le TNF α , IL-12 le TGF β , des chimiokines (IL-8, Gro α , Mip-1 α/β , Mip-3 α/β , IP-10, MIG, I-TAC) (CASSATELLA, 1999).

Prolongation de la survie cellulaire

Les différentes cytokines pro inflammatoires du milieu ont pour effet d'augmenter la durée de vie des PMN en réduisant l'apoptose spontanée, caractéristique de ces cellules (COLOTTA et al., 1992; LEE et al., 1993; PETRIN et al., 2005). Par exemple, le GM-CSF prolonge la durée de vie des PMN par la synthèse ou la stabilisation de la demi vie de protéines anti-apoptotiques comme Mcl-1 (DEROUET et al., 2004; MOULDING et al., 1998), par la répression de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax- α (WEINMANN et al., 1999) et par l'activation de kinases de la famille Src telles que Lyn (WEI et al., 1996) et Jak2 (AL-SHAMI et NACCACHE, 1999). L'inhibition de l'apoptose des neutrophiles par les médiateurs de l'inflammation est associée avec une prolongation de leur durée de vie fonctionnelle (LEE et al., 1993). La mort cellulaire programmée des PMN est l'étape finale de la résolution de l'inflammation neutrophilique (SAVILL, 1997). Une régulation serrée de leur durée de vie est nécessaire puisque le contenu de leurs granules peut causer des dommages importants aux tissus environnants

si les PMN entrent en nécrose plutôt qu'en apoptose. Les PMN seront alors enlevés du milieu par des cellules phagocytaires sans endommager les tissus sains (SAVILL, 1997).

Partie 2: le Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)

Généralités

Le GM-CSF fait partie de la famille des cytokines de type I tout comme les IL-2, IL-3, IL-4 et IL-5, le G-CSF et la leptine. Les cytokines de cette famille possèdent quatre hélices alpha qui sont disposées en opposition deux à deux. Cette forme tridimensionnelle est commune à la famille des cytokines de type I, par contre les séquences d'acides aminés des différentes cytokines de cette famille sont très peu conservées. Cette famille est de plus divisée en cytokines à chaînes courtes (comme le GM-CSF, les IL-2, IL-3 et IL-5) et en cytokines à chaînes longues (comme l'IL-6, la leptine et le G-CSF). Cette dernière division est importante dans le type de molécule de transduction des signaux qui est utilisée par les cytokines. Les cytokines à chaînes courtes utilisent pour leur signalisation la chaîne commune β_c (IL-3, IL-5, GM-CSF) ou γ_c (IL-2, IL-4, IL-15) alors que les cytokines à chaînes longues utilisent le gp130 (IL-6), ou leur récepteur est semblable au gp130 (leptine, G-CSF), pour leur signalisation (LEONARD, 2003). Le poids moléculaire du GM-CSF est de 23 kDa et les quatre exons du gène sont situés sur le chromosome 5q31.1/11. Le GM-CSF est produit par les cellules T, les macrophages, les cellules de l'endothélium et les fibroblastes sous l'influence de l'IL-1, l'IL-6, le TNF, les endotoxines et les médiateurs de l'inflammation (LEONARD, 2003).

Récepteur du GM-CSF

Les effets du GM-CSF sont le résultats de l'activation d'un récepteur hétérodimérique qui comprend deux sous unités appelées α (CD116) et β (CDw131) (RAPOPORT et al., 1992). La sous unité α s'attache au GM-CSF avec une faible affinité, et c'est seulement en présence de la sous unité β qu'il y a une liaison de haute affinité avec ce ligand (HAYASHIDA et al., 1990). Bien que la sous unité β soit commune aux récepteurs des IL-3, IL-5 et du GM-CSF, la spécificité face au ligand est assuré par la chaîne α qui différent pour chacune de ces cytokines (MARTINEZ-MOCZYGEMBA et HUSTON, 2003). Tandis que la chaîne α possède une courte queue intra cytoplasmique, la chaîne β possède une longue partie intra cytoplasmique et joue un rôle majeur dans la signalisation du GM-CSF à l'intérieur de la cellule (HANAONO et al., 1993). Des études d'interactions ont montré que la liaison du récepteur du GM-CSF menait a l'activation de nombreuses molécules impliquées dans la signalisation, telle que Shc, Grb2, Sos1, Ras, Raf-1, dans les cellules (BRIZZI et al., 1996). Bien que les deux sous unités du récepteur du GM-CSF ne possèdent aucune activité kinase connue, l'activation de ce récepteur par son ligand amène l'activation de tyrosine kinase intracellulaire (KISHIMOTO et al., 1994). Dans les neutrophiles, trois tyrosine kinases sont activées à la stimulation par le GM-CSF : Lyn, Fes et Jak2 (BRIZZI et al., 1996). L'activation de ces tyrosines kinases sera à l'origine des trois voies de signalisation activées par la chaîne β commune des cytokines IL-3, IL-5 et GM-CSF : la voie des JAK/STAT ; la voie des MAPK et la voie de la PI3-K (MARTINEZ-MOCZYGEMBA et HUSTON, 2003).

Signalisation du GM-CSF

Voies de signalisation activées (Figure 3)

Le GM-CSF active trois voies de signalisation majeures par la sous unité β commune (MARTINEZ-MOCZYGEMBA et HUSTON, 2003; BRIZZI et al., 1996; AL-SHAMI et NACCACHE, 1999; DE GROOT et al., 1998; KAMATA et al., 2004) : la voie de signalisation de Ras-Raf-1-MEK-MAPK (mitogen activated protein kinase) ; la voie des Jak/STAT et la voie de signalisation de la PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase).

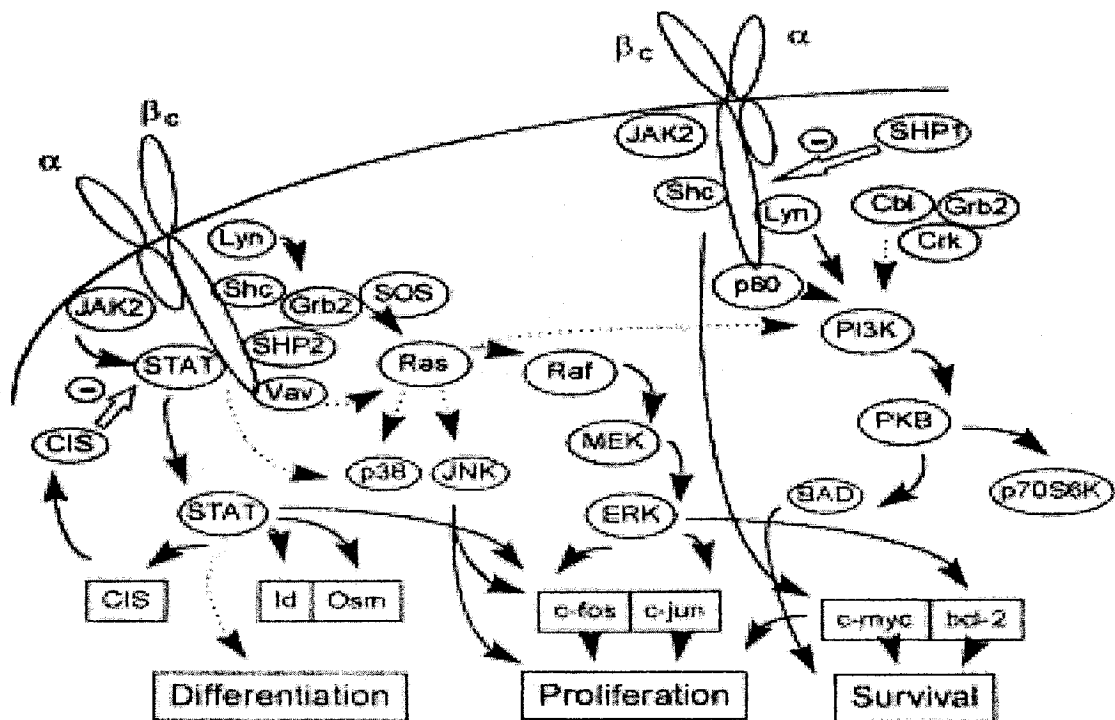


Figure 3 Le GM-CSF active dans les cellules les MAPK, les STATs et la PI3k grâce à Jak2 et Lyn. Ces voies ont plusieurs effets sur la différenciation et la prolifération cellulaire. Dans les neutrophiles ces voies sont redondantes pour prolonger la survie de la cellule, c'est l'effet anti-apoptotique du GM-CSF. Cell Signal 1998, 10, 619-628

La PI3K fait partie d'une famille de kinase lipidiques qui sont connues pour réguler tout une variété de réponses des cellules de la lignée myéloïde, incluant la migration

cellulaire, la production de superoxide, l'effet de « priming » et la protection contre l'apoptose. Les neutrophiles expriment toutes les quatre isoformes de la PI3K connus, soit PI3K α , β , γ et δ (YASUI et al., 2002). Les isoformes α , β et δ de la PI3K sont des hétérodimères composés d'une sous unité régulatrice (p85) et d'une sous unité catalytique (p110), on les nomme PI3K de type Ia. La PI3K γ (type Ib) est constituée d'une sous unité catalytique (p110) et d'une sous unité régulatrice (p101) (TOKER et CANTLEY, 1997). À la stimulation par des cytokines, la PI3K ajoute un groupement phosphate sur le groupement inositol pour produire le second messenger phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃). Ce second messenger mène au recrutement à la membrane plasmique et à l'activation de la sérine/thréonine kinase PKB/Akt. Dans les neutrophiles, le GM-CSF amène l'activation de la PI3K α par l'action de la Src kinase Lyn (AL-SHAMI et al., 1997) et, il a de plus été montré que la PI3K interagit avec la chaîne β du récepteur du GM-CSF (RAO et MUFSON, 1995). Dans les neutrophiles, l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K avant la stimulation par le GM-CSF a eu pour effet d'inhiber la relâche de l'anion superoxide, l'adhérence induite, la réorganisation de l'actine, le chimiotactisme et la phosphorylation de ERK (extracellular signal-regulated kinase) (YASUI et al., 2002); alors que la stimulation par le GM-CSF a eu pour effet de phosphoryler Akt, ERK mais n'a eu aucun effet sur p38 (KAMATA et al., 2004).

La voie des MAPK comprend ces trois cascades de signalisation : ERK, JNK (c-Jun amino-terminal kinase) et p38. Les fonctions attribuées aux MAPK dans les PMN incluent le remaniement du cytosquelette, l'activation du stress oxydatif et la modulation de la survie cellulaire (WOODCOCK et al., 1999). L'activation de la voie de ERK par le

GM-CSF commence par la phosphorylation de résidus tyrosine de la chaîne β du récepteur par Jak2 (MARTINEZ-MOCZYGEMBA et HUSTON, 2003). Cette phosphorylation permet le recrutement au récepteur et l'assemblage du complexe Shc/Grb2 qui devient phosphorylé à son tour. La formation du complexe Shc/Grb2 va amener une interaction avec Sos (son of sevenless homologue) et causer une activation séquentielle de Ras, Raf-1, MEK et ERK (DE GROOT et al., 1998). Cette activation de ERK va amener éventuellement à une augmentation de la transcription des facteurs de transcription *c-fos* et *c-jun* (SATO et al., 1993). Dans les neutrophiles, la voie de JNK n'est pas activable par le GM-CSF. La situation est un peu plus complexe pour la voie de p38 puisque son rôle est encore peu connu. En effet, une équipe a montré son activation dans les neutrophiles en réponses au GM-CSF (NAHAS et al., 1996) ; alors qu'une autre étude n'arrive pas à ces mêmes résultats (YUO et al., 1997). De plus, des résultats contradictoires ont été obtenus en ce qui concerne la prolongation de la survie des neutrophiles par le LPS : en utilisant un inhibiteur pharmacologique de p38 la survie de neutrophiles humain due au LPS était augmentée (SHETH et al., 2001); alors que, dans un autre cas, le même inhibiteur n'eut aucune influence sur le degré d'apoptose constitutive (WARD et al., 2005). Il semble maintenant un peu plus évident que l'activation p38 MAPK représente un signal de survie (ALVARADO-KRISTENSSON et al., 2004). En effet, la MAPK p38 est activée à la base dans les neutrophiles humains fraîchement isolés (ALVARADO-KRISTENSSON et al., 2002; AOSHIBA et al., 1999), et est inactivé lors de l'apoptose spontanée ou induite par une stimulation du récepteur Fas (ALVARADO-KRISTENSSON et al., 2002). De plus, la bactérie intracellulaire obligatoire *Anaplasma phagocytophilum*, dans le cadre de son cycle de vie, est capable de

retarder l'apoptose des neutrophiles et cette inhibition de l'apoptose est un résultat de l'activation continue de p38 (GARYU et al., 2005).

Les Jaks (Janus kinases) sont une famille de tyrosine kinase cytoplasmique qui sont associées aux récepteurs à cytokines et qui jouent un rôle majeur dans leur signalisation (KISSELEVA et al., 2002). Cette voie joue un rôle dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Lorsque le ligand va se fixer au récepteur, cela amène une activation des Jaks par trans-phosphorylation en tyrosine de deux Jaks fixées à celui-ci. Les Jaks activés vont causer la phosphorylation de plusieurs substrats incluant le récepteur même (AL-SHAMI et NACCACHE, 1999; QUELLE et al., 1994). La phosphorylation du récepteur du GM-CSF offre alors un site d'attachement pour une variété de protéines contenant le domaine SH-2 (Src homology 2), dont entre autres les STATs (signal transducer and activators of transcription), qui sont phosphorylés par les Jaks. Après la phosphorylation des STATs, ils forment des dimères et se déplacent au noyau où ils induisent la transcription de leurs gènes cibles. Il y a quatre membres dans la famille des Jaks (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2) de même sept membres dans la famille des STATs (STAT1 α , STAT1 β , STAT2, STAT3, STAT3 β , STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6) qui ont des propriétés différentes d'attachement à l'ADN et de trans-activation, ce qui amène de la spécificité au niveau cellulaire (DE GROOT et al., 1998). Parmi tout ces types de Jaks et de STATs, seule la présence de Jak2, STAT3 et STAT5B a été montré dans les neutrophiles (AL-SHAMI et al., 1998). Il existe une signalisation croisée entre la voie des Jak/STAT et la PI3K après une stimulation au GM-CSF des

neutrophiles, l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de Jak2 abolit la phosphorylation de la sous unité p85 de la PI3K (AL-SHAMI et NACCACHE, 1999).

Régulation négative du récepteur du GM-CSF

Il existe, à ce jour, plusieurs mécanismes de régulation négative de la chaîne commune des récepteurs à l'IL-3/5 et au GM-CSF. Un moyen est l'action d'une phosphatase cytosolique qui contrôle le niveau de substrats phosphorylés en tyrosine qui est induit par la fixation du ligand au récepteur (MARTINEZ-MOCZYGEMBA et HUSTON, 2003). La phosphatase SHP-1 (Src homology protein tyrosine phosphatase 1) est impliquée dans la diminution de la réponse de la chaîne β puisque sa surexpression induit l'arrêt de la croissance cellulaire stimulée par l'IL-3 (BONE et al., 1997). De plus, SHP-1 est un important régulateur négatif des kinases de la famille Src induit par le GM-CSF, comme Jak2 chez les neutrophiles et Lyn dans d'autres cellules (VEILLETTE et al., 2002; JIAO et al., 1996; STARR et HILTON, 1999). Un autre mécanisme est l'induction des protéines de la famille SOCS (suppressor of cytokine signaling) qui sont de petites protéines avec un domain SH2. Les SOCS ont un effet négatif sur la signalisation par des mécanismes variés : inactivation des Jaks, blocage de l'accès des STATs aux sites de liaisons du récepteur et l'ubiquitination de protéines impliquées dans la signalisation, ce qui les ciblent au protéasome (STARR et HILTON, 1999). Les STATs sont quant à elles empêchées par la famille des PIAS (protein inhibitors of activated STAT) de se lier à leur séquences cibles sur l'ADN (STARR et HILTON, 1999). Un autre mécanisme pour la régulation négative de la signalisation du GM-CSF est l'endocytose du récepteur et sa dégradation (MARTINEZ-MOCZYGEMBA et HUSTON, 2001).

Activités biologiques du GM-CSF

a) activités granulopoïétique

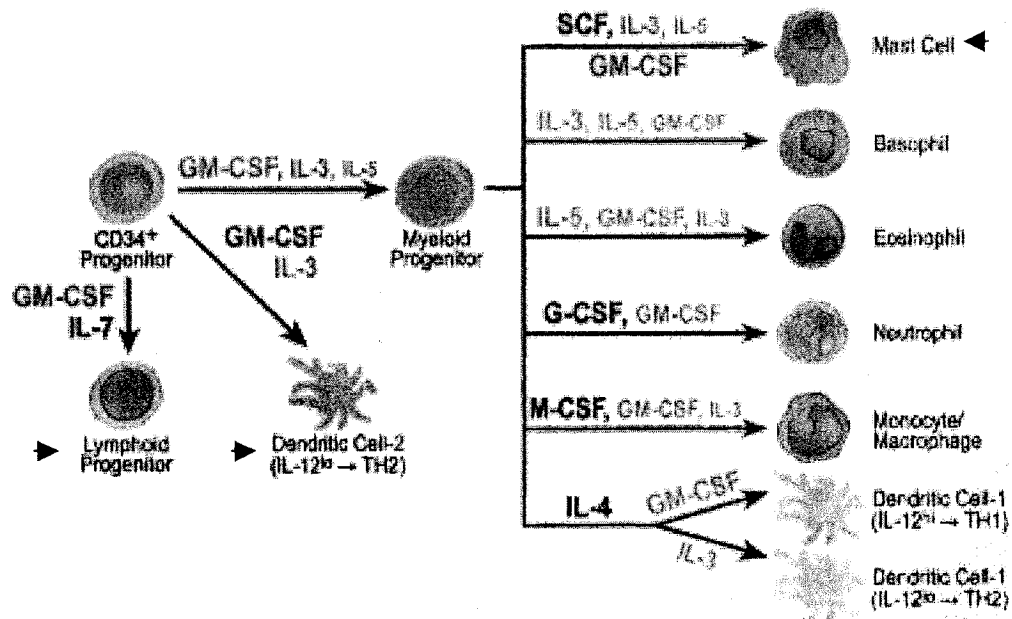


Figure 4

Importance du GM-CSF dans la différenciation des cellules de la lignée myéloïde. Le GM-CSF inhibe la différenciation des cellules pointées par une flèche. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, **112**, 653-665

Comme la figure 4 le montre, le GM-CSF est fortement impliqué dans plusieurs étapes de la différenciation des cellules de la lignée myéloïde et la différenciation des cellules dendritiques, mais c'est aussi un inhibiteur de la différenciation de cellules CD34⁺ en progéniteurs de la lignée lymphoïde, de cellules dendritiques de type 2 et de mastocytes.

b) activités directe et indirecte

Un certain nombre d'effets directs du GM-CSF sur les neutrophiles ont été décrits. Ceux-ci incluent la stimulation de la synthèse de l'IL-1 et de l'IL-1Ra (CLARK, 1988), l'augmentation de l'expression à la surface de la famille des intégrines $\beta 2$ (SHA'AFI et

MOLSKI, 1988), l'augmentation de l'affinité et du nombre de récepteur du fMLP (ATKINSON et al., 1988; CLARK, 1988), l'alkalinisation du cytosol et l'augmentation de la phosphorylation en tyrosines de plusieurs substrats (YUO et al., 1993; GOMEZ-CAMBRONERO et al., 1989).

En plus de ces effets directs, le GM-CSF a la particularité de rendre les neutrophiles plus sensibles à un second stimuli après un prétraitement : « priming ». Par exemple, la production de superoxide anion (ATKINSON et al., 1988; LOPEZ et al., 1986) (NATHAN, 1989) et la phagocytose (CLARK, 1988) sont tout les deux augmentés chez les neutrophiles prétraités avec du GM-CSF tout comme l'est la mobilisation du calcium (NACCACHE et al., 1988) et l'activation de la phospholipase D (BOURGOIN et al., 1990; NACCACHE et al., 1991).

c) activités anti-apoptotique

Les voies de signalisation activées par le GM-CSF chez les neutrophiles humains mènent à des effets directs et indirects tel que décrit ci haut ; mais, en particulier, toutes les voies activées par le GM-CSF convergent en un unique but : retarder l'apoptose du neutrophile. Une des premières études sur le sujet indiquait que l'effet du GM-CSF sur la survie du neutrophiles nécessitait la synthèse protéique et la transcription des ARN messagers (BRACH et al., 1992). L'inhibition du protéasome dans le neutrophile augmente la demie vie de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et retarde l'apoptose et l'ajout de GM-CSF au neutrophile augmente la stabilité de Mcl-1 par des voies de signalisation impliquant PI3K/Akt et Erk1/2 (DEROUET et al., 2004) et provoque l'induction de sa synthèse

protéique dans la cellule (MOULDING et al., 1998; EPLING-BURNETTE et al., 2001). Il a été montré que les voies de la PI3K et des Jak/STATs agissaient en coopération dans l'induction protéique et la stabilisation de Mcl-1 (EPLING-BURNETTE et al., 2001), ce qui est en lien avec le rôle important joué par la Src Kinase Lyn dans le retardement de l'apoptose chez les neutrophiles (WEI et al., 1996). Pour ajouter de l'importance à la voie de la PI3K : la phosphorylation de Bad sur deux sérines, la diminution de son ARN messager et sa redistribution dans le cytosol, phénomènes induits par le GM-CSF, sont inhibés par l'ajout d'un inhibiteur pharmacologique de la PI3K (KLEIN et al., 2000; COWBURN et al., 2002).

Le même phénomène de stabilisation au niveau protéique a été observé pour Bcl-X₁ (WEINMANN et al., 1999), mais l'expression de cette protéine dans les neutrophiles est controversée malgré la présence d'ARN messager (EPLING-BURNETTE et al., 2001). Dans le cas de la protéine pro apoptotique Bax- α il se produit le phénomène contraire, l'incubation des neutrophiles avec le GM-CSF induit une baisse d'expression de cette protéine (WEINMANN et al., 1999; MOULDING et al., 1998).

Le GM-CSF a aussi un rôle à jouer dans l'apoptose stimulée par le récepteur Fas dans les neutrophiles. En effet, il a été montré que le GM-CSF inhibait le recrutement de FADD (Fas-associated protein with death domain) au récepteur Fas, la formation du DISC (death-inducing signaling complex) et l'activation de la procaspase-8 par le ligand du Fas ; ces changements induits par le GM-CSF était sous le contrôle de la PKC, de la PI3K et des MAPK ERK1/2 (KOTONE-MIYAHARA et al., 2004).

Partie 3: les radeaux lipidiques dans les neutrophiles

Généralités

Il est maintenant admis qu'il existe une hétérogénéité lipidique dans la membrane. Les composants des radeaux lipidiques s'auto assemblent et forment des microdomaines qui sont différents des glycérophospholipides diffus qui les entourent. Les radeaux lipidiques ont été décrits dans une variété de cellules comme des microdomaines membranaires composés principalement de cholestérol, de sphingolipides et de molécules de signalisation jouant un rôle primordial dans la transduction des signaux (SIMONS et IKONEN, 1997; SHAO et al., 2003). Ils ont reçus plusieurs noms : DRMs (detergents résistants membranes) ; GEMs (glycolipid-enriched microdomains) ; DIGs (detergent insoluble glycolipid-enriched membranes), qui sont souvent les reflets de leurs propriétés, en particulier, ces microdomaines ne sont pas solubilisés par les détergents non ioniques, comme le Triton X-100, à 4⁰C (SIMONS et IKONEN, 1997; BROWN et LONDON, 2000). Les molécules de signalisation y sont situées de façon intrinsèque, ou y sont recrutées au complexe de signalisation de la membrane suite à une stimulation adéquate de la cellule. Le concept actuel des radeaux lipidiques est que ce compartiment lipidique est une plate-forme pour l'intégration des signaux à la membrane cellulaire (SHAO et al., 2003). Par exemple, au cours des événements qui suivent l'activation du TCR, le LAT (linker of activated T-cells) est recruté aux radeaux lipidiques de la membrane. Cet événement est dépendant de deux résidus cystéine qui permettent la palmitoylation et, pour montrer l'importance de la localisation aux radeaux lipidiques dans l'activation du

TCR, la mutation de la cystéine 26 ne permet pas l'activation de la cellule T (SAMELSON, 2002).

Molécules des neutrophiles humains présents dans les radeaux lipidiques

La présence de radeaux lipidiques a été confirmée dans les neutrophiles humains et l'étude a permis d'identifier quelques composants de ces radeaux, entre autres des protéines du cytosquelette et les récepteurs Fc (NEBL et al., 2002). Il a été montré que les composants membranaires de la NADPH oxidase sont présent dans les radeaux lipidiques à l'état basal chez les neutrophiles (SHAO et al., 2003). Les composants cytosoliques étaient recrutés dans les radeaux lipidiques lors de la stimulation du récepteur Fc γ . Dans le phénomène d'apoptose spontané des neutrophiles humains, il a été montré que le DISC était dans les radeaux lipidiques chez les cellules fraîchement isolées et une agrégation progressive avait lieu avec le vieillissement *in vitro* des cellules (SCHEEL-TOELLNER et al., 2004). Le TLR4 (toll-like receptor 4), quant à lui, est recruté dans ce compartiment cellulaire à la stimulation des neutrophiles avec le LPS (FULOP et al., 2004).

Partie 4 : les protéines tyrosines phosphatases (PTPs)

Généralités

La phosphorylation en tyrosine est un mécanisme fréquent utilisé dans la transduction des signaux qui contrôlent les fonctions de la cellule, qui est contrôlée par la balance d'activité entre les protéines tyrosines kinases (PTKs) et les PTPs. Ces deux types

d'enzymes peuvent avoir des effets inhibiteurs ou activateurs sur la signalisation cellulaire. Plusieurs PTPs ont été impliquées dans l'inhibition de la transduction de signaux de récepteurs du système immunitaire, que l'on pense au CD45, CD148, PEP, PTP-PEP et SHP-1 (VEILLETTE et al., 2002). Les PTPs sont le plus souvent retrouvées à, ou près de la membrane cytoplasmique où elles participent à la régulation de la signalisation cellulaire. Alors que d'autres sont localisées sans distinction dans la cellule : au cytoplasme; au noyau ou aux organelles (GJORLOFF-WINGREN et al., 2000).

Classification

Les PTPs sont, pour l'instant, divisées en quatre catégories différentes : la classe I est nommée « Receptor-like PTPs » et inclue CD45 ; la classe II est nommée « Non-receptor classical PTPs » et inclue SHP-1 ; la classe « Others » est divisée en trois sous-classes et inclut VHR, PTEN et LMPTP, la dernière classe est appelée « Aspartic-acid-based PTPs » et inclut EYA3 (MUSTELIN et al., 2005).

Régulation

Les régions qui ne sont pas catalytiques participent à la régulation de l'activité phosphatase par des mécanismes qui impliquent des liaisons intramoléculaires. SHP-1 et SHP-2 offrent un bon exemple de ce mécanisme : leur domaine SH2 terminal est adapté à la forme de la poche catalytique de leur domaine phosphatase, ce qui empêche l'accès du substrat au site catalytique. Cette conformation inhibitrice est dérangée par la liaison avec le substrat et résulte en une forte augmentation de l'activité enzymatique (TOWNLEY et al., 1993; PEI et al., 1996).

De plus, la plupart des PTPs sont modifiées par des modifications post-traductionnelles qui permettent d'accomplir la localisation cellulaire, l'interaction avec d'autres protéines, la stabilité et la régulation de l'activité enzymatique. La glycosylation est typique des PTPs qui sont transmembranaires. La modification la plus commune est la phosphorylation sur les résidus sérine, thréonine et/ou tyrosine. La phosphorylation peut déterminer l'activité catalytique, la localisation cellulaire, la stabilité ou l'association physique des PTPs avec les substrats ou des molécules régulatrices (MUSTELIN et al., 2005).

SHP-1

La PTP SHP-1 est une enzyme de 68 kDa qui possède deux domaines SH2 adjacents dans la région dépourvue d'activité catalytique en N-terminal et un domaine catalytique typique d'une phosphatase (SHEN et al., 1991). Son expression est prédominante dans les cellules hématopoïétiques, où elle est exprimées dans chacune d'elles, et il existe une variante spécifique aux cellules épithéliales (BANVILLE et al., 1995). Le gène de SHP-1 est muté dans les souris « motheaten » et « viable motheaten » (SHULTZ et al., 1993; KOZLOWSKI et al., 1993). Ces souris ont une très faible activité de SHP-1 et des anomalies dans plusieurs des cellules de la lignée hématopoïétiques. Entre autres, une accumulation dans les tissus et prolifération accrue de monocytes et de cellules de la lignée myéloïde qui montrent un taux de phosphorylation des protéines plus élevé (CHEN et al., 1996). Ces souris mutée au niveau du gène de SHP-1 souffrent de troubles

autoimmunitaires, d'inflammation chronique et meurent d'une hémorragie des poumons « haemorrhagic pneumonitis » (TSUI et al., 1993; SHULTZ et al., 1993).

SHP-1 peut interagir avec une très grande variété de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et de protéines adaptatrices. Pour ne nommer que les plus pertinents dans notre cas : Jak2 (JIAO et al., 1996); le FcγRIIB1 et le CD22 dans le contexte d'une activation du BCR (D'AMBROSIO et al., 1995; DOODY et al., 1995) et les kinases de la famille Src (SOMANI et al., 1997).

La régulation de l'activité catalytique de SHP-1 peut se faire par plusieurs mécanismes. Nous l'avons vu, le domaine SH2 terminal maintient le site catalytique de SHP-1 inaccessible au substrat, de sorte que les ligands des domaines SH2 peuvent être considérés comme à la fois activateurs et substrats de SHP-1 (POOLE et JONES, 2005). Un second mécanisme est la régulation de l'activité grâce aux modifications apportées à la queue C-terminale de SHP-1. Cette région est riche en motifs et peut avoir un effet important sur son activité : interaction avec la membrane; localisation aux radeaux lipidiques et interaction avec les phospholipides. Cette région contient aussi des sites de phosphorylations en sérine et en tyrosine.

Les sites de phosphorylation en tyrosine de SHP-1 serviraient deux fonctions : recruter des protéines adaptatrices et moduler directement l'activité enzymatique. Le résidu Tyr⁵³⁶ fait partie d'un motif de liaison potentiel pour Grb2 SH2, ce qui suggère que SHP-1 pourrait avoir un rôle à jouer dans le recrutement de Grb2 (MINOO et al., 2004). Il a été

montré que la phosphorylation de résidu tyrosine par des kinases non identifiées (ZHANG et al., 2003; BOUCHARD et al., 1994), ou de la famille Src (FRANK et al., 2004), causent une augmentation de l'activité catalytique de SHP-1.

Quant à la phosphorylation en sérine, ces effets sont quelques fois contradictoires d'une lignée cellulaire à l'autre (POOLE et JONES, 2005). Dans le cas des neutrophiles, il a été montré que l'activité de SHP-1 diminuait suite à une stimulation avec le fMLP et que cette diminution corrélait avec une augmentation de la phosphorylation en sérine laquelle était renversée par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la PKC (BRUMELL et al., 1997) dans les neutrophiles humains. Chez les plaquettes humaines, c'est le résidu Ser⁵⁹¹ qui est phosphorylé par la PKC et cette phosphorylation résulte en une baisse de l'activité catalytique de SHP-1 à la stimulation de la cellule (JONES et al., 2004). Fait intéressant à noter dans cette étude, les auteurs ont démontré une association basale entre la PKC α et SHP-1 qui n'était pas directe, mais possiblement le résultat d'une protéine adaptatrice. Dans les cellules T, une phosphorylation constitutive en sérine a été observée, mais son rôle n'a pas été étudié (YI et IHLE, 1993).

Pour ce qui est des autres mécanismes de régulation qu'offrent les motifs de la queue C-terminale de SHP-1, ils sont peu connus jusqu'à maintenant. D'une part, il a été montré que SHP-1 était recruté indirectement aux radeaux lipidiques grâce à des motifs situés en C-terminal dans les cellules T et que sa présence était nécessaire à la régulation négative de fonctions modulées par la stimulation du TCR, comme la production d'IL-2 (FAWCETT et LORENZ, 2005). D'autre part, il a été montré que l'acide phosphatidique

(PA), un phospholipide, induisait l'activité catalytique de SHP-1 en s'attachant à un site situé dans sa partie C-terminale (FRANK et al., 1999).

Partie 5 : Neutrophiles et vieillissement

Généralités

Les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre les agressions microbiennes. Leur durée de vie *in vivo*, à la condition où leurs services ne sont pas requis, est de moins de 24 heures. Dans les cas où les neutrophiles doivent être mobilisés, leur vie est prolongée sous l'influence des composants de bactéries, des cytokines pro-inflammatoires ou du complément. Les premières études portant sur l'influence du vieillissement sur les fonctions des neutrophiles ont permis de découvrir que les animaux plus âgés avaient une résistance moindre aux infections aux staphylocoques (LOURIA et al., 1982).

Changements dans les fonctions effectrices des neutrophiles avec le vieillissement

Chimiotactisme et chimiokinèse

Il n'y a pas consensus en ce qui concerne les altérations dans le chimiotactisme avec l'âge chez les neutrophiles. Il y a des études qui montrent une absence d'altérations avec le vieillissement (PHAIR et al., 1978; ESPARZA et al., 1996) alors que d'autres études montrent une diminution du chimiotactisme et de la chimiokinèse avec l'âge (FULOP et al., 2004; WENISCH et al., 2000). Pour certains chimioattractants spécifiques, comme le fMLP, on observe une diminution du chimiotactisme avec le vieillissement; ce qui n'est

pas observé avec le LPS (FULOP et al., 2004). Comme le nombre de neutrophiles est le même au site d'agression peu importe l'âge des sujets (BIASI et al., 1996). Il est permis de penser que les résultats contradictoires obtenus, quant à l'influence du vieillissement sur le chimiotactisme, sont dû à ce que l'action concertée de plusieurs facteurs chimiotactiques sur les neutrophiles amène globalement une migration similaire à celle des sujets jeunes.

Production de radicaux libres

La production de radicaux libres chez les neutrophiles avec le vieillissement a été bien étudiée (Fulop et al., 1985b; LORD et al., 2001). Il est bien que connu que les variations dans la production de superoxide avec le vieillissement sont dépendantes des stimulations utilisées : une diminution de superoxide est observée lorsque des bactéries gram-positives sont utilisées alors qu'il n'y a pas de diminution lorsque ce sont des bactéries gram-négatives (WENISCH et al., 2000). Pour ce qui est du fMLP, notre équipe a montré que la production de radicaux libres était significativement diminuée, avec ou sans pré-incubation avec le GM-CSF, chez les neutrophiles de la personne âgée (FULOP et al., 2004).

Apoptose

La durée de vie des neutrophiles de personnes âgées ne peut pas être prolongée, contrairement à celle des sujets jeunes, par des molécules pro-inflammatoire bien connues pour leur effet anti-apoptotique sur les neutrophiles (FULOP et al., 1997; NAKAGAWA et al., 1998; TORTORELLA et al., 2001). Parmi ces molécules, les plus

importantes sont le G-CSF, GM-CSF, LPS, les IL-2 et IL-6 et certains glucocorticostéroïdes (dexaméthasone, budésonide). Les glucocorticostéroïdes ont des effets anti-inflammatoires bien décrits au niveau de l'organisme et ils sont les médicaments les plus utilisés pour le traitement des désordres allergiques et auto-immuns (BUSSE et al., 2002). Pour ce qui est des PMN dans la réaction inflammatoire, les effets des glucocorticostéroïdes sont moins évidents : ils inhibent l'accumulation des PMN dans les tissus en inflammation (NAKAGAWA et al., 1998) mais prolonge leur survie en retardant l'apoptose spontanée (COX, 1995). Fait à noter, il n'y a pas de différences avec l'âge en ce qui concerne les molécules bien connues pour induire l'apoptose des neutrophiles, comme le fMLP ou les ROS (FULOP et al., 2004).

Ces problèmes de manque de prolongation de durée de vie chez les neutrophiles de personnes âgées semblent être dus à une altération dans les mécanismes qui agissent contre l'apoptose spontanée, ce qui est caractéristique des neutrophiles. La famille des protéines Bcl-2 inclut des protéines qui sont importantes pour la régulation de la survie cellulaire et l'apoptose. Chez les neutrophiles, les principales protéines jouant un rôle anti-apoptotique, sont Mcl-1 et A1 (LEUENROTH et al., 2000; SIMON, 2003); et celles jouant un rôle pro-apoptotique sont Bad et Bax (WEINMANN et al., 1999; KLEIN et al., 2000). Plusieurs altérations sont observées avec le vieillissement dans la modulation de l'expression des membres des protéines de la famille Bcl-2 dans le contexte d'une stimulation au GM-CSF. Le GM-CSF ne maintient pas l'expression de Mcl-1 après 18 heures d'incubation chez les sujets âgés comme il le fait chez les sujets jeunes, ce qui cause un déséquilibre dans le ratio Bax/Mcl-1 à 18 heures et annule l'effet de survie du

GM-CSF (FULOP et al., 2002). Dans le cas des protéines pro-apoptotiques, le GM-CSF n'est pas capable de réduire l'expression de Bax chez les personnes âgées après 18 heures de stimulation comme il le fait chez le jeune (LARBI et al., 2005), ce qui influence le ratio Bax/Mcl-1 à 18 heures. Ces données suggèrent que le GM-CSF est capable, chez les sujets jeunes, de créer un milieu anti-apoptotique dans les neutrophiles grâce à un ratio de protéines anti-apoptotiques supérieur aux protéines pro-apoptotiques; ce qui n'est pas le cas dans les neutrophiles des personnes âgées. Nous verrons dans la prochaine section comment les altérations dans les voies de signalisation du GM-CSF avec le vieillissement peuvent expliquer cette incapacité à créer un milieu anti-apoptotique chez des sujets sains âgés.

Il a été montré que l'activation de la caspase-3 jouait un rôle important dans l'apoptose spontanée des neutrophiles ainsi que dans la prolongation de la survie cellulaire due au GM-CSF, et, que des altérations existait également dans son activation avec le vieillissement (LARBI et al., 2005). Après 18 heures de traitement au GM-CSF, les neutrophiles de sujets jeunes montraient une diminution de l'expression de l'activité de la caspase-3 et de sa forme active par rapport à des cellules non traitées, de plus, cette diminution était dépendante des ERK. Tandis que pour les neutrophiles de personnes âgées, le GM-CSF était incapable de diminuer l'expression ou l'activité de la caspase-3 qui était, par ailleurs, toujours plus élevée que chez les sujets jeunes.

Altérations dans les voies de signalisations chez les neutrophiles humains avec le vieillissement

Une accumulation d'observations suggère que le vieillissement cause des altérations dans les voies de signalisations spécifiques aux récepteurs (FULOP, 1994; LORD et al., 2001; SCHRODER et RINK, 2003).

Comme on peut le voir sur la figure 5, la relâche de calcium à l'intérieur des neutrophiles est affectée par le vieillissement. En effet, l'augmentation du calcium libre à l'intérieur de

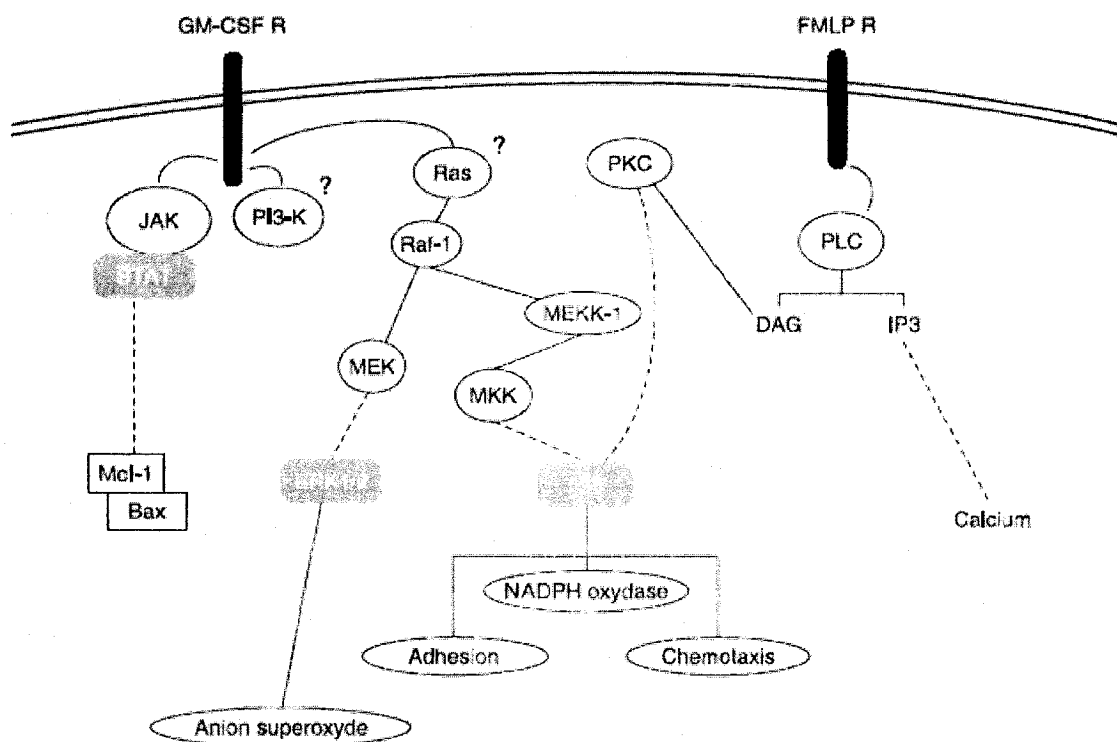


Figure 5

Voies de signalisation qui sont altérées avec le vieillissement chez les neutrophiles humains. L'altération est indiquée par des pointillés. *Aging Cell* 2004 pp.217-226.

la cellule est plus forte en quantité chez les sujets jeunes que chez les sujets âgés suite à une stimulation au fMLP (BIASI et al., 1996), mais plus élevée chez les sujets âgés que chez les sujets jeunes en conditions basales (FULOP, 1994). Ce qui suggère un dérèglement dans l'activation des voies de signalisation précoces avec le vieillissement. Des études ont montré que le fMLP activait p38 et les ERK, reconnues pour leur implications dans les fonctions effectrices induites par le fMLP telles que le chimiotactisme, l'adhérence et la production de superoxyde (ZU et al., 1998). L'activation de ces kinases est altérée avec le vieillissement (FULOP et al., 2004), ce qui pourrait aider à expliquer la diminution avec l'âge des fonctions des neutrophiles induites par le fMLP.

Dans le cas du récepteur du GM-CSF, la figure 5 montre des altérations avec le vieillissement dans toutes les voies de signalisation activées par celui-ci (FULOP et al., 2004; LARBI et al., 2005). Les voies de la PI3K et des MAPK en particulier sont impliquées dans la modulation de la survie cellulaire des neutrophiles par le GM-CSF (KLEIN et al., 2000). Leurs altérations dans les neutrophiles de sujets âgés sont responsables de l'arrêt de la prolongation de la survie en milieu pro inflammatoire. Des données non publiées de notre laboratoire indiquent aussi une altération avec le vieillissement de l'activation des voies de la PI3K et de Jak2 (FORTIN et al. en préparation).

Pour ce qui est des récepteurs toll-like (TLRs), les données sont rares en ce qui concerne l'influence du vieillissement sur leur réponse. Dans des macrophages murins, des

altérations dans l'expression et les fonctions des TLRs ont été observées (RENSHAW et al., 2002). Des résultats obtenus dans notre laboratoire indiquent que l'expression, mesurée par FACS, des TLR2/4 reste semblable à la surface des neutrophiles avec le vieillissement. Ce qui n'est pas le cas de la dynamique de recrutement aux radeaux lipidiques : chez les sujets jeunes, IRAK-1 est recrutée aux radeaux lipidiques suite à une stimulation au LPS, ce n'est pas le cas chez les sujets âgés qui montrent, par ailleurs, un recrutement basal de IRAK-1 supérieur aux sujets jeunes (FULOP et al., 2004).

L'étude de l'influence du vieillissement sur les voies de signalisation indique qu'il existe des altérations dans l'activation de ces voies dans les neutrophiles de sujets âgés. En particulier, il est à noter que l'activation est toujours supérieure en condition basale dans les neutrophiles des sujets âgés mais que la stimulation n'entraîne pas une augmentation de l'activation comme on le voit dans les neutrophiles des sujets jeunes. Quelques tentatives d'explication ont été avancées pour expliquer ces altérations. Par exemple, il se pourrait que des changements physico-chimiques dans la membrane cellulaire puissent avoir une influence. Il est connu que la quantité de cholestérol n'est pas augmentée dans la membrane des neutrophiles de sujets âgés, par contre, il y a une quantité accrue de phospholipides (YULI et al., 1982; ALVAREZ et al., 2001). Autre exemple, des altérations dans la dynamique du cytosquelette ont été avancées comme cause possible de défauts de signalisation observés avec le vieillissement chez les neutrophiles humains (RAO et al., 1992).

Avant-propos

La rédaction de l'article suivant intitulé « Impairment of SHP-1 downregulation in the lipid rafts of human neutrophils under GM-CSF stimulation contributes to their age-related altered functions » a été écrit, figures comprises, par Carl Fortin qui a également fait la totalité des expériences décrites dans ce document.

Cet article a été accepté pour publication par le *Journal of Leukocyte Biology* au début de l'année 2006 et sera publié en mai 2006.

Chapitre 2: Article**Impairment of SHP-1 downregulation in the lipid rafts of human neutrophils under GM-CSF stimulation contributes to their age-related altered functions.**

Carl F. Fortin^{1,2}, Anis Larbi^{1,2}, Olivier Lesur^{2,3}, Nadine Douziech¹, Tamas Fulop Jr^{*1,2,4}

¹Laboratory of Immunology, Research Center on Aging, University of Sherbrooke,

²Immunology Graduate Program, Clinical Research Center, Faculty of Medicine,

³Department of Medicine, Pneumology division, ⁴Department of Medicine, Geriatrics Division, Faculty of medicine, University of Sherbrooke, Qc, Canada

Corresponding author,

Tamas Fulop Jr.

Laboratory of Immunology, Research Center on Aging, University of Sherbrooke,
Qc, Canada, Immunology Graduate Program, Clinical Research Center, Department
of Medicine, Geriatrics Division, Faculty of medicine, University of Sherbrooke
1036 rue Belvédère Sud

Sherbrooke, Québec

J1H 4C4

Canada

Tel : +1 819-821-1170 #2293

Fax : +1 819-821-7141

Email: tamas.fulop@usherbrooke.ca

Short title: SHP-1 activity in PMN and aging.

Keywords: phosphatase, aging, Lyn, chemotaxis, ROS, apoptosis.

Abstract

It has been shown that the functions and the rescue from apoptosis by pro-inflammatory mediators of PMN tend to diminish with aging. Here, we investigated the role of protein tyrosine phosphatases (PTP), especially SHP-1, in the age-related altered PMN functions under GM-CSF stimulation. The inhibition of PTP suggested a differential effect of GM-CSF on phosphatase activity in modulating PMN functions with aging. The downregulation of phosphatase activity of immunopurified SHP-1 from lipid rafts of PMN of young donors was found significantly altered at 1 min of stimulation with aging. In young donors SHP-1 is displaced from lipid rafts at 1 min of stimulation, whereas in the elderly, SHP-1 is constantly present. We assessed in PMN lipid rafts the phosphorylation of tyrosine and serine residues of SHP-1 which regulates its activity. We observed an alteration in the phosphorylation of tyrosine and serine residues of SHP-1 in PMN of elderly subjects, suggesting that GM-CSF was unable to inhibit SHP-1 activity by serine phosphorylation. GM-CSF activates very rapidly Lyn and we found alterations in its activation and translocation to the lipid rafts with aging. We also demonstrate that SHP-1 in the PMN of elderly is constantly recruited to Lyn which cannot be changed by GM-CSF. In contrast, in the young the basal recruitment of Lyn could be reduced by GM-CSF. Our results suggest an alteration of the SHP-1 modulation by GM-CSF in lipid rafts of PMN with aging. These alterations could contribute to the decreased GM-CSF effects on aged PMN.

Introduction

Protein tyrosine phosphatases (PTP) act as the counterpart of protein tyrosine kinases (PTK) to maintain the homeostasis in the levels of tyrosine phosphorylation. Signal transduction elicited by a ligand in the cell can be viewed as a shift in this balance that activates cellular functions. Src homology domain containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) was first described in the early nineties by screening of a cDNA library of human breast carcinoma [1]. When it is recruited to the plasma membrane and activated, SHP-1 dephosphorylates proteins activated by receptors, hence inhibiting cell activation [2] as it was shown for the BCR signalling [3]. Jiao and co-workers showed that the main mechanism for Jak2 dephosphorylation by SHP-1 involves a direct, SH2-independent interaction with Jak2 [4]. It is of note that, the association was found to be strong in resting cells and was reduced during IFN α stimulation of a T-cell line [5]. Given the wide range of its ligand, it is likely that SHP-1 plays various roles in cells besides inhibition of cell activation, including maturation of receptors [6] and of cells like PMN or platelets [7 - 11], and that specific adaptor proteins mediate each of these roles. Moreover, it was shown that SHP-1 might be the phosphatase responsible for down-regulation of MAPK activation by G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) during the course of PMN maturation [10].

PMN represent the first line of defence against aggressions as they are the first cells to arrive at the site of the aggression where they can directly eliminate the invading organisms. GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) is not only a

modulator of granulopoiesis, but is also responsible for the priming of mature PMN to a second stimulation such as LPS or FMLP. GM-CSF elicits three important pathways in various cells and also in PMN where these pathways are responsible for cellular activation : (1) Jak/STAT, (2) MAP kinase and (3) PI3 kinase [12 – 15]. GM-CSF has been shown to rescue human granulocytes from spontaneous apoptosis via an increase in tyrosine phosphorylation of the well-known survival signaling pathways, including Jak/STAT, PI3K/Akt and Lyn [14, 16, 17]. Moreover, SHP-1 has been shown to be of critical importance for negative regulation of Src kinases elicited by GM-CSF, such as Lyn in immune cells, or Janus kinases, like Jak2, in PMN [2, 4, 18, 19, 20]. It was demonstrated that low enzymatic activity of SHP-1 was associated with increased neutrophils survival and that death receptor stimulation blocks the anti-apoptotic activity of GM-CSF, G-CSF, or IFN-gamma and leads to the recruitment of SHP-1 to the Fas death receptor [19]. Furthermore, the inhibition of phosphatase activity, by phenylarsine oxide (PAO), led to an increases in protein tyrosine phosphorylation level in eosinophils and in PMN [21]. Recent data show that 20–30% of total SHP-1 is located in the lipid rafts of unstimulated PC12 or A431 cells [22, 23] and in BYDP cells or primary thymocytes [24]. Lipid rafts are relatively ordered membrane domains that float in the disordered glycerophospholipid bilayer and their central feature is that they allow the lateral segregation of proteins within the plasma membrane [25]. Upon cross-linking of signaling receptors associated with lipid rafts, they become larger and more stable structure often attached to the cytoskeleton, a phenomenon called coalescence. Lipid rafts serve to spatially segregate signaling components in the plasma membrane so to regulate the initiation and prolongation of signalling [25].

Aging causes multiple defects in the functions of PMN notably for the production of ROS [26], chemotaxis and in the rescue from apoptosis by pro-inflammatory mediators [12]. Furthermore, the PMN signal transduction of GM-CSFR, FMLPR, Fc γ , and others is also altered with aging [27-36] and over the past few years, it has been demonstrated that these PMN specific receptor driven functions are altered with aging [12, 27, 32]. The importance of negative regulators of PMN receptors, such as GM-CSF receptor, in the alteration of the PMN functions has not yet been extensively studied. In this study we tested the possibility that altered regulation of GM-CSF signalling by the PTP SHP-1, which has been shown to be important in the regulation of GM-CSF signal transduction [3, 4, 18, 19, 20], is also a factor in the impairment of effectors functions in the elderly.

We provide evidence for the altered regulation of SHP-1 activity in the PMN of the elderly. SHP-1 was continuously activated and recruited to Lyn in the PMN of elderly donors. Moreover, we show that these alterations in the elderly are in part mediated by the impaired up-regulation of SHP-1 serine phosphorylation and down-regulation of tyrosine phosphorylation.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Anti-phosphotyrosine, clone 4G10 was from Upstate (Charlottesville, VA). Anti-SHP-1, anti-Lyn and Apoptosis Detection Kit (containing annexin V and PI) were from Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Phospho-Lyn was from Cell Signalling Technologies (Beverly,

MA). Recombinant Human GM-CSF, PTP inhibitor cocktail II, Bisindolylmaleimide I (PKC inhibitor), were from Calbiochem (San Diego, CA). Anti-phosphoserine was from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). DCFDA was from Molecular Probes (Burlington, ON). Bradford assay reagent was from Bio-Rad (Hercules, CA). Secondary antibodies were from Chemicon International (Temecula, CA). All other reagents were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) unless otherwise stated.

Subjects and PMN separation

Thirty-five Elderly volunteers aged 65 to 78 years (mean age 73 years) and Thirty-five young subjects aged 19 to 25 years (mean age 22 years) participated in the study. The lipid profile was determined by routine biochemical analysis and all the subjects were in good health, normolipidemic and satisfied the inclusion criteria of the SENIEUR protocol for immune investigations of human elderly subjects [37]. Citrated blood was obtained by venipuncture and neutrophils were isolated by Ficoll-Hypaque density sedimentation as already described [38]. Activation of neutrophils by the separation method was assessed by the measure of ROS production by cytochrome oxidation [38]. Cell viability was greater than 95% as measured by Trypan blue exclusion.

SHP-1 Immunoprecipitation and Phosphatase assay

Neutrophils (5×10^6 cells) were treated with or without stimuli, sedimented rapidly, left on ice for 5 min, and resuspended in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM EGTA, 5mM EDTA, 100 mM NaF, 2 mM NaVO₄, 1 mM PMSF, 10 mM NaPP, 1% triton, anti-proteases cocktail in 50 mM HEPES, pH 7,4). Lysates were cleared by centrifugation and

protein concentration was determined by the Bradford assay. 2 μg of SHP-1 antibodies were added to 250 μg of proteins in 250 μl wash buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaVO_4 , 0,1% NP-40 in 5 mM Tris pH 7,5) followed by an incubation O/N at 4°C while rotating end over end. 25 μl of a mixture of protein A/G sepharose was added and incubation was continued for 1 h 30 as already described [39]. The immunoprecipitates were washed with wash buffer (see above) and subjected to phosphatase assay. Phosphatase assays were carried essentially as described [40]. Briefly, immunoprecipitates were washed once with assay buffer (0.5 mM EGTA in 25 mM HEPES, pH 7.0) and then incubated with 200 μl of assay buffer containing 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate at 37 °C for 6h while shaking. Reactions were stopped by addition of 800 μl of 0.2 M NaOH, beads were sedimented by brief centrifugation, and phosphatase activity was assessed by measuring the absorbance at 420 nm of the supernatant. Results are shown as relative to SHP-1 enzymatic activity in unstimulated cells.

Isolation of lipid rafts

Neutrophils (2×10^7 cells) were treated as above except they were resuspended in 300 μl of ice-cold lipid rafts lysis buffer (100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM NaVO_4 , 1 mM PMSF, 0,5% triton, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin in 25 mM HEPES, pH 6,9). 300 μl of an 85% (w/v) solution of sucrose in HEPES-buffered saline was added to a final concentration of 42,5% and the solution was transferred to 2 ml ultracentrifuge tubes. The lysates were gently overlaid with 1 ml of sucrose 35% and 300 μl of sucrose 5%. Centrifugation were performed at 4°C for 16h at 200 000 xg in a Beckman TLA-100.4

rotor (Beckman Instruments, Montreal, QC). Nine fractions of 200 μ l each were collected from the top of the gradient. For the experiments, lipid rafts fractions used correspond to the 1-3 fractions while fractions 5 to 8 were used as non-rafts fractions, as already described [41, 42].

Measurement of ROS production by DCFDA cleavage

Neutrophils (1×10^6) in 500 μ l of complete RPMI were primed with 20 ng mL⁻¹ GM-CSF for 90 min at 37°C. If required, neutrophils were pre-incubated 30 min at 37°C with 50 μ M of PTP inhibitor II before priming and stimulation. These concentrations were determined as optimal in our experimental settings (data not shown). After priming, cells were loaded with 20 μ M DCFDA in PBS at 37°C for 15 min, then cells were stimulated and Fluorescence in the FL-1 channel was read with a FACScalibur from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ).

Immunoprecipitation and immunoblotting

For all immunoprecipitation (IP) other than SHP-1, they were done as already described earlier. In some experiments, PMN were pre-incubated for 1h with PTP inhibitor cocktail (50 μ M) or PKC (1 μ M) inhibitor prior to GM-CSF stimulation. After appropriate stimulation, PMN were resuspended in lysis buffer as described above and protein concentration determined by the Bradford assay. Appropriate antibodies (2 μ g) were added to 300 μ g of lysates proteins in 250 μ l of IP washing buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaVO₄, 0,1% NP-40 in 5 mM Tris pH 7,5) and incubated 2 h at 40C while rotating end over end. 25 μ l of a mixture of protein A/G sepharose was added and

incubation was continued for 1 h 30. After the last wash of the IP, proteins were incubated for 5 min at 95°C with 25 µl of 1X SDS gel loading buffer. The samples were resolved by 7,5% SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. The strips were blocked with 5% milk, or 3% BSA for anti-phospho antibodies, for 1h30 at room temperature. Following the blocking, the strips were probed and analyzed using the ECL detection system as already described [43]. Densitometric analyses were performed using an image analyzer, Chemigenius2 Bio Imaging System (Syngene, Frederick, MD) as already described [42].

Chemotaxis assay

Chemotaxis of freshly isolated neutrophils was assessed by the modified Boyden Chamber [38, 43]. Briefly, neutrophils were primed with 20 ng mL⁻¹ GM-CSF with 50 µM of PTP inhibitor cocktail (GM-CSF + PTP inhibitor) or without (GM-CSF) and chemotaxis assay toward 20 ng mL⁻¹ GM-CSF was carried for 2 h at 37°C. For the purpose of clarity the results for negative control (chemotaxis toward complete RPMI) and priming of PMN with PTP inhibitor alone are not shown as they were very low and of similar level. These conditions were determined as optimal in our experimental settings (data not shown).

Apoptosis assay

Freshly isolated neutrophils (1×10^6) were rapidly incubated with GM-CSF (20 ng mL⁻¹), PTP inhibitor (1 µM) in complete RPMI or with a combination of both as indicated in text for 18 hours. These concentrations were determined as optimal in our experimental

settings (data not shown). Not shown in the result is the rate of PMN apoptosis after 18h of culture in complete RPMI. They were consistently around 60-70% of apoptosis. Staining of cells was done with the apoptosis detection kit according to the manufacturer instructions. For the results, we considered as apoptotic both cells that stained for annexin V only (early apoptotic) and cells that stained for PI and annexin V (late apoptotic) as already described [44].

Statistical analysis

All the statistical calculations were done by GraphPad PRISM (San Diego, CA). Data were analysed by one-way ANOVA using the Bonferroni correction. $P < 0,05$ is considered as statically significant.

Results

Determination of the role of SHP-1 in PMN functions. GM-CSF is a well known modulator of PMN functions which were found previously altered with aging [12, 26 – 28, 31, 33, 35, 44, 54] and reconfirmed here (Fig 1A, B and C, and filled bars). For the PMN of young and elderly donors incubations with the PTP inhibitor cocktail followed by GM-CSF stimulation resulted in a significant increase in ROS production ($p < 0.05$) and chemotaxis ($p < 0.01$) (Fig. 1A and 1B). It is of note that the PTP inhibitor cocktail induced a significant increase in ROS production in PMN of elderly ($p < 0.001$) compared to that of GM-CSF alone. This modulation by PTP inhibitor was not observed for chemotaxis (data not shown). Nevertheless, this could suggest a deregulation of

phosphatase activity, including SHP-1, in PMN with aging. This was further confirmed when we measured PMN apoptosis after 18h of culture. In PMN of young subjects either PTP inhibitor or PTP inhibitor and GM-CSF treatment blunted the GM-CSF apoptosis rescuing effect. In contrast the preincubation of PMN of elderly with PTP inhibitor before the 18h culture with GM-CSF resulted in the recovery of the lost GM-CSF induced rescue from apoptosis (Fig. 1C). Altogether these results suggest a differential effect of GM-CSF on phosphatase activity in modulating PMN functions with aging.

Measurement of SHP-1 activity under GM-CSF stimulation in PMN of young and elderly subjects. As we have shown altered functions of PMN under GM-CSF stimulation as well as a deregulation of PTP activities with aging, we reasoned that PTP, especially SHP-1 since it is the major negative regulator of the pathway elicited by GM-CSF, might play a role in that phenomenon. We immunoprecipitated SHP-1 from GM-CSF stimulated PMN of young and elderly donors and measured its enzymatic activity using pNPP as a substrate. At the quiescent status the SHP-1 activity (DO at 420 nm) in PMN of elderly subjects was found significantly higher compared to that of young subject (0.274 ± 0.012 vs. 0.154 ± 0.014 respectively; $p < 0.05$) in the whole cell lysates. Stimulation of PMN from young donors causes a significant reduction ($p < 0.001$) in the activity of SHP-1 at 1 min isolated from whole cell lysates compared to the basal status (Fig. 2A). This inhibition by GM-CSF seems to be biphasic as it occurs again after 30 min of stimulation. To the contrary, GM-CSF stimulation on PMN of elderly donors could not inhibit the activity of SHP-1 (Fig. 2B, filled bars) at any of the stimulation times used. Adding 2 mM of PTP inhibitor sodium orthovanadate to the assay mixture totally abrogated

phosphatase activity of immunopurified SHP-1 in both age groups (data not shown). To assess the specificity of the SHP-1 downregulation to GM-CSF stimulation we verified if LPS stimulation of PMN could have an influence on SHP-1 activity by using $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPS and the same time points of stimulation. Stimulation with LPS did not induce any changes in SHP-1 activity from basal status in the young or in the elderly donors (data not shown).

Since membrane lipid rafts are now known as platform with a purpose in amplifying signal transduction [45] and that 20 to 30% of SHP-1 has been shown to be in lipid rafts with no data in PMN, we tested if SHP-1 activity modulation was also altered in membrane lipid rafts of the elderly. SHP-1 activity was lower in lipid rafts at the quiescent status but there was no statistical difference between young and elderly donors ($\text{DO}_{420 \text{ nm}}$: 0.038 ± 0.005 vs. 0.030 ± 0.008 respectively). Similarly to the whole cell lysates, there was a significant inhibition ($p < 0.05$) of SHP-1 activity in lipid rafts of the young donors following 1 min of stimulation with GM-CSF (Fig. 2B). However, longer stimulation with GM-CSF did not cause a sustained inhibition of SHP-1 activity in lipid rafts, in contrast to the whole cell lysates (30 min in 2B vs. 30 min in 2A). When PMN were isolated from elderly donors and stimulated with GM-CSF, there were no changes whatsoever in the levels of SHP-1 activity with regards to times of stimulation (Fig. 2B, filled bars). We also evaluated SHP-1 activity in the non-rafts fractions where the activity stayed around the basal value for all the GM-CSF stimulation time used and no differences could be demonstrated with aging (data not shown). Again, the use of sodium

orthovanadate in the assay mixture reduced to the background value the level of SHP-1 activity in both age groups (data not shown).

Expression of SHP-1 in lipid rafts and in whole cell lysates in human PMN. One possible explanation for the increased SHP-1 activity observed in the elderly could be an over expression of this enzyme in the cytoplasm and/or in lipid rafts relative to the young donors. Taking into account the results of Fig 2 and the lack of data whether SHP-1 could be associated to lipid rafts in PMN we determined the expression of SHP-1 in lipid rafts and whole cell lysates with an anti-SHP-1 antibody. Figure 3A clearly shows that the expression of SHP-1 in the whole cell lysates is the same in the PMN of young and elderly donors and rule out this factor as a possible explanation for the differences seen in its enzymatic activity with aging at basal and GM-CSF stimulated status. We next studied the expression of immunopurified SHP-1 in the lipid rafts of PMN of young and elderly donors. Using fractions 1 to 3, corresponding to the fractions highly expressing the lipid raft marker GM-1 (as described in materials and methods), and no difference was found in SHP-1 expression in lipid rafts of quiescent PMN of the studied age-groups. Stimulation with GM-CSF causes a rapid disappearance at 1 min of SHP-1 from the lipid rafts in the PMN of young donors compared to the basal status (Fig. 3B, young and 3D, open bars, $p < 0.05$). However, SHP-1 is recruited again to lipid rafts with longer stimulation and returned to the basal level (Fig. 3B). SHP-1 was detected also in the non-rafts fractions but the expression of SHP-1 protein in the non-rafts fractions (number 5 to 8) of the plasma membrane did not change with the time of GM-CSF stimulations used and there were no notable differences with aging (data not shown). In contrast, this effect

could not be seen with aging as it is shown in figure 3B (elderly) and 3C (filled bars) that there is no dissociation of SHP-1 from the lipid rafts at 1 min of stimulation. Moreover, SHP-1 association to lipid rafts in PMN of elderly donors remains strong at any time of stimulation with GM-CSF. These results indicate that SHP-1 should be displaced by GM-CSF from lipid rafts for being inhibited in PMN of young subjects and this is not the case in PMN of elderly suggesting that the mechanisms responsible for the regulation of phosphatase activity and localisation to lipid rafts are altered.

Phosphorylation of tyrosine and serine residues of SHP-1 at basal and GM-CSF stimulated status in whole cell lysates and lipid rafts. After having seen altered phosphatase activity and an impairment of lipid rafts dissociation, we next sought to study the phosphorylation state of SHP-1 following GM-CSF stimulation. SHP-1 can be phosphorylated on serine and tyrosine residues in its C-terminal domain. Tyrosine phosphorylation has an enhancing effect on SHP-1 activity [46 - 48] whereas serine phosphorylation has a strong inhibiting effect on SHP-1 phosphatase activity [40, 49]. We were able to study the phosphorylation status of SHP-1 on these critical residues in whole cell lysates of PMN. Figure 4A (young) shows a gradual decrease in tyrosine phosphorylation of SHP-1 in the PMN of young donors while serine phosphorylation remained unchanged throughout stimulation. For the elderly donors, Figure 4A (elderly) shows no changes in the level of serine and tyrosine phosphorylation in GM-CSF stimulated PMN. This correlates well with the lack of modulation of SHP-1 activity by GM-CSF in whole cell lysates of PMN from elderly. Our findings in whole cell lysates indicate some discrepancies between the attributed roles of C-terminal phosphorylation

and the decreased SHP-1 activity measured for 1 min of GM-CSF stimulation as neither tyrosine nor serine phosphorylation was found to be modulated by GM-CSF (Fig. 2A and Fig. 4A). In contrast, there is a significant decrease ($p < 0.001$) of tyrosine phosphorylation at 30 min relative to unstimulated state while serine phosphorylation is maintained at 30 min (Fig. 4A) in PMN of young subjects in accordance with the significant decrease of SHP-1 activity measured at 30 min under GM-CSF stimulation (Fig. 2A, $p < 0.01$).

After the slight variations seen in serine and tyrosine phosphorylation levels of SHP-1 in whole cell lysates, we studied the possible differences in lipid rafts. At basal status (Fig. 4B, young) the tyrosine phosphorylation of SHP-1 is much stronger than that of serine phosphorylation. This suggests an activation of SHP-1 at basal level in lipid rafts in accordance with its inhibitory role in PMN activation. In contrast, in PMN of elderly (Fig. 4B, elderly) at basal status the SHP-1 phosphorylation is in favour of serine phosphorylation, indicating a shift toward the inhibition of SHP-1 activity in accordance with the basal activated status of PMN found in elderly subjects. Moreover, we can see in Figure 4B, (young) that tyrosine phosphorylation of SHP-1 in young donors is significantly decreased at 1 min ($p < 0.05$) of GM-CSF stimulation in comparison of the basal status. Longer stimulation with GM-CSF restores tyrosine phosphorylation to level of resting state. For serine phosphorylation, there is a significant ($p < 0.05$) increase compared to unstimulated level at 1 min and 30 min of stimulation. These also indicate that the most important modulation of SHP-1 activity is occurring in relation to lipid rafts in PMN of young subjects. For the elderly however, the pattern of SHP-1 tyrosine and

serine phosphorylation is strongly altered. First, instead of a strong tyrosine phosphorylation of SHP-1 as seen in the young, there is practically no tyrosine phosphorylation in the unstimulated state (Fig. 4B, young vs. elderly). Upon stimulation with GM-CSF, there is a high increase of tyrosine phosphorylation ($p < 0.001$) at 5 min and 30 min in elderly donors indicating that SHP-1 activity is stimulated instead of being inhibited. For serine phosphorylation, there are no significant changes in time with GM-CSF stimulation in the elderly. As an overall result, there is a relatively higher serine phosphorylation in the elderly compared to tyrosine phosphorylation for all the times of the GM-CSF stimulation used. These results suggest that the alterations in the GM-CSF induced regulation of SHP-1 activity with aging is in part mediated by altered phosphorylation of residues critical for SHP-1 regulation.

Alterations in the activation and translocation to the Lipid Rafts of the Src kinase Lyn with aging. Lyn is one of the first molecules activated via tyrosine phosphorylation by GM-CSF and we found earlier an alteration in Lyn phosphorylation in PMN with aging [50]. Thus, we next investigated the expression and activation of Lyn in whole cell lysates and in lipid rafts using PTP and PKC inhibitors to assess the eventual role of SHP-1 in this phenomenon. The Src kinase Lyn is one of the important tyrosine kinase for GM-CSF signal transduction with Jak2 [17, 51]. When PMN were treated with GM-CSF there is a strong significant phosphorylation of Lyn in the young donors (Fig. 5A, young and open bars, $p < 0.001$) over unstimulated state. If the PMN are pre-incubated with a PTP inhibitor cocktail without further stimulant (no GM-CSF) we see a level of Lyn activation that is the same to that occurring under stimulation with GM-CSF alone

(Fig. 5A, young and open bars). Surprisingly, if PMN are pre incubated with the PTP inhibitor cocktail and then stimulated again with GM-CSF there is no further increase in the phosphorylation of Lyn compared to GM-CSF alone. These results show that GM-CSF stimulation of PMN or relief of SHP-1 inhibition by PTP inhibitor cocktail are able to induce a strong Lyn activation, but do not act in synergy to increase it. As it is possible to inhibit SHP-1 activity by using a PTP inhibitor, it is also feasible to stimulate SHP-1 activity by using a PKC inhibitor (Bisindolylmaleimide I). The inhibition of PKCs will reduce serine phosphorylation in the C-terminal domain of SHP-1 and thus stimulates its activity as evidences point to an inhibitory role for this residue [40, 49]. Pre-incubation of PMN with PKC inhibitor followed by stimulation with GM-CSF did not result in a phosphorylation of Lyn (Fig. 5A, young and open bars). These results suggest that the GM-CSF could not overcome the anti PKC induced activation of SHP-1. For the elderly donors, figure 5A (elderly, and filled bars) confirms the peculiar increased phosphorylation in resting PMN. Despite a strong basal phosphorylation in resting PMN, stimulation with GM-CSF did not result in a significant increase in Lyn phosphorylation (Fig 5A, elderly and filled bars). As it was already shown this is characteristic of the PMN from elderly donors as they are unable to mount an appropriate response following stimulation [12, 50]. This correlates also with the lack of modulation of the SHP-1 phosphorylation in serine by GM-CSF in PMN of elderly subjects (Fig. 4A and 4B, elderly).

As Lyn has been shown to be present in lipid rafts in Mast Cells and B Cells [52, 53] we wondered whether differences in Lyn lipid rafts expression of human PMN exist. Indeed

in resting PMN from young donors, only small amount of Lyn is present in the lipid rafts and is further recruited upon stimulation with GM-CSF (Fig. 5B, young and open bars, $p < 0.05$). The eventual role of PTPs and SHP-1 in Lyn lipid rafts mobility was again studied by using PTP inhibitor cocktail and PKC inhibitor. Interestingly, PTPs (including SHP-1) maintain the low level of recruitment of Lyn to lipid rafts because a vigorous recruitment of Lyn is seen when PTPs are inhibited (Fig. 5B, young and open bars, $p < 0.001$) which is not further increased after GM-CSF stimulation. In contrast, PKCs are involved in the recruitment of Lyn to lipid rafts as their inhibition abrogates Lyn recruitment even under GM-CSF stimulation (Fig. 5B, young and open bars). For the elderly donors, we see a stronger presence of the two isoforms of Lyn in the lipid rafts both for resting and GM-CSF stimulated PMN (Fig. 5B, elderly and filled bars). Inhibition of PTPs did not cause more Lyn recruitment in the lipid rafts of the elderly compared to the basal and GM-CSF activated status. PKC inhibitor have the opposite effect of that seen in the young donors as there is actually more Lyn recruited to lipid rafts especially under GM-CSF stimulation ($p < 0.001$).

As for the activation by phosphorylation of Lyn in lipid rafts, there is a strong tyrosine phosphorylation of Lyn in lipid rafts of PMN from young subjects following GM-CSF stimulation (Fig. 5C, young and open bars, $p < 0.01$) compared to the basal status. In contrast, there is no phosphorylation of Lyn with GM-CSF stimulation in PMN of elderly donors compared to the higher phosphorylated basal status (Fig. 5C, elderly and filled bars). The use of PTP inhibitors influenced the phosphorylation status of Lyn compared to the basal status in the young (Fig. 5C, young and open bars) in accordance with the

strong recruitment of Lyn in lipid rafts. No significant modulation of pLyn in rafts compared to basal status could be observed in PMN of elderly (Fig. 5C, elderly and filled bars).

Interactions of SHP-1 with Src Lyn are altered with aging. Considering the altered SHP-1 activity with aging under GM-CSF stimulation and our data on SHP-1 lipid rafts association in this present study as well as the previous data concerning pLyn in lipid rafts (Fig. 5C), we next studied the physical interactions of SHP-1 with the Src kinase family member Lyn. We performed immunoprecipitation experiments in lipid rafts with Lyn antibody to study the interactions between SHP-1 and Lyn. In the young donors we demonstrate an association of SHP-1 and Lyn in resting PMN. This association in the resting PMN is lost at 1 min of stimulation (Fig. 6A and 6B) with GM-CSF. SHP-1 is then recruited back to Lyn at 5 min to a level similar to basal state. Then at 30 min of stimulation with GM-CSF there is again a strong dissociation between SHP-1 and Lyn. We also observe the same pattern in the whole cell lysates of young donors (data not shown). In striking contrast for the lipid rafts of elderly donors, figure 6A shows a very faint association in unstimulated PMN suggesting that the increase in tyrosine phosphorylation of Lyn with aging [50] is possibly induced by altered recruitment of SHP-1 to Lyn. Remarkably, instead of the physical dissociation seen in the young under GM-CSF stimulation, there is a constant and strong recruitment of SHP-1 to Lyn up to 30 min of stimulation in the lipid rafts of PMN of the elderly donors (Fig. 6). These data indicate that SHP-1 is physically linked to Lyn at basal status in PMN of young in contrast to PMN of elderly subjects. After GM-CSF stimulation there is a rapid

dissociation in young subjects while in PMN of elderly there is a strong recruitment. Moreover, this mobility in and out of lipid rafts determines also the SHP-1 activity (Fig. 2B and 3B).

Discussion

The PMN functions and receptor driven functions have been demonstrated to be altered with aging [12, 27 - 36]. The alterations of the signal transduction manifested by altered tyrosine kinase phosphorylation during various PMN receptor stimulations, including GM-CSF and FMLP, could partly explain this impairment with aging. However, the importance of negative regulators of PMN receptors, including GM-CSF receptor, in the alteration of the effector functions has not been extensively studied. In this study we have undertaken to test the possibility that altered regulation of cytokine signalling by PTP is also a factor in the impairment of effector functions in the elderly.

Aging causes multiple defects in the functions of PMN notably in the production of ROS [26], in chemotaxis and in their rescue from spontaneous apoptosis by pro-inflammatory mediators [12, 54]. Our results showed, for both age-groups, that decreasing the inhibiting effects of phosphatases, including SHP-1, by the use of a PTP inhibitor cocktail prior to GM-CSF stimulation resulted in an increase in ROS production and chemotaxis. It is of note, that for young donors the PTP inhibitor cocktail alone was not able to cause ROS production, whereas for elderly donors the inhibition of PTP was enough to induce ROS production. In case of chemotaxis, incubating the PMN with the PTP inhibitor alone was not able to cause chemotaxis in any age groups. This suggests that PTPs may

not be an inhibiting factor for chemotaxis. The suspected age-related alterations in the effects of GM-CSF on phosphatase activity became mostly evident when PMN from young and elderly donors were cultured during 18h in the presence of PTP inhibitor and GM-CSF. In PMN of young subjects either PTP inhibitor or PTP inhibitor followed by GM-CSF stimulation blunted the GM-CSF apoptosis rescuing effect. In a similar manner, it was shown that $1\mu\text{M}$ of the PTP inhibitor phenylarsine oxide (PAO) accelerated apoptosis compared to medium alone in Eosinophils and in PMN [21]. In contrast, in the elderly, PTP inhibition before the 18h culture resulted in the recovery of the lost GM-CSF induced rescue from apoptosis. These data on the modulation of PTP activities in relation to GM-CSF induced PMN functions revealed a differential regulation of PTPases in PMN with aging.

SHP-1 is well known to be a negative regulator of signal transduction [2, 18, 19, 20, 55, 56], and it has been shown to be of critical importance for negative regulation of kinases, such as the Jak kinase or the Src kinase Lyn, elicited by GM-CSF in PMN or others immune cells [2, 4]. Our present study demonstrates that SHP-1 phosphatase activity cannot be down-regulated following a 1 min stimulation with GM-CSF in the PMN of the elderly donors in contrast of PMN of young donors. A similar lack of down regulation was observed during the EGF receptor stimulation in fibroblasts as the aging caused attenuation of signalling could be mediated in part by this increased PTPase activity [57]. Recently, lipid rafts have been shown to be an important platform for cellular signal transduction in various cells including PMN [24, 25, 58, 59]. We have also shown the presence of lipid rafts in PMN of young and elderly donors [12]. Thus, we mainly

focused our present study on SHP-1 modulation in relation to lipid rafts. In contrast to the whole cell lysates, in the lipid rafts from PMN of elderly the SHP-1 is continuously present, whereas in the PMN of young donors SHP-1 is dissociated, at 1 min of stimulation, by GM-CSF and is recruited back for longer period of stimulation. These studies show two alterations in the elderly compared to the young donors: SHP-1 activity is not down regulated and is steadfastly present in lipid rafts during GM-CSF stimulation. This pattern of association in the lipid rafts of the PMN of the young correlates well with the measurement of SHP-1 activity (Fig. 2A vs. Fig. 3B), i.e., there is a rapid dissociation from the lipid rafts associated with the decrease in phosphatase activity. Longer times of stimulation restore both recruitment to lipid rafts and phosphatase activity.

SHP-1 can be phosphorylated on serine and tyrosine residues in its C-terminal domain. Tyrosine phosphorylation has an enhancing effect on SHP-1 activity, whereas serine phosphorylation has a strong inhibiting effect on SHP-1 activity [40, 46 - 49]. Our results demonstrated some contradictory data between the measured SHP-1 activity (Fig. 1A) and the tyrosine and serine phosphorylation (Fig. 4A) in whole cell lysates of both age-groups. We do not have an explanation for these discrepancies. However, the possibility has been raised that another layer of regulation exists in the C-terminal domain of SHP-1 for its *in vivo* phosphatase activity modulation [60]. In contrast, in the lipid rafts, the serine and tyrosine phosphorylation correlated well with the observed SHP-1 activity alterations with aging. In the lipid rafts, we see several alterations in PMN with aging in tyrosine and serine phosphorylation. As an overall result, there is a relatively higher serine phosphorylation in the elderly compared to tyrosine phosphorylation at any times.

As a higher serine phosphorylation status of SHP-1 has an inhibiting effect on its activity, this is in accordance with the fact that PMN were found to have an altered increase of Lyn and MAPK activation at the basal status and that no further activation was possible [50]. In contrast, in young subjects the balanced changes in tyrosine and serine phosphorylation of SHP-1 in lipid rafts of the PMN reflect the GM-CSF induced changes in SHP-1 activity.

Lyn is one of the first molecules activated via tyrosine phosphorylation by GM-CSF [17] and we found earlier an alteration in Lyn phosphorylation in PMN with aging [50]. When PMN are treated with GM-CSF there is a strong phosphorylation of Lyn in the young donors over unstimulated state whereas it is only weak for the elderly donors despite a stronger basal phosphorylation in whole cell lysates. The stronger basal phosphorylation seen in the elderly suggests that PMN were already primed for action and is characteristic for the PMN of the elderly. This is the consequence of a low-grade chronic inflammation occurring with aging and is called the "Inflamm-aging" theory. This states that this increased basal age-related chronic inflammatory activity resulting from a lifelong antigenic load, is detrimental for longevity [61].

To our best knowledge, we demonstrate for the first time in this paper that the Src kinase Lyn can be recruited to the lipid rafts in human PMN as it was already shown for other Src kinases during TCR signalling [24] and Fc γ ligation in PMN [62]. In resting PMN from young donors, only a small amount of Lyn is present in the lipid rafts and is further recruited upon stimulation with GM-CSF. Interestingly, PTP, including SHP-1, maintain

the low level of recruitment of Lyn to lipid rafts because a vigorous recruitment of Lyn is seen when PTP are inhibited which is not further increased after GM-CSF stimulation. In contrast, PKC are involved in the recruitment of Lyn to lipid rafts as their inhibition abrogates Lyn recruitment even under GM-CSF stimulation. For the elderly donors, we see a stronger presence of the two isoforms of Lyn in the lipid rafts both for resting and GM-CSF stimulated PMN possibly because SHP-1 activity is reduced in lipid rafts of elderly, but we have no precise explanation for this phenomenon.

We found a strong tyrosine phosphorylation of Lyn in lipid rafts of PMN from young subjects following GM-CSF stimulation compared to the almost non phosphorylated basal status. In contrast, there is no phosphorylation of Lyn with GM-CSF stimulation in PMN of elderly donors compared to the higher phosphorylated basal status. Similar situation has been already demonstrated for MAP kinases in PMN of elderly [44, 50]. The use of PTP inhibitors influenced the phosphorylation status of Lyn compared to the basal status in the young in accordance with the strong recruitment of Lyn in lipid rafts. This indicates that the inhibition of phosphatase activity, including SHP-1, is necessary to maintain pLyn in rafts as it is also suggested by the use of PKC inhibitor which stimulates SHP-1 activity. No significant modulation of pLyn in rafts compared to basal status could be observed in PMN of elderly. Altogether, these results suggest that SHP-1 not only participates to the negative regulation of Lyn, but also to the maintenance in its inactive form in lipid rafts.

Our present data confirmed the interactions between SHP-1 and Lyn, as it was already shown by Daigle *et al.* [19]. We found this interaction in lipid rafts of resting PMN of the young donors which was lost with stimulation, whereas there was a faint interaction in resting PMN of the elderly and a constant recruitment of SHP-1 to Lyn following stimulation. Putting in parallel the measured SHP-1 activity and Lyn phosphorylation as well as their interactions, we can suggest that the inhibition of SHP-1 activity at 1 min of GM-CSF stimulation is concomitant with the dissociation of SHP-1 from Lyn. This indicates that in the lipid rafts as long as SHP-1 is present, Lyn is not tyrosine phosphorylated and is excluded. At 1 min of GM-CSF stimulation, SHP-1 is displaced from lipid rafts, Lyn is then recruited to lipid rafts and tyrosine phosphorylated (Fig. 7). These results suggest that the positive or negative regulation of GM-CSF signal transduction is mediated in part by a regulated interaction of SHP-1 with the Src kinase Lyn. Similarly, SHP-1 was shown to bind to caspase-8 constitutively and LPS stimulation disrupted this association permitting the tyrosine phosphorylation of caspase-8 in PMN [63]. This mechanism resembles also the activation of Lck in T-cells by CD45, a receptor-like PTP [2, 56]. In resting T-cells, an adaptor protein called PAG recruit Csk, a PTK, to the lipid rafts where it maintains Lck inactive by tyrosine phosphorylation of an inhibiting residues. In TCR-stimulated T-cells, CD45 dephosphorylate PAG thereby resulting in dissociation of Csk from lipid rafts and activation of Lck [2, 56]. In striking contrast for the lipid rafts of elderly donors there is a very faint association in unstimulated PMN and instead of the physical dissociation seen in the young under GM-CSF stimulation, there is a constant and strong recruitment of SHP-1 to Lyn. These data

further indicate that SHP-1 is physically linked to Lyn at basal status in PMN of young in contrast to PMN of elderly subjects.

In an attempt to explain the discrepancies of the regulation of SHP-1 observed between young and elderly donors, we looked for possible alterations in the physical characteristics of PMN. Membrane cholesterol staining with filipin and measurement of the resultant fluorescence intensities by a flow cytometer revealed no differences whatsoever between the PMN of young and elderly donors (data not shown). This is in sharp contrast to what is found in T-Cells with aging [42]. Assessing the membrane fluidity of PMN by anisotropy with a fluorescent probe (DPH) yielded again to no differences between young and elderly (data not shown). In contrast, the measurement of protein oxidation revealed that there were more oxidation of proteins in the whole cell lysates of PMN of elderly, than in young donors, both at resting and GM-CSF stimulated state (data not shown). Furthermore, significantly increased levels of acute phase proteins such as CRP, fibrinogens, haptoglobin and the inflammatory cytokine IL-6 in the plasma of elderly healthy subjects has been reported [64]. This is likely to contribute to the low-grade inflammation in the elderly and could negatively affect the immune response. However, this was not the case for our own donors. Other factors not studied in our present work, for example myristoylation or N-glycosylation, could also act to regulate SHP-1 activity. Further experiments are needed to study the alterations of the regulatory mechanisms that target SHP-1 to lipid rafts in PMN with aging.

In conclusion, the alterations of SHP-1 modulation by GM-CSF in lipid rafts in PMN with aging could contribute to the age-related impairment of PMN functions. These alterations of signaling with aging are likely to contribute to the decrease of PMN functions leading to increased susceptibility to infections, cancers, autoimmune disorders and inflammation-based pathologies. The involvement of phosphatase in cellular functions alteration with aging was underestimated. However, more studies are needed to determine to which extent they contribute to immunosenescence.

Acknowledgements

This work was supported by a grant-in-aid from the Canadian Institute of Health Research (No. 63149) and the Research Center on Aging of Sherbrooke. We thank the Clinical Research Center for assistance and support.

Figures

Figure 1

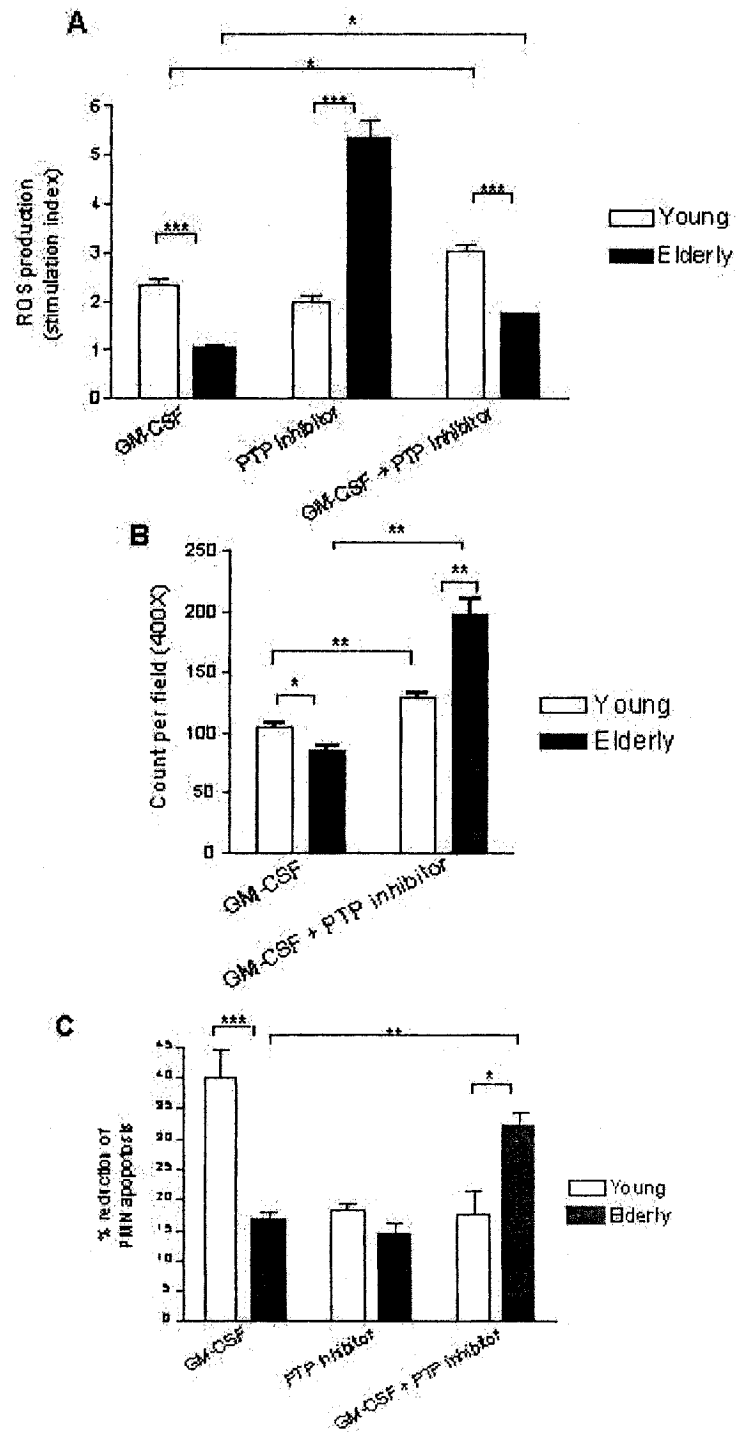


Figure 1. Determination of the role of SHP-1 in PMN functions. Functions of human PMN from young and elderly donors were studied either after incubation with PTP inhibitor cocktail or after priming with 20 ng mL⁻¹ of GM-CSF. (A) Measurement of ROS production with DCFDA as described in *materials and method* was done by FACScan analysis. Data are shown as a mean \pm SEM of stimulation index (mean fluorescence intensities of the stimulated cells relative to mean fluorescence intensities of loaded quiescent cells) for PMN from 4 different young (empty bars) and 4 different elderly donors (filled bars). (B) The primed PMN were put in the upper wells of Boyden chambers and chemotaxis evaluated towards 20 ng mL⁻¹ GM-CSF, as a chemoattractant, in the lower wells. After 2 hours of migration at 37°C, the filter was stained. Ten to fifteen fields were counted for each condition at a 400X magnification. The data are shown as the mean \pm SEM of number of PMN which migrated from 3 different young (empty bars) and 3 different elderly donors (filled bars). For clarity, the value obtained with PTP inhibitor alone is not indicated since it was not different from zero. (C) Measurement of PMN apoptosis. Staining of PMN was done with the apoptosis detection kit by FACScan according to the manufacturer instructions described in *materials and methods*. The data are shown as the mean \pm SEM of PMN rescued from apoptosis (relative to PMN cultured 18h with medium alone) from 6 different young (empty bars) and 6 different elderly donors (filled bars). Significant differences between young and elderly donors are depicted as followed: * = p <0.05; ** = p <0.01; *** = p <0.001.

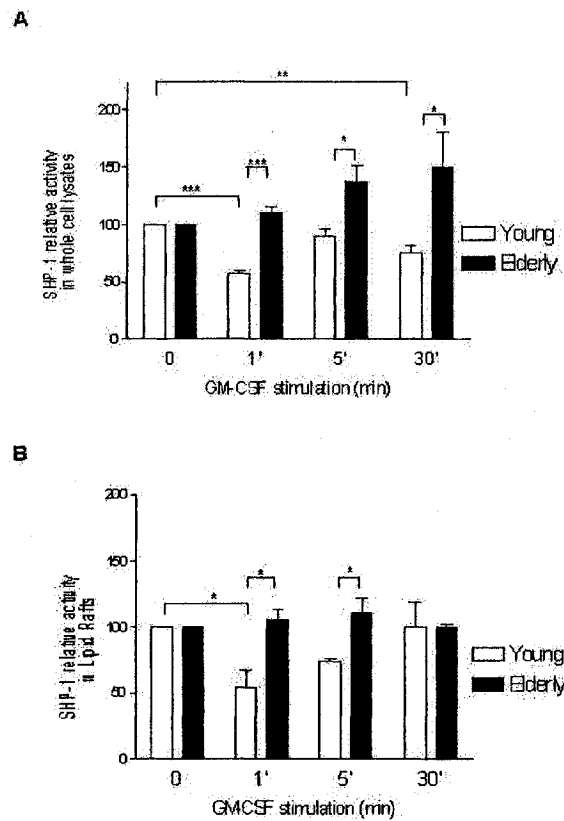


Figure 2. Measurement of SHP-1 activity under GM-CSF stimulation in PMN of young and elderly subjects. The SHP-1 immunoprecipitates obtained from whole cell lysates (A) or from membrane lipid rafts (B) of GM-CSF stimulated human PMN were incubated with 20 mM pNPP in assay buffer. Results shown are phosphatase activities of SHP-1 of stimulated PMN relative to unstimulated PMN. Activity without any treatment was set to 100%. (A) Data represents the mean values \pm SEM of 8 different young (empty bars) and 8 different elderly donors (filled bars). (B) Data represents the mean values \pm SEM of 3 different young (empty bars) and 3 different elderly donors (filled bars). Significant differences between young and elderly donors are depicted as followed: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

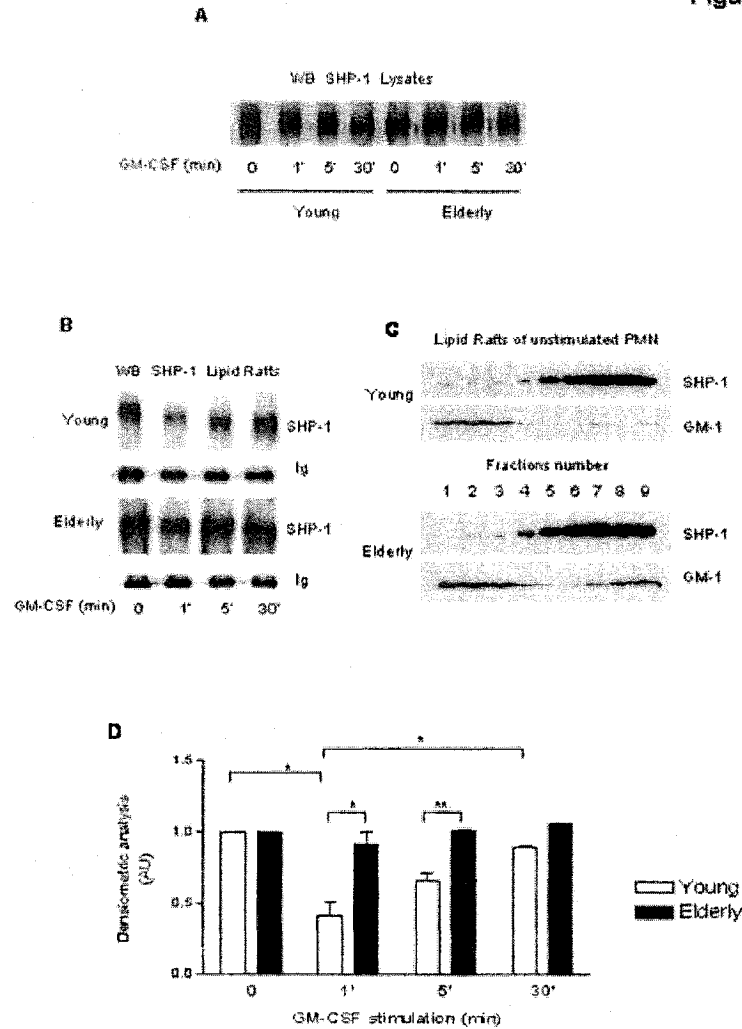


Figure 3. Expression of SHP-1 in lipid rafts and in whole cell lysates in human PMN. PMN from young and elderly donors were stimulated for the indicated times with 20 ng mL⁻¹ of GM-CSF. The cell lysates and isolated lipid rafts from fractions 1 to 3 or from fractions 1 to 9, as shown by the GM-1 staining, were probed directly with anti-SHP1 antibody (A, and B). Ig bands in (B) are shown as loading control. Densitometric analysis is shown in (D) from the immunoblot in (B) and intensities are relative to unstimulated state. Experiments were performed from 5 different donors of each age-groups (young, empty bars; elderly, filled bars) with similar results. Significant differences between young and elderly donors are depicted as followed: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

Figure 4A

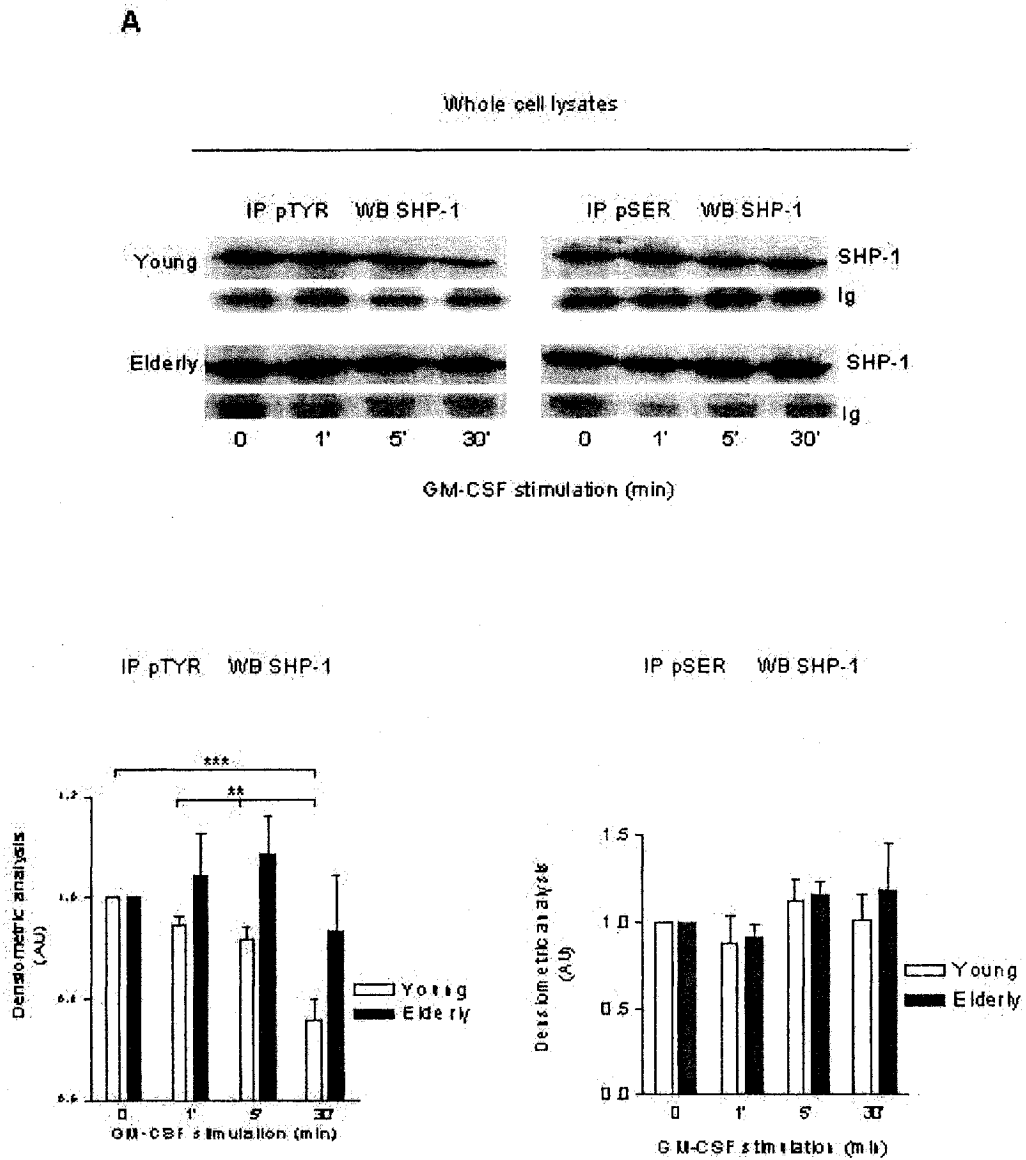


Figure 4B

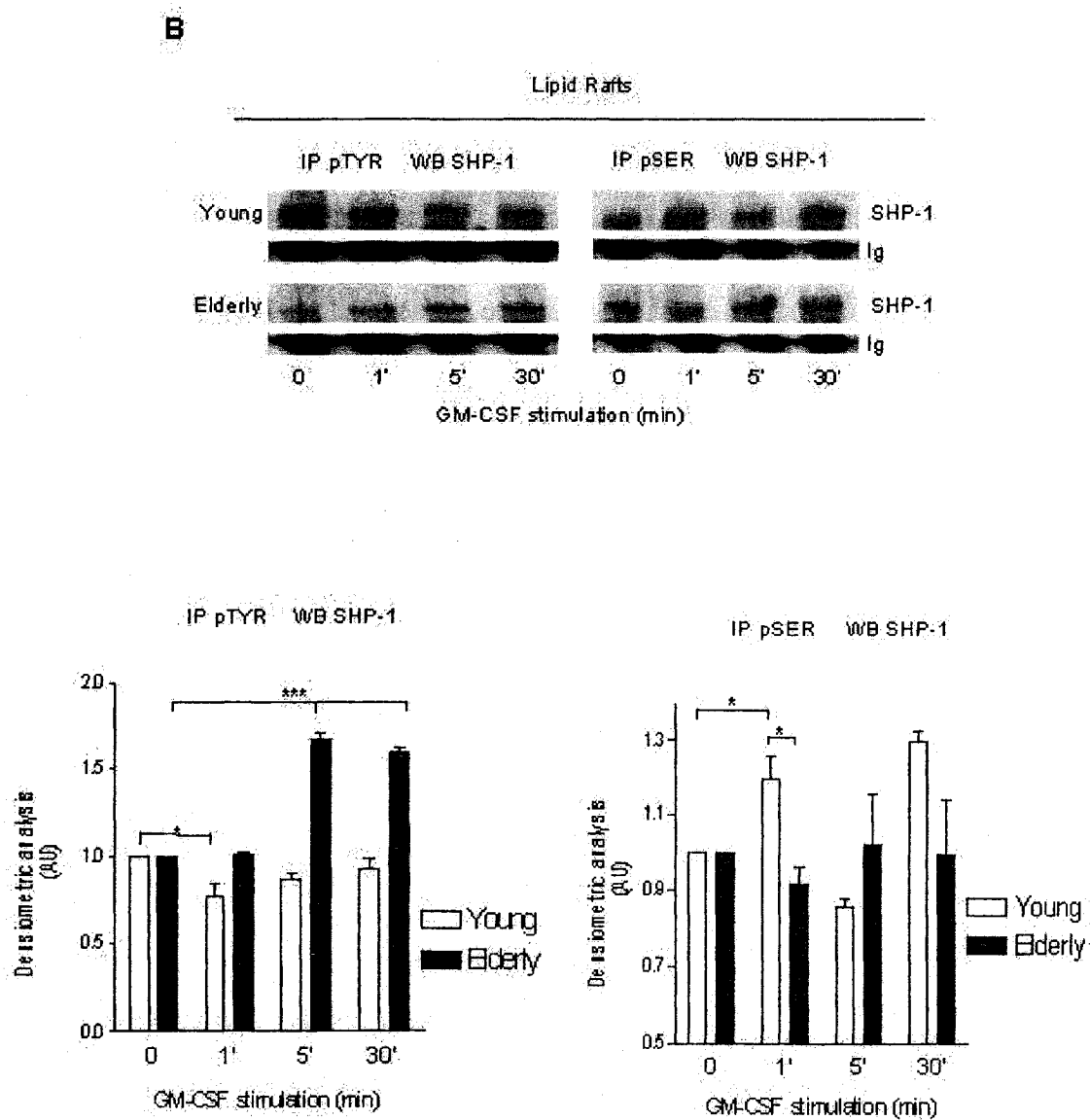


Figure 4. Phosphorylation of tyrosine and serine residues of SHP-1 at basal and GM-CSF stimulated status in whole cell lysates and lipid rafts. PMN from young and elderly donors were stimulated with 20 ng mL⁻¹ of GM-CSF and whole cell lysates (A) or lipid rafts (B) were subjected to immunoprecipitation with 2 µg of either anti-phosphotyrosine antibody or anti-phosphoserine antibody. Immunodetection was carried on with an anti-SHP-1 antibody. Ig bands are shown as loading control. Densitometric analyses corresponding to the blots are shown in the lower panel. Experiments were performed from 4 different donors of each age-groups (young, empty bars; elderly, filled bars) with similar results. Significant differences between young and elderly donors are depicted as followed: * = p < 0.05; *** = p < 0.001.

Figure 5 A

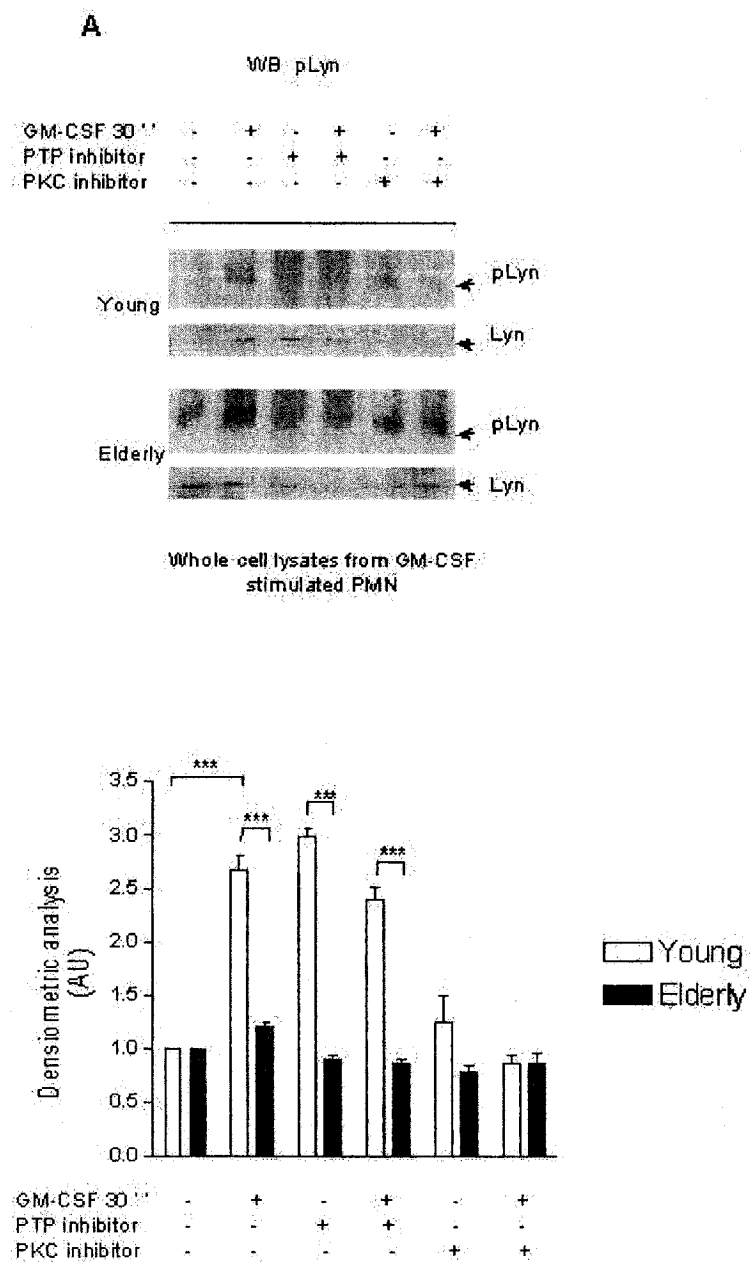


Figure 5 B

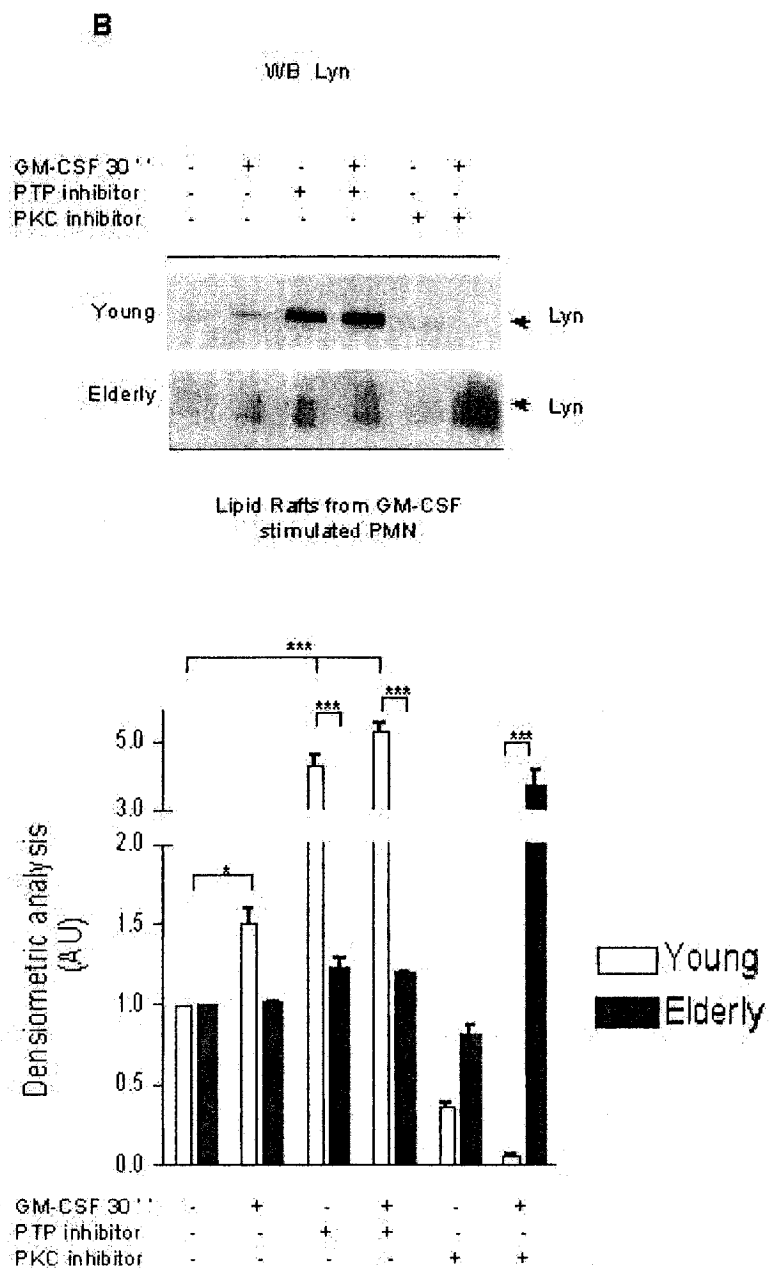
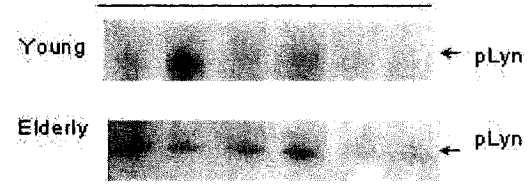


Figure 5 C

G

GM-CSF 30''	-	+	-	+	-	+
PTP inhibitor	-	-	+	+	-	-
PKC inhibitor	-	-	-	-	+	+



Lipid Rafts from GM-CSF stimulated PMN

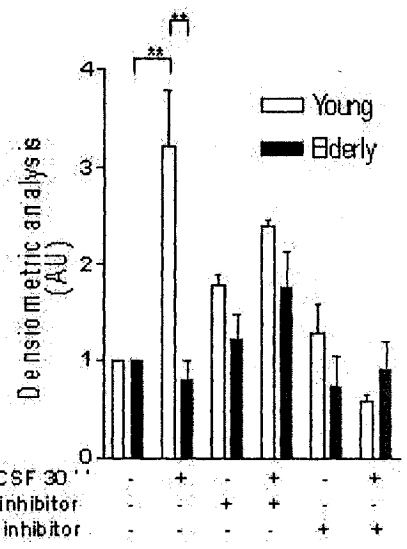


Figure 5. Alterations in the activation and translocation to the Lipid Rafts of the Src kinase Lyn with aging. PMN from young and elderly donors were stimulated with 20 ng mL⁻¹ of GM-CSF, phosphatase inhibitor cocktail (PTP), PKC inhibitor (PKC) or with a combination of both GM-CSF and inhibitor as described in *materials and methods*. (A) 50 µg of whole cell lysates from GM-CSF, PTP inhibitor or PKC inhibitor treated cells were immunoblotted with anti-phosphoLyn antibody. (B) Isolated lipid rafts fractions were probed with an anti-Lyn antibody. (C) Isolated lipid rafts fractions were probed with an anti-phosphoLyn antibody. Densiometric analyses corresponding to the blots are shown in the lower panel. Experiments were performed from 3 different donors of each age-groups (young, empty bars; elderly, filled bars) with similar results. Significant differences between young and elderly donors are depicted as followed: * = p <0.05; ** = p <0.01; *** = p <0.001.

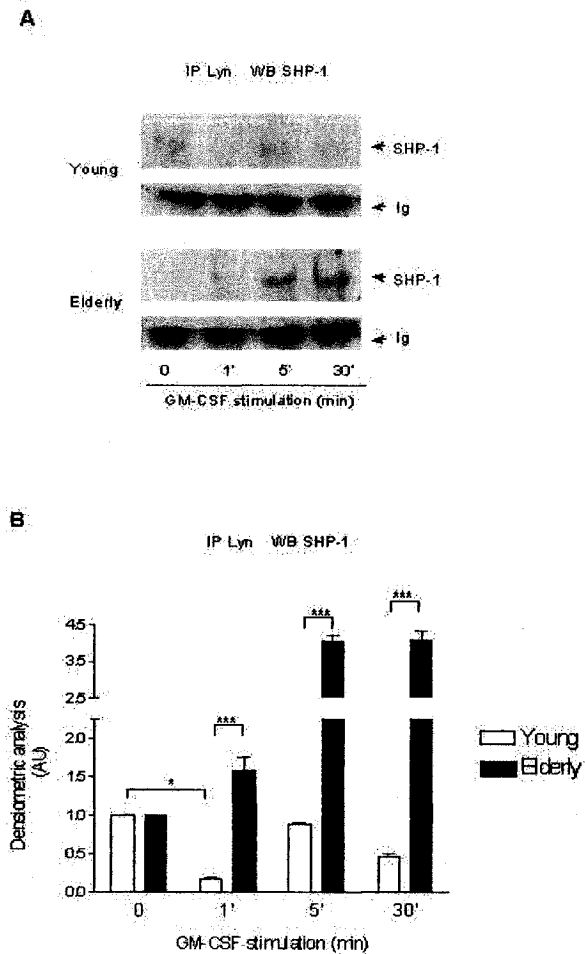


Figure 6. Interactions of SHP-1 with Src Lyn are altered with aging. PMN from young and elderly donors were stimulated with 20 ng mL^{-1} of GM-CSF for the indicated times. (A) Isolated lipid rafts fractions were subjected to immunoprecipitation with anti-Lyn antibody and revealed with anti-SHP1 antibody. Ig bands are shown as loading control. (B) Densitometric analysis of (A) is shown, where the intensities are indicated as relative to unstimulated state. Experiments were performed from 3 different donors of each age-groups (young, empty bars; elderly, filled bars) with similar results. Significant differences between young and elderly donors are depicted as followed: * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$.

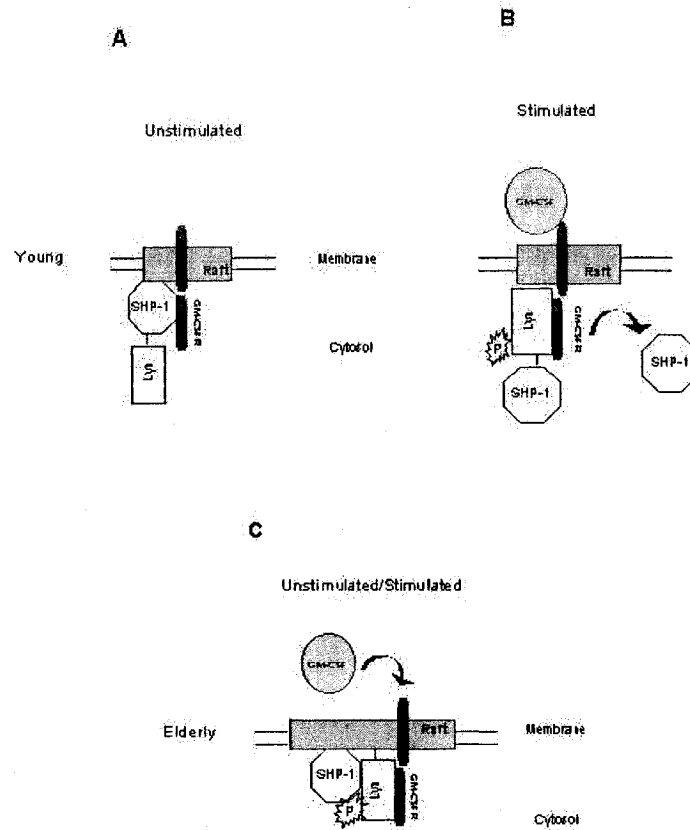


Figure 7. Proposed mechanism for the regulation of Lyn activation by SHP-1 in lipid rafts of PMN from young donors. (A) In resting state PTP, including SHP-1, maintain Lyn inactivated and outside of lipid rafts. (B) Stimulation by GM-CSF causes inhibition of SHP-1 by displacement from lipid rafts and recruitment of Lyn to lipid rafts where it is activated by tyrosine phosphorylation. (C) The stimulation of PMN of elderly subjects by GM-CSF is unable to modulate the dissociation of SHP-1 from lipid rafts, explaining the altered Lyn activation. See text for further details.

References

1. Shen, S. H., Bastien, L., Posner, B. I., Chretien, P. (1991) A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature* **352**, 736- 739.
2. Veillette, A., Latour, S., and Davidson, D. 2002. Negative Regulation of Immunoreceptor Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 669- 707.
3. Cyster, J. G., Goodnow, C. C. (1995) Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection. *Immunity* **2**, 13-24.
4. Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Plataniias, L. C., Yi, T. (1996) Direct Association With and Dephosphorylation of Jak2 Kinase by the Sh2-Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase Shp-1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6985- 6992.
5. Yetter, A., Uddin, S., Krolewski, J. J., Jiao, H., Yi, T., and Plataniias, L. C. 1995. Association of the Interferon-Dependent Tyrosine Kinase Tyk-2 With the Hematopoietic Cell Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **270**, 18179- 18182.
6. Schmidt-Arras, D. E., Bohmer, A., Markova, B., Choudhary, C., Serve, H., Bohmer, F. D. (2005) Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3690-703.
7. Baumann, M., Frye, T., Naqvi, T., Gomez-Cambronero, J. (2005) Normal neutrophil maturation is associated with selective loss of MAP kinase activation

- by G-CSF. *Leuk. Res.* **29**, 73- 78.
8. Bittorf, T., Seiler, J., Zhang, Z., Jaster, R., Brock, J. (1999) SHP1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates erythroid differentiation and suppression of apoptosis in J2E erythroleukemic cells. *Biol. Chem.* **380**, 1201- 1209.
 9. Klingmuller, U. (1997) The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur. J. Biochem.* **249**, 637- 647.
 10. Avraham, H., Price, D. J. (1999) Regulation of megakaryocytopoiesis and platelet production by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases. *Methods* **17**, 250-64.
 11. Pumphrey, N. J., Taylor, V., Freeman, S., Douglas, M. R., Bradfield, P. F., Young, S. P., Lord, J. M., Wakelam, M. J. O., Bird, I. N., Salmon, M., Buckley, C. D. (1999) Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C-[gamma]1 with PECAM-1/CD31. *FEBS Lett.* **450**, 77-83.
 12. Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Fortin, C., Guerard, K. P., Lesur, O., Khalil, A., Dupuis, G. (2004) Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell.* **3**, 217- 226.
 13. Watanabe, S., Itoh, T., Arai, K. (1997) Roles of JAK kinase in human GM-CSF receptor signals. *Leukemia* **11 Suppl 3**, 76- 78.
 14. Yasui, K, Sekiguchi, Y, Ichikawa, M, Nagumo, H, Yamazaki, T, Komiyama, A,

- Suzuki, H. (2002) Granulocyte macrophage-colony stimulating factor delays neutrophil apoptosis and primes its function through Ia-type phosphoinositide 3-kinase. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 1020-1026.
15. Treweeke, A. T., Aziz, K. A., Zuzel, M. (1994) The role of G-CSF in mature neutrophil function is not related to GM-CSF-type cell priming. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 612- 616.
 16. Epling-Burnette, P. K., Zhong, B., Bai, F., Jiang, K., Bailey, R. D., Garcia, R., Jove, R., Djeu, J. Y., Loughran, T. P. Jr, Wei, S. (2001) Cooperative Regulation of Mcl-1 by Janus Kinase/STAT and Phosphatidylinositol 3-Kinase Contribute to Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Delayed Apoptosis in Human Neutrophils. *J. Immunol.* **166**, 7486-7495.
 17. Wei, S., Liu, J., Epling-Burnette, P. K., Gamero, A., Ussery, D., Pearson, E., Elkabani, M., Diaz, J., Djeu, J. (1996) Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* **157**, 5155-5162.
 18. Yousefi, S. and Simon, H. U. 2003. Shp-1, a Regulator of Neutrophil Apoptosis. *Semin. Immunol.* **15**, 195-199.
 19. Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D. R., and Simon, H. U. (2002) Death Receptors Bind Shp-1 and Block Cytokine-Induced Anti-Apoptotic Signaling in Neutrophils. *Nat. Med.* **8**, 61- 67.
 20. Starr, R., Hilton, D. J. (1999) Negative regulation of the JAK/STAT pathway.

Bioessays **21**, 47-52.

21. Yousefi, S., Green, D. R., Blaser, K., Simon, H. U. (1994) Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 10868- 10872.
22. Incoronato, M., D'Alessio, A., Paladino, S., Zurzolo, C., Carlomagno, M. S., Cerchia, L., de Franciscis, V. (2004) The Shp-1 and Shp-2, tyrosine phosphatases, are recruited on cell membrane in two distinct molecular complexes including Ret oncogenes. *Cell Signal* **16**, 847- 856.
23. Caselli, A., Mazzinghi, B., Camici, G., Manao, G., Ramponi, G. (2002) Some protein tyrosine phosphatases target in part to lipid rafts and interact with caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 692- 697.
24. Fawcett, V. C., Lorenz, U. (2005) Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus. *J. Immunol.* **174**, 2849- 2859.
25. Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J., Pierce, S. K. (2003) Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 457- 481.
26. Piazzolla, G., Tortorella, C., Serrone, M., Jirillo, E., Antonaci, S. (1998) Modulation of cytoskeleton assembly capacity and oxidative response in aged neutrophils. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **20**, 251- 266.

27. Fulop, T. Jr, Foris, G., Worum, I., Leovey, A. (1985) Age-dependent alterations of Fc gamma receptor-mediated effector functions of human polymorphonuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **61**, 425- 432.
28. Fulop, T. Jr, Foris, G., Worum, I., Paragh, G., Leovey, A. (1985) Age related variations of some polymorphonuclear leukocyte functions. *Mech. Ageing Dev.* **29**, 1-8.
29. Fulop, T. Jr, Douziech, N., Jacob, M. P., Hauck, M., Wallach, J., Robert, L. (2001) Age-related alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor. *Pathol. Biol. (Paris)*. **49**, 339- 348.
30. Vlahos, C. J., Matter, W. F. (1992) Signal transduction in neutrophil activation. Phosphatidylinositol 3-kinase is stimulated without tyrosine phosphorylation. *FEBS Lett.* **309**, 242- 248.
31. Tortorella, C, Piazzolla, G, Spaccavento, F, Jirillo, E, Antonaci, S. (1999) Age-related effects of oxidative metabolism and cyclic AMP signaling on neutrophil apoptosis. *Mech. Ageing Dev.* **110**, 195-205.
32. Wenisch, C., Patruta, S., Daxbock, F., Krause, R., Horl, W. (2000) Effect of age on human neutrophil function. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 40- 45.
33. Lord, J. M., Butcher, S., Killampali, V., Lascelles, D., Salmon, M. (2001) Neutrophil ageing and immunesenescence. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1521- 1535.
34. Schroder, A. K., Rink, L. (2003) Neutrophil immunity of the elderly. *Mech.*

Ageing Dev. **124**, 419-425.

35. Seres, I, Csongor, J, Mohacsi, A, Leovey, A, Fulop, T. (1993) Age-dependent alterations of human recombinant GM-CSF effects on human granulocytes. *Mech. Ageing Dev.* **71**, 143-154.
36. Biasi, D., Carletto, A., Dell'Agnola, C., Caramaschi, P., Montesanti, F., Zavateri, G., Zeminian, S., Bellavite, P., Bambara, L. M. (1996) Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects. *Inflammation* **20**, 673-81.
37. Ligthart, G. J., Corberand, J. X., Fournier, C., Galanaud, P., Hijmans, W., Kennes, B., Muller-Hermelink, H. K., and Steinmann, G. G. (1984) Admission criteria for immunogerontological studies in man, The senieur protocol. *Mech. Ageing Dev.* **28**, 47- 55.
38. Larbi, A., Levesque, G., Robert, L., Gagne, D., Douziech, N., Fulop, T. Jr. (2005) Presence and active synthesis of the 67kDa elastin-receptor in human circulating white blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 787- 792.
39. Larbi, A., Douziech, N., Khalil, A., Dupuis, G., Gherairi, S., Guerard, K.P., Fulop, T. Jr. (2004) Effects of Methyl-Beta-Cyclodextrin on T Lymphocytes Lipid Rafts With Aging. *Exp. Gerontol.* **39**, 551- 558.
40. Brumell, J. H., Chan, C. K., Butler, J., Borregaard, N., Siminovitch, K. A., Grinstein, S., Downey, G. P. (1997) Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein

kinase C. *J. Biol. Chem.* **272**, 875- 882.

41. Larbi, A., Dupuis, G., Douziech, N., Khalil, A., and Fulop, T. 2004. Low-Grade Inflammation with Aging Has Consequences for T-Lymphocyte Signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* **1030**, 125- 133.
42. Larbi, A., Douziech, N., Dupuis, G., Khalil, A., Pelletier, H., Guerard, K. P., and Fulop, T. Jr. (2004). Age-Associated Alterations in the Recruitment of Signal-Transduction Proteins to Lipid Rafts in Human T Lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 373- 381.
43. Douziech, N., Seres, I., Larbi, A., Szikszay, E., Roy, P. M., Arcand, M., Dupuis, G., Fulop, T. (2002) Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. *Exp. Gerontol.* **37**, 369-387.
44. Larbi, A., Douziech, N., Fortin, C., Linteau, A., Dupuis, G., Fulop, T. Jr. (2005) The role of the MAPK pathway alterations in GM-CSF modulated human neutrophil apoptosis with aging. *Immun. Ageing.* **2**, 6.
45. Henderson, R. M., Edwardson, J. M., Geisse, N. A., Saslowsky, D. E. (2004) Lipid rafts: feeling is believing. *News Physiol. Sci.* **19**, 39-43.
46. Zhang, Z., Shen, K., Lu, W., Cole, P. A. (2003) The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation. *J. Biol. Chem.* **278**, 4668- 4674.
47. Bouchard, P., Zhao, Z., Banville, D., Dumas, F., Fischer, E. H., Shen, S. H.

- (1994) Phosphorylation and Identification of a Major Tyrosine Phosphorylation Site in Protein Tyrosine Phosphatase 1c. *J. Biol. Chem.* **269**, 19585- 19589.
48. Frank, C., Burkhardt, C., Imhof, D., Ringel, J., Zschornig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M., Bohmer, F. D. (2004) Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 11375- 11383.
49. Jones, M. L., Craik, J. D., Gibbins, J. M., Poole, A. W. (2004) Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J. Biol. Chem.* **279**, 40475- 40483.
50. Fulop, T., Desgeorges, S., Goulet, A. C., Fallery, C., Arcand, G., Lacombe, G., Linteau, A., Bergevin, M., Douziech, N. (2001) Apoptosis in immune cells with aging. In *Current Concepts in Experimental Gerontology Vienna Aging Series* (C. Bertoni-Freddari and H. Niedermülle, eds.), Facultas, Wien, Austria pp. 261-276.
51. Brizzi, M. F., Aronica, M. G., Rosso, A., Bagnara, G. P., Yarden, Y., Pegoraro, L. (1996) Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Stimulates JAK2 Signaling Pathway and Rapidly Activates p93, STAT1 p91, and STAT3 p92 in Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 3562- 3567.
52. Draber, P., Draberova, L. (2002) Lipid rafts in mast cell signaling. *Mol. Immunol.* **38**, 1247- 1252.
53. Gupta, N., DeFranco, A. L. (2003) Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 432- 444.

54. Fulop, T. Jr, Fouquet, C., Allaire, P., Perrin, N., Lacombe, G., Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., Gagne, D., Wagner, J. R., Khalil, A., Dupuis, G. (1997) Changes in apoptosis of human polymorphonuclear granulocytes with aging. *Mech. Ageing Dev.* **96**, 15-34.
55. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., Riley, J. L. (2004) SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* **173**, 945- 954.
56. Mustelin, T., Vang, T., Bottini, N. (2005) Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 43-57.
57. Tran, K. T., Rusu, S. D., Satish, L., Wells, A. (2003) Aging-related attenuation of EGF receptor signaling is mediated in part by increased protein tyrosine phosphatase activity. *Exp. Cell Res.* **289**, 359- 367.
58. Fessler, M. B., Arndt, P. G., Frasch, S. C., Lieber, J. G., Johnson, C. A., Murphy, R. C., Nick, J. A., Bratton, D. L., Malcolm, K. C., Worthen, G. S. (2004) Lipid rafts regulate lipopolysaccharide-induced activation of Cdc42 and inflammatory functions of the human neutrophil. *J. Biol. Chem.* **279**, 39989- 39998.
59. Otabor, I., Tyagi, S., Beurskens, F. J., Ghiran, I., Schwab, P., Nicholson-Weller, A., Klickstein, L. B. (2004) A role for lipid rafts in C1q-triggered O₂⁻ generation by human neutrophils. *Mol. Immunol.* **41**, 185-190.

60. Poole, A. W., Jones, M. L. (2005) A SHPing tale: Perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell. Signal.* **17**, 1323 -1332.
61. De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D., Ginaldi, L. (2005) Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* **579**, 2035- 2039.
62. Zhou, M. J., Lublin, D. M., Link, D. C., Brown, E. J. (1995) Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon Fc gamma RII or Fc gamma RIIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory burst. *J. Biol. Chem.* **270**, 13553-13560.
63. Jia S., Kapus, A., Keen, J., Rotstein, O. D., Marshall, J. C. (2004) Lipopolysaccharide (LPS) inhibits neutrophil (PMN) apoptosis through disruption of SHP-1/Caspase-8 interactions and tyrosine phosphorylation of caspase-8. *J. Leukoc. Biol. suppl.* 60 (abstract).
64. Yousfi, M. E., Mercier, S., Breuille, D., Denis, P., Papet, I., Mirand, P. P., Obled, C. (2005) The inflammatory response to vaccination is altered in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 874- 881.

Chapitre 3 : Discussion et conclusions

Discussion

Les fonctions des neutrophiles et particulièrement celles qui sont activées par des récepteurs sont altérées avec le vieillissement chez des personnes en bonne santé (FULOP et al., 1985a; FULOP et al., 1985b; FULOP et al., 2001a; FULOP et al., 2004; VLAHOS et MATTER, 1992; TORTORELLA et al., 1999; WENISCH et al., 2000; LORD et al., 2001; SCHRODER et RINK, 2003; SERES et al., 1993; BIASI et al., 1996). Les altérations dans la signalisation cellulaire qui se manifestent par une défaillance dans la phosphorylation en tyrosine pendant la stimulation des neutrophiles par divers récepteurs, incluant ceux du GM-CSF et du fMLP, peuvent expliquer en partie l'altération des fonctions. Cependant, l'importance des régulateurs négatifs des récepteurs des neutrophiles, celui du GM-CSF compris, dans l'altération des fonctions effectrices n'a pas été étudiée. Dans cette étude, nous avons entrepris de vérifier la possibilité que les PTP sont aussi une cause dans l'altération de la régulation de la signalisation des cytokines menant à une baisse des fonctions des neutrophiles avec le vieillissement.

Il y a plusieurs défauts avec le vieillissement dans les fonctions des neutrophiles notamment dans la production des ROS (PIAZZOLLA et al., 1998), dans le chimiotactisme et dans le prolongement de la survie cellulaire par les médiateurs de l'inflammation (FULOP et al., 2004; FULOP et al., 1997). Nous avons étudié l'effet du vieillissement sur la chimiokinèse induite par le GM-CSF par le test de la chambre de Boyden. Ce test est un essai avec filtre et il été montré que le G-CSF et le GM-CSF induisent le mouvement (chimiokinèse) plutôt que le chimiotactisme dans ce type d'essai

(SMITH et al., 1994). Par contre, le GM-CSF est capable d'induire le chimotactisme (migration dirigée) et la chimiokinèse (mouvement) avec des tests adéquats (GOMEZ-CAMBRONERO et al., 2003), mais il est surtout connu pour agir en synergie avec des chemoattractants et ainsi améliorer le chimotactisme, comme le cas du FMLP et de l'IL-8 (TYAGI et al., 1989; SHEN et al., 2004). Nos résultats ont révélé que l'utilisation d'un cocktail d'inhibiteurs des PTP, incluant SHP-1, avant la stimulation des cellules par le GM-CSF a causé une augmentation de la chimiokinèse et de la production des ROS, et ce pour tout les groupes d'âges. Il est à noter que, pour les donneurs jeunes l'inhibition des PTP n'est pas suffisante pour causer une augmentation de la production des ROS. Dans le cas de la chimiokinèse, l'incubation des neutrophiles avec seulement l'inhibiteur des PTP n'est pas suffisante pour causer une migration chez les deux catégories de donneurs. Ceci suggère que les PTP ne sont pas des facteurs de régulation sur les voies de signalisation inhibitrices pour la chimiokinèse. Les altérations suspectées dans les effets du GM-CSF avec le vieillissement sur l'activité des PTP sont devenues plus évidentes lorsque les neutrophiles des donneurs ont été cultivés pendant 18h en présence des inhibiteurs des PTP et du GM-CSF. Chez les donneurs jeunes l'incubation avec les inhibiteurs des PTP seul ou en combinaison avec le GM-CSF a stoppé la prolongation de la survie cellulaire due au GM-CSF. De la même façon, il a été montré que 1 μ M de l'inhibiteur des PTP phénylarsine oxyde (PAO) accélère l'apoptose comparé au milieu de culture seul chez les éosinophiles et les neutrophiles (YOUSEFI et al., 1994). Au contraire, chez les donneurs âgés, l'incubation avec l'inhibiteur des PTP avant la culture de 18h a causé le retour de la prolongation de la survie cellulaire due au GM-CSF. Ces données sur la modulation de

l'activité des PTP en relation avec les fonctions des neutrophiles induites par le GM-CSF ont révélées une régulation différentielle des PTP avec le vieillissement.

SHP-1 est un régulateur négatif de la signalisation bien connu (VEILLETTE et al., 2002; YOUSEFI et SIMON, 2003; DAIGLE et al., 2002; STARR et HILTON, 1999; CHEMNITZ et al., 2004; MUSTELIN et al., 2005), et il a été montré qu'elle est d'une grande importance dans la régulation négative des kinases, telles que Jak ou Lyn, stimulée par le GM-CSF dans les neutrophiles ou d'autres cellules du système immunitaire (VEILLETTE et al., 2002; JIAO et al., 1996). Notre présente étude démontre que l'activité phosphatase de SHP-1 ne peut être régulée à la baisse suite à une stimulation de 1 minute avec du GM-CSF dans les neutrophiles des donneurs âgés au contraire des donneurs jeunes. Une tendance similaire a été observée chez les fibroblastes où l'altération dans la signalisation du récepteur de l'EGF était due en partie à une activité augmentée des PTP (TRAN et al., 2003). Depuis peu, les radeaux lipidiques sont considérés comme une plate-forme avec un rôle très important à jouer dans la signalisation cellulaire dans diverses cellules, incluant les neutrophiles (FAWCETT et LORENZ, 2005; DYKSTRA et al., 2003; FESSLER et al., 2004; OTABOR et al., 2004). Nous avons aussi montré la présence de radeaux lipidiques dans les neutrophiles de donneurs jeunes et âgés (FULOP et al., 2004). Dans cet ordre d'idée, nous avons décidé de concentrer notre présente étude sur la modulation de SHP-1 dans les radeaux lipidiques. Au contraire des lysats totaux, dans les radeaux lipidiques des neutrophiles des sujets âgés il y a un recrutement constant de SHP-1; alors que chez les sujets jeunes, une minute de stimulation par le GM-CSF chasse la phosphatase qui y revient aux plus longs

temps de stimulation. Ces études montrent deux altérations avec le vieillissement : l'activité enzymatique de SHP-1 n'est pas diminuée et n'est pas exclue des radeaux lipidiques par la stimulation des neutrophiles par le GM-CSF. L'association de SHP-1 aux radeaux lipidiques chez les jeunes corrèle bien avec son activité enzymatique, *i.e.*, il y a en même temps une exclusion de la phosphatase des radeaux lipidiques et une baisse d'activité.

SHP-1 peut être phosphorylée sur des résidus sérine et tyrosine dans sa partie C-terminale. La phosphorylation en tyrosine a pour effet d'augmenter son activité enzymatique, alors que la phosphorylation en sérine a un fort effet inhibiteur sur son activité enzymatique (BRUMELL et al., 1997; ZHANG et al., 2003; BOUCHARD et al., 1994; FRANK et al., 2004; JONES et al., 2004). Nos résultats montrent une contradiction entre l'activité mesurée de SHP-1 et ce qui est connu dans la régulation par les phosphorylations en tyrosine et sérine dans les lysats totaux des deux groupes d'âge. Nous n'avons pas trouvé d'explications satisfaisantes pour ces contradictions. Par contre, la possibilité qu'il existe un autre niveau de régulation qui affecte la régulation *in vivo* de cette enzyme grâce à des rôles encore insoupçonnés de sa partie C-terminale a été soulevée (POOLE et JONES, 2005). En effet, dans la partie C-terminale de SHP-1, il y a des sites de phosphorylation en tyrosine et en sérine ainsi que des sites de localisation au noyau et aux radeaux lipidiques. Par exemple le résidu Tyr⁵³⁶ est situé dans un site de liaison qui peut recruter des molécules contenant un domaine SH2, comme Grb2 et SHIP (MINOO et al., 2004; POOLE et JONES, 2005) et il a été montré que la partie C-terminale de SHP-1 se lie à l'acide phosphatidique des phospholipides et à la

phosphatidylsérine (FRANK et al., 1999). Dans les radeaux lipidiques, par contre, le patron de phosphorylation en sérine/tyrosine correspond bien à l'activité mesurée de SHP-1 et des altérations observées avec le vieillissement. Entre autre, il y a une plus grande proportion de phosphorylation en sérine qu'en tyrosine chez les sujets âgés à tout les temps de stimulation. Comme une plus grande phosphorylation en sérine a un effet à la baisse sur l'activité de SHP-1, ceci est en relation avec le fait que les neutrophiles des sujets âgés montrent une forte activation au repos de Lyn et des Kinases MAP qu'il n'est pas possible d'activer plus par une stimulation de récepteurs (FULOP et al., 2001a).

La Src kinase Lyn est une des premières molécules activée par une phosphorylation en tyrosine par le GM-CSF (WEI et al., 1996) et nous avons montré des altérations dans l'activation de Lyn dans les neutrophiles avec le vieillissement (FULOP et al., 2001a). Lorsque les neutrophiles sont traités avec le GM-CSF il y a une forte phosphorylation de Lyn chez les jeunes par rapport au repos alors que cette activation est faible chez les sujets âgés malgré une activation au repos plus forte dans les lysats totaux. L'activation au repos plus forte observée avec le vieillissement suggère que les neutrophiles sont déjà pré-activés et prêts à l'action, cet état est caractéristique de ces cellules des sujets âgés. Cette activation basale est la conséquence d'une inflammation chronique de basse intensité qui est typique du vieillissement et appelée théorie de l'« Inflamm-aging ». Elle affirme que cette inflammation chronique de basse intensité est le résultat d'un volume trop grand d'antigènes rencontrés durant la vie de l'individu (e.g. CMV), ce qui aurait un effet sur la longévité (DE MARTINIS et al., 2005).

D'après nos connaissances, nous démontrons pour la première fois dans cette étude un recrutement aux radeaux lipidiques de la Src kinase Lyn dans les neutrophiles humains comme c'est le cas pour d'autres Src kinases durant l'activation du TCR (FAWCETT et LORENZ, 2005) ou la ligation du Fc γ des neutrophiles humains (ZHOU et al., 1995). Les deux isoformes de Lyn (p53^{lyn} et p56^{lyn} kDa) proviennent de l'épissage alternatif du même gène, la seule différence entre les deux isoformes est une délétion de 21 acides aminés dans une région située en N-terminale et qui contient des sites de phosphorylation en sérine et en thréonine chez p56^{lyn} (STANLEY et al., 1991; HIBBS et DUNN, 1997). Au repos chez les sujets jeunes, seulement une petite partie de Lyn est présente dans les radeaux lipidiques et, une stimulation par le GM-CSF entraîne un recrutement supplémentaire de p56^{lyn}. Toujours chez les sujets jeunes, il est intéressant de constater que les phosphatases, y compris SHP-1, sont impliquées dans l'exclusion de Lyn des radeaux lipidiques parce qu'il y a un recrutement important des deux isoformes de Lyn lors leur inhibition. Une stimulation par le GM-CSF lorsque les phosphatases sont inhibées n'entraîne pas de recrutement supplémentaire de Lyn. Au contraire des phosphatases, les PKC sont impliquées dans le recrutement de Lyn aux radeaux lipidiques parce que leur inhibition abolit le recrutement de Lyn même suite à une stimulation par le GM-CSF. Dans le cas des sujets âgés, il y a une présence plus forte des deux isoformes de Lyn dans les radeaux lipidiques que ce soit au repos ou après la stimulation probablement parce que l'activité de SHP-1 est réduite dans les radeaux lipidiques des sujets âgés mais nous n'avons pas d'explication entièrement satisfaisante sur la cause de ce phénomène. Il est possible que déséquilibres dans la phosphorylation en tyrosine des molécules des neutrophiles des sujets âgés, dus à une activité altérée de

SHP-1, sont responsables du recrutement plus important des deux isoformes de Lyn dans les radeaux lipidiques.

Nous avons montré une forte phosphorylation en tyrosine de Lyn dans les radeaux lipidiques des neutrophiles de jeunes après une stimulation au GM-CSF comparé à la phosphorylation au repos. Au contraire, il n'y a pas de phosphorylation supplémentaire de Lyn après la stimulation dans les neutrophiles des sujets âgés. C'est une observation qui a déjà été décrite aussi pour les Kinases MAP dans les neutrophiles avec le vieillissement (LARBI et al., 2005; FULOP et al., 2001b). L'utilisation d'un cocktail d'inhibiteurs des PTP a influencé la phosphorylation de Lyn en comparaison avec l'état au repos et en accord avec le déplacement de Lyn aux radeaux lipidiques. Ceci indique que l'inhibition de l'activité phosphatase, incluant celle de SHP-1, est nécessaire pour maintenir phospho-Lyn dans les radeaux lipidiques comme il est aussi montré par l'inhibition des PKC qui stimulent l'activité de SHP-1. Il n'y avait pas de régulation significative de phospho-Lyn dans les radeaux lipidiques après la stimulation comparé à l'état de repos dans les neutrophiles des sujets âgés. Ces résultats mis ensemble suggèrent que SHP-1 participe à la régulation négative de Lyn mais aussi à la maintenir aux radeaux lipidiques.

Nos données actuelles confirment l'interaction entre SHP-1 et Lyn déjà démontrée par Daigle *et al.* (DAIGLE et al., 2002). Nous avons montré que cette interaction était présente au repos dans les radeaux lipidiques dans les neutrophiles des sujets jeunes et qu'elle était brisée par une stimulation au GM-CSF. Dans les neutrophiles des sujets âgés,

l'interaction était faible au repos et il y avait un recrutement constant de SHP-1 à Lyn avec la stimulation. Si on met en parallèle l'activité mesurée de SHP-1 et la phosphorylation de Lyn ainsi que leurs interactions, nous pouvons dire que l'inhibition de SHP-1 à une minute de stimulation par le GM-CSF se fait conjointement avec la dissociation de SHP-1 de Lyn. Ceci indique que dans les radeaux lipidiques tant que SHP-1 est présente, Lyn est phosphorylée en tyrosine et exclue de cette fraction cellulaire. Après une minute de stimulation par le GM-CSF, SHP-1 est déplacée des radeaux lipidiques, Lyn y est alors recrutée et phosphorylée en tyrosine. Ces résultats suggèrent que la régulation positive ou négative de la signalisation du GM-CSF est en partie le résultat d'interactions régulées entre la phosphatase SHP-1 et les Src Kinases comme Lyn. D'une façon similaire, il a été montré que SHP-1 s'attachait à la caspase-8 de façon constitutive et que la stimulation par LPS défaisait cette association et permettait la phosphorylation en tyrosine de la caspase-8 dans les neutrophiles (JIA SONGHUI et al., 2004). C'est un mécanisme qui a des affinités avec l'activation de Lck par le CD45, une PTP récepteur, dans les cellules T (MUSTELIN et al., 2005; VEILLETTE et al., 2002). Dans les cellules T au repos, une protéine adaptatrice appelée PAG recrute Csk, une PTK, aux radeaux lipidiques ce qui maintient Lck inactive par une phosphorylation inhibitrice en tyrosine. Dans les cellules T activées par le TCR, le CD45 déphosphoryle le PAG résultant en une dissociation de Csk des radeaux lipidiques et en une activation de Lck. Le contraste est frappant dans les radeaux lipidiques des sujets âgés où il y a une très faible association au repos et, à la place de la dissociation physique vue chez les sujets jeunes avec la stimulation au GM-CSF, il y a un recrutement constant et fort de SHP-1 et Lyn.

Pour essayer d'expliquer les différences observées entre donneurs jeunes et âgés dans la régulation de SHP-1, nous avons cherché des altérations possibles des caractéristiques physiques des neutrophiles. Le marquage du cholestérol membranaire avec du filipin et la mesure de la fluorescence résultante par cytométrie de flux n'ont révélé aucune différence avec le vieillissement (données non montrées). Ces résultats sont totalement à l'opposé de ce qui est trouvé dans les cellules T avec le vieillissement (FULOP et al., 2004). Pour ce qui est de la fluidité membranaire des neutrophiles, mesurée par anisotropie avec une sonde fluorescente (le DPH), les résultats ne sont encore une fois pas différents entre les sujets jeunes et âgés (données non montrées). Au contraire, la mesure de l'oxydation des protéines, par OxyBlot, a révélé un plus grand degré d'oxydation des protéines dans les lysats totaux des neutrophiles de sujets âgés, au repos et avec la stimulation par GM-CSF (données non montrées). Dans le même ordre d'idée, des niveaux significativement plus élevés de protéines de la phase aigüe comme le CRP, le fibrinogène, les haptoglobines et la cytokine inflammatoire IL-6 dans le plasma des sujets âgés sains a été rapporté (YOUSFI et al., 2005). Ces observations sont la cause probable de l'inflammation de basse intensité chez les personnes âgées et peuvent affecter négativement la réponse immune. Par contre, ce n'était pas le cas pour nos propres donneurs. D'autres facteurs qui n'ont pas été étudiés dans notre étude, par exemple la myristoylation ou la N-glycosylation, peuvent aussi agir pour réguler l'activité de SHP-1. Une interaction hiérarchique ou non entre les PTPs similaire des PTK reste aussi à élucider dans les neutrophiles. Il restera aussi d'autres expériences à faire pour étudier les altérations des mécanismes régulateurs qui ciblent SHP-1 aux radeaux lipidiques dans les neutrophiles avec le vieillissement.

Conclusion

Les fonctions effectrices et la signalisation cellulaires des neutrophiles humains subissent des altérations avec le vieillissement. Les altérations dans la signalisation cellulaire qui se manifestent par un patron de phosphorylation en tyrosine différent chez les sujets âgés suite à une stimulation de plusieurs récepteurs des neutrophiles, incluant les récepteurs du fMLP et du GM-CSF, peuvent en partie expliquer cette baisse dans les fonctions. Par contre, l'importance des régulateurs négatifs de la signalisation cellulaire des récepteurs des neutrophiles humains dans les altérations des fonctions effectrices chez les sujets âgés dans le vieillissement n'a pas encore été déterminée. Dans cette étude nous avons entrepris d'étudier la possibilité qu'une altération dans la régulation négative de la signalisation des cytokines est aussi un facteur expliquant la baisse des fonctions effectrices des neutrophiles observées chez les personnes âgées.

Les protéines tyrosines phosphatases (PTPs), comme SHP-1, représentent un des mécanismes qui permettent de moduler à la baisse et de terminer ces fonctions inflammatoires qui sont modulées par l'action des cytokines. Nous avons étudié le rôle des PTPs dans l'altération due au vieillissement des fonctions des neutrophiles humains. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique des PTPs a suggéré une dérégulation de l'activité phosphatasique avec le vieillissement. Cette dérégulation était confirmée aussi dans le cas de l'apoptose mesurée après 18 heures d'incubation. L'activité phosphatasique de SHP-1 purifiée par immunoprécipitation de neutrophiles de sujets jeunes ou âgés stimulés par le GM-CSF est altérée de façon significative après une minute de stimulation chez les sujets âgés. Chez les sujets jeunes la SHP-1 est déplacée

des radeaux lipidiques après 1 minute de stimulation par le GM-CSF alors que chez les sujets âgés, SHP-1 est présente à tout les temps de stimulation utilisés. Des immunoblots fait avec des anticorps anti-phosphotyrosine et anti-phosphosérine ont montré une augmentation de la phosphorylation en sérine dans les neutrophiles des sujets jeunes après une stimulation au GM-CSF alors que ce n'était pas le cas chez les sujets âgés. Nous avons aussi trouvé des altérations dans l'activation et le recrutement aux radeaux lipidiques de la Src kinase Lyn chez les neutrophiles des sujets âgés. De plus, nous avons démontré que SHP-1 est continuellement recrutée à Lyn chez les sujets âgés alors que cette interaction, qui est observée dans des cellules non stimulées chez les sujets jeunes, est défaite par la stimulation au GM-CSF.

En conclusion, les altérations de la modulation de SHP-1 par le GM-CSF dans les radeaux lipidiques des neutrophiles dans le vieillissement contribuent à la baisse des fonctions effectrices. Ces altérations de la signalisation cellulaire durant le vieillissement contribuent de façon certaine à la baisse d'activité des neutrophiles, ce qui mène à une susceptibilité accrue aux infections, aux cancers, aux désordres autoimmuns et aux pathologies à base inflammatoire. L'implication des PTPs dans les fonctions cellulaires dans le vieillissement a été gravement sous-estimée. Par contre, plus d'études seront nécessaires pour déterminer quelle est leur contribution précise à l'immunodéficience qui est observée durant le vieillissement. Les PTPs pourraient présenter une cible de choix pour des interventions pharmacologiques.

Perspectives

La régulation de l'activité de SHP-1 par le GM-CSF à 1 min est altérée lors du vieillissement, peut-on voir des dérégulations lors d'une plus longue stimulation (20 heures) par le GM-CSF ? Il serait intéressant de caractériser plus en détails les interactions SHP-1 avec les autres récepteurs des neutrophiles (Fas, FMLP, Fc γ) et de vérifier l'influence du vieillissement sur l'activité enzymatique de SHP-1 associée avec ces récepteurs. Nos résultats montre que le recrutement de SHP-1 aux radeaux lipidiques est fortement altéré durant le vieillissement, il serait intéressant de caractériser les mécanismes de recrutement de SHP-1 aux radeaux lipidiques et de déterminer à quelles étapes se situent les altérations.

Liste des references hors articles

- Al-Shami A, Bourgoïn SG, et Naccache PH (1997) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. I. Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and inhibition by phorbol esters *Blood* **89**:1035-44
- Al-Shami A, Mahanna W, et Naccache PH (1998) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b *J Biol Chem* **273**:1058-63
- Al-Shami A et Naccache PH (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Involvement of Jak2 in the stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase *J Biol Chem* **274**:5333-8
- Alvarado-Kristensson M, Porn-Ares MI, Grethe S, Smith D, Zheng L, et Andersson T (2002) p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis *FASEB J* **16**:129-31
- Alvarado-Kristensson M, Melander F, Leandersson K, Ronnstrand L, Wernstedt C, et Andersson T (2004) p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils *J Exp Med* **199**:449-58
- Alvarez E, Ruiz-Gutierrez V, Sobrino F, et Santa-Maria C (2001) Age-related changes in membrane lipid composition, fluidity and respiratory burst in rat peritoneal neutrophils *Clin Exp Immunol* **124**:95-102
- Aoshiba K, Yasui S, Hayashi M, Tamaoki J, et Nagai A (1999) Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils *J*

Immunol 162:1692-700

Atkinson YH, Lopez AF, Marasco WA, Lucas CM, Wong GG, Burns GF, et Vadas MA (1988) Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rH GM-CSF) regulates f Met-Leu-Phe receptors on human neutrophils *Immunology* 64:519-25

Avraham H et Price DJ (1999) Regulation of megakaryocytopoiesis and platelet production by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases *Methods* 17:250-64

Banville D, Stocco R, et Shen SH (1995) Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts *Genomics* 27:165-73

Baumann M, Frye T, Naqvi T, et Gomez-Cambronero J (2005) Normal neutrophil maturation is associated with selective loss of MAP kinase activation by G-CSF *Leuk Res* 29:73-8

Biasi D, Carletto A, Dell'Agnola C, Caramaschi P, Montesanti F, Zavateri G, Zeminian S, Bellavite P, et Bambara LM (1996) Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects *Inflammation* 20:673-81

Bittorf T, Seiler J, Zhang Z, Jaster R, et Brock J (1999) SHP1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates erythroid differentiation and suppression of apoptosis in J2E erythroleukemic cells *Biol Chem* 380:1201-9

Bone H, Dechert U, Jirik F, Schrader JW, et Welham MJ (1997) SHP1 and SHP2 protein-tyrosine phosphatases associate with betac after interleukin-3-induced receptor tyrosine phosphorylation. Identification of potential binding sites and substrates *J Biol Chem* 272: 14470-6

Bos JD, de Rie MA, Teunissen MB, et Piskin G (2005) Psoriasis: dysregulation of innate

immunity *Br J Dermatol* **152**:1098-107

Bouchard P, Zhao Z, Banville D, Dumas F, Fischer EH, et Shen SH (1994) Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C *J Biol Chem* **269**:19585-9

Bouchon A, Dietrich J, et Colonna M (2000) Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes *J Immunol* **164**:4991-5

Bourgoin S, Plante E, Gaudry M, Naccache PH, Borgeat P, et Poubelle PE (1990) Involvement of a phospholipase D in the mechanism of action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): priming of human neutrophils in vitro with GM-CSF is associated with accumulation of phosphatidic acid and diradylglycerol *J Exp Med* **172**:767-77

Brach MA, deVos S, Gruss HJ, et Herrmann F (1992) Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death *Blood* **80**:2920-4

Bradfield PF, Young SP, Lord JM, Wakelam MJO, Bird IN, Salmon M, et Buckley CD (1999) Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C- γ 1 with PECAM-1/CD31 *FEBS Letters* **450**:77-83

Brizzi MF, Aronica MG, Rosso A, Bagnara GP, Yarden Y, et Pegoraro L (1996) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p38, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes *J Biol Chem* **271**:3562-7

Brown EJ et Gresham HD (2003) Chapter 35: Phagocytosis In *William E. Paul Fundamental Immunology Fifth edition* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 1105-26

- Brown DA et London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts *J Biol Chem* **275**:17221-4
- Brumell JH, Chan CK, Butler J, Borregaard N, Siminovitch KA, Grinstein S, et Downey GP (1997) Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C *J Biol Chem* **272**:875-82
- Busse WW, Lenfant C, et Lemanske RF Jr (2002) Asthma guidelines: a changing paradigm to improve asthma care *J Allergy Clin Immunol* **110**:703-5
- Caselli A, Mazzinghi B, Camici G, Manao G, et Ramponi G (2002) Some protein tyrosine phosphatases target in part to lipid rafts and interact with caveolin-1 *Biochem Biophys Res Commun* **296**:692-7
- Cassatella MA (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound *Adv Immunol* **73**:369-509
- Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, et Riley JL (2004) SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation *J Immunol* **173**:945-54
- Chen HE, Chang S, Trub T, et Neel BG (1996) Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1 *Mol Cell Biol* **16**:3685-97
- Clark SC (1988) Biological activities of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *Int J Cell Cloning* **6**:365-77
- Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, et Mantovani A (1992) Modulation of

granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products *Blood* **80**:2012-20

Cowburn AS, Cadwallader KA, Reed BJ, Farahi N, et Chilvers ER (2002) Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival *Blood* **100**:2607-16

Cox G (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes *J Immunol* **154**:4719-25

Cyster JG et Goodnow CC (1995) Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection *Immunity* **2**:13-24

D'Ambrosio D, Hippen KL, Minskoff SA, Mellman I, Pani G, Siminovitch KA, et Cambier JC (1995) Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1 *Science* **268**:293-7

Da Silva FM, Massart-Leen AM, et Burvenich C (1994) Development and maturation of neutrophils *Vet Q* **16**: 220-5

Daigle I, Yousefi S, Colonna M, Green DR, et Simon HU (2002) Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils *Nat Med* **8**:61-7

De Groot RP, Coffey PJ, et Koenderman L (1998) Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family *Cell Signal* **10**:619-28

De Martinis M, Franceschi C, Monti D, et Ginaldi L (2005) Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity *FEBS Lett* **579**:2035-9

- Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, et Edwards SW (2004)«Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1 *J Biol Chem* **279**:26915-21
- Doody GM, Justement LB, Delibrias CC, Matthews RJ, Lin J, Thomas ML, et Fearon DT (1995) A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP *Science* **269**:242-4
- Draber P et Draberova L (2002) Lipid rafts in mast cell signaling *Mol Immunol* **38**:1247-52
- Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, et Pierce SK (2003) Location is everything: lipid rafts and immune cell signalling *Annu Rev Immunol* **21**:457-81
- Eckmann L (2005) Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections *Curr Opin Gastroenterol* **21**:147-51
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, et Elbim C (2005) Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**:199-206
- Epling-Burnette PK, Zhong B, Bai F, Jiang K, Bailey RD, Garcia R, Jove R, Djeu JY, Loughran TP Jr, et Wei S (2001) Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils *J Immunol* **166**:7486-95
- Esparza B, Sanchez H, Ruiz M, Barranquero M, Sabino E, et Merino F (1996) Neutrophil function in elderly persons assessed by flow cytometry *Immunol Invest* **25**:185-90

- Faurschou M et Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation *Microbes Infect* **5**:1317-27
- Fawcett VC et Lorenz U (2005) Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus *J Immunol* **174**:2849-59
- Fessler MB, Arndt PG, Frasch SC, Lieber JG, Johnson CA, Murphy RC, Nick JA, Bratton DL, Malcolm KC, et Worthen GS (2004) Lipid rafts regulate lipopolysaccharide-induced activation of Cdc42 and inflammatory functions of the human neutrophil *J Biol Chem* **279**:39989-98
- Frank C, Keilhack H, Opitz F, Zschornig O, et Bohmer FD (1999) Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation *Biochemistry* **38**:11993-2002
- Frank C, Burkhardt C, Imhof D, Ringel J, Zschornig O, Wieligmann K, Zacharias M, et Bohmer FD (2004) Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1 *J Biol Chem* **279**:11375-83
- Fulop T, Foris G, Worum I, et Leovey A (1985a) Age-dependent alterations of Fc gamma receptor-mediated effector functions of human polymorphonuclear leucocytes *Clin Exp Immunol* **61**:425-32
- Fulop T Jr, Foris G, Worum I, Paragh G, et Leovey A (1985b) Age related variations of some polymorphonuclear leukocyte functions *Mech Ageing Dev* **29**:1-8
- Fulop T Jr (1994) Signal transduction changes in granulocytes and lymphocytes with ageing *Immunol Lett* **40**:259-68
- Fulop T Jr, Fouquet C, Allaire P, Perrin N, Lacombe G, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Gagne D, Wagner JR, Khalil A et Dupuis G (1997) Changes in apoptosis of

human polymorphonuclear granulocytes with aging *Mech Ageing Dev* **96**:15-34

Fulop T Jr, Jacob MP, Hauck M, Wallach J et Robert L (2001a) Age-related alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor *Pathol Biol (Paris)* **49**:339-48

Fulop T, Desgeorges S, Goulet A, Fallery C, Arcand G, Lacombe G, Linteau A et Bergevin (2001b) Apoptosis in immune cells with aging In *Current Concepts in Experimental Gerontology* Vienna Aging Series (C. Bertoni-Freddari and H. Niedermülle, eds.), Facultas, Wien, Austria pp. 261-276.

Fulop T Jr, Larbi A, Linteau A, et Desgeorges S (2002) The role of Mcl-1 and Bax expression alteration in the decreased rescue of human neutrophils from apoptosis by GM-CSF with aging *Ann N Y Acad Sci* **973**:305-8

Fulop T, Larbi A, Fortin C, Guerard KP, Lesur O, Khalil A et Dupuis G (2004) Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging *Aging Cell* **3**:217-26

Garyu JW, Choi KS, Grab DJ et Dumler JS (2005) Defective phagocytosis in Anaplasma phagocytophilum-infected neutrophils *Infect Immun* **73**:1187-90

Gjorloff-Wingren A, Saxena M, Han S, Wang X, Alonso A, Renedo M, Oh P, Williams S, Schnitzer J et Mustelin T (2000) Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells *Eur J Immunol* **30**:2412-21

Gomez-Cambronero J, Yamazaki M, Metwally F, Molski TF, Bonak VA, Huang CK, Becker EL et Sha'afi RI (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and human neutrophils: role of guanine nucleotide regulatory proteins *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:3569-73

- Gomez-Cambronero J, Horn J, Paul CC, et Baumann MA (2003) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway *J Immunol* **171**:6846-55
- Gupta N et DeFranco AL (2003) Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation *Mol Biol Cell* **14**:432-44
- Hanazono Y, Chiba S, Sasaki K, Mano H, Miyajima A, Arai K, Yazaki Y et Hirai H (1993) c-fps/fes protein-tyrosine kinase is implicated in a signaling pathway triggered by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 *EMBO J* **12**:1641-6
- Hibbs ML et Dunn AR (1997) Lyn, a src-like tyrosine kinase *Int J Biochem Cell Biol* **29**:397-400
- Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T et Miyajima A (1990) Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9655-9
- Henderson RM, Edwardson JM, Geisse NA et Saslowsky DE (2004) Lipid rafts: feeling is believing *News Physiol Sci* **19**:39-43
- Hughes V, Humphreys JM et Edwards SW (1987) Protein synthesis is activated in primed neutrophils: a possible role in inflammation *Biosci Rep* **7**:881-90
- Incoronato M, D'Alessio A, Paladino S, Zurzolo C, Carlomagno MS, Cerchia L et de Franciscis V (2004) The Shp-1 and Shp-2, tyrosine phosphatases, are recruited on cell membrane in two distinct molecular complexes including Ret oncogenes *Cell Signal* **16**:847-56

- Jia S, Kapus A, Keen J, Rotstein O et Marshall JC (2004) Lipopolysaccharide (LPS) inhibits neutrophil (PMN) apoptosis through disruption of SHP-1/Caspase-8 interactions and tyrosine phosphorylation of Caspase-8 *Journal of Leukocyte Biology supplement* (Abstract #64)
- Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Platanius LC et Yi T (1996) Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 *Mol Cell Biol* **16**:6985-92
- Jones ML, Craik JD, Gibbins JM et Poole AW (2004) Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus *J Biol Chem* **279**:40475-83
- Kamata N, Kutsuna H, Hato F, Kato T, Oshitani N, Arakawa T et Kitagawa S (2004) Activation of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha: role of phosphatidylinositol 3-kinase *Int J Hematol* **80**:421-7
- Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M, et Kunkel SL (2005) Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**:273-9
- Keller M, Spanou Z, Schaerli P, Britschgi M, Yawalkar N, Seitz M, Villiger PM, et Pichler WJ (2005) T cell-regulated neutrophilic inflammation in autoinflammatory diseases *J Immunol* **175**: 7678-86
- Kishimoto T, Taga T, et Akira S (1994) Cytokine signal transduction *Cell* **76**:253-62
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, et Schindler CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges *Gene* **285**:1-24
- Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, Buridi A, et

- McLeish KR (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways *J Immunol* **164**:4286-91
- Klingmuller U (1997) The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor *Eur J Biochem* **249**:637-47
- Kotone-Miyahara Y, Yamashita K, Lee KK, Yonehara S, Uchiyama T, Sasada M, et Takahashi A (2004) Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C *J Leukoc Biol* **76**:1047-56
- Kozlowski M, Mlinaric-Rascan I, Feng GS, Shen R, Pawson T, et Siminovitch KA (1993) Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice *J Exp Med* **178**:2157-63
- Larbi A, Khalil A, Dupuis G, Gherairi S, Guerard, KP et Fulop, T (2004) Effects of Methyl-Beta-Cyclodextrin on T Lymphocytes Lipid Rafts With Aging *Exp Gerontol* **39**:551-8
- Larbi A, Fortin C, Linteau A, Dupuis G et Fulop T (2005) The role of the MAPK pathway alterations in GM-CSF modulated human neutrophil apoptosis with aging *Immun Ageing* **2**:6
- Lee A, Whyte MK, et Haslett C (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators *J Leukoc Biol* **54**:283-8
- Lee WL, Harrison RE, et Grinstein S (2003) Phagocytosis by neutrophils *Microbes Infect*

5:1299-306

- Leonard WJ (2003) Chapter 23: Cytokines and interferons and their receptors In *William E. Paul Fundamental Immunology Fifth edition* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 701-48
- Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A, et Simms HH (2000) The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis *J Leukoc Biol* **68**:158-66
- Ley K (2002) Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils *Immunol Rev* **186**:8-18
- Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, Muller-Hermelink HK, et Steinmann GG (1984) Admission criteria for immunogerontological studies in man: The senieur protocol *Mech Ageing Dev* **28**: 47-55
- Lopez AF, Williamson DJ, Gamble JR, Begley CG, Harlan JM, Klebanoff SJ, Waltersdorff A, Wong G, Clark SC, et Vadas MA (1986) Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival *J Clin Invest* **78**:1220-8
- Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, et Salmon M (2001) Neutrophil ageing and immunesenescence *Mech Ageing Dev* **122**:1521-35
- Louria DB, Sen P, et Buse M (1982) Age-dependent differences in outcome of infections, with special reference to experiments in mice *J Am Geriatr Soc* **30**:769-73
- Martinez-Moczygemba M et Huston DP (2001) Proteasomal regulation of betac signaling reveals a novel mechanism for cytokine receptor heterotypic desensitization *J*

Clin Invest **108**:1797-806

- Martinez-Moczygemba M et Huston DP (2003) Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF *J Allergy Clin Immunol* **112**:653-65; quiz 666
- McKinley L, Kim J, Bolgos GL, Siddiqui J, et Remick DG (2005) CXC chemokines modulate IgE secretion and pulmonary inflammation in a model of allergic asthma *Cytokine* **32**:178-85
- Minoo P, Zadeh MM, Rottapel R, Lebrun JJ, et Ali S (2004) A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling *Blood* **103**:1398-407
- Morris MR, Doull IJ, Dewitt S, et Hallett MB (2005) Reduced iC3b-mediated phagocytotic capacity of pulmonary neutrophils in cystic fibrosis *Clin Exp Immunol* **142**:68-75
- Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, et Edwards SW (1998) Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival *Blood* **92**:2495-502
- Mustelin T, Vang T, et Bottini N (2005) Protein tyrosine phosphatases and the immune response *Nat Rev Immunol* **5**:43-57
- Naccache PH, Faucher N, Borgeat P, Gasson JC, et DiPersio JF (1988) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the excitation-response coupling sequence in human neutrophils *J Immunol* **140**:3541-6
- Naccache PH, Hamelin B, Gaudry M, et Bourgoin S (1991) Priming of calcium mobilization in human neutrophils by granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor: evidence for an involvement of phospholipase D-derived phosphatidic acid *Cell Signal* **3**:635-44

Nahas N, Molski TF, Fernandez GA, et Sha'afi RI (1996) Tyrosine phosphorylation and activation of a new mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascade in human neutrophils stimulated with various agonists *Biochem J* **318** (Pt 1):247-53

Nakagawa M, Terashima T, D'yachkova Y, Bondy GP, Hogg JC, et van Eeden SF (1998) Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes *Circulation* **98**:2307-13

Nathan CF (1989) Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G *Blood* **73**:301-6

Nebi T, Pestonjamas KN, Leszyk JD, Crowley JL, Oh SW, et Luna EJ (2002) Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes *J Biol Chem* **277**:43399-409

Otabor I, Tyagi S, Beurskens FJ, Ghiran I, Schwab P, Nicholson-Weller A, et Klickstein LB (2004) A role for lipid rafts in C1q-triggered O₂⁻ generation by human neutrophils *Mol Immunol* **41**:185-90

Pei D, Wang J, et Walsh CT (1996) Differential functions of the two Src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1 *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:1141-5

Petrin D, Turcotte S, Gilbert AK, Rola-Pleszczynski M, et Stankova J (2005) The anti-apoptotic effect of leukotriene B(4) in neutrophils: A role for phosphatidylinositol 3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and Mcl-1 *Cell Signal* **18**:479-87

Phair JP, Kauffman CA, Bjornson A, Gallagher J, Adams L, et Hess EV (1978) Host

defenses in the aged: evaluation of components of the inflammatory and immune responses *J Infect Dis* **138**: 67-73

Piazzolla G, Tortorella C, Serrone M, Jirillo E, et Antonaci S (1998) Modulation of cytoskeleton assembly capacity and oxidative response in aged neutrophils *Immunopharmacol Immunotoxicol* **20**:251-66

Poole AW et Jones ML (2005) A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail *Cell Signal* **17**:1323-32

Quelle FW, Sato N, Witthuhn BA, Inhorn RC, Eder M, Miyajima A, Griffin JD, et Ihle JN (1994) JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region *Mol Cell Biol* **14**:4335-41

Radsak MP, Salih HR, Rammensee HG, et Schild H (2004) Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival *J Immunol* **172**:4956-63

Rao KM, Currie MS, Padmanabhan J, et Cohen HJ (1992) Age-related alterations in actin cytoskeleton and receptor expression in human leukocytes *J Gerontol* **47**:B37-44

Rao P et Mufson RA (1995) A membrane proximal domain of the human interleukin-3 receptor beta c subunit that signals DNA synthesis in NIH 3T3 cells specifically binds a complex of Src and Janus family tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase *J Biol Chem* **270**:6886-93

Rapoport AP, Abboud CN, et DiPersio JF (1992) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation *Blood Rev* **6**:43-57

Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, et Sambhara S (2002) Cutting

edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging *J Immunol* **169**:4697-701

Roos D, van Bruggen R, et Meischl C (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils *Microbes Infect* **5**:1307-15

Rosenberg HF et Gallin JI (2003) Chapter 37: Inflammation In *William E. Paul Fundamental Immunology Fifth edition* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 1151-70

Samelson LE (2002) Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins *Annu Rev Immunol* **20**:371-94

Sato N, Sakamaki K, Terada N, Arai K, et Miyajima A (1993) Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling *EMBO J* **12**:4181-9

Savill J (1997) Apoptosis in resolution of inflammation *J Leukoc Biol* **61**:375-80

Scheel-Toellner D, Wang K, Assi LK, Webb PR, Craddock RM, Salmon M, et Lord JM (2004) Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis *Biochem Soc Trans* **32**:679-81

Schmidt-Arras DE, Bohmer A, Markova B, Choudhary C, Serve H, et Bohmer FD (2005) Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases *Mol Cell Biol* **25**:3690-703

Schroder AK et Rink L (2003) Neutrophil immunity of the elderly *Mech Ageing Dev* **124**:419-25

Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes *Annu Rev Immunol* **23**:197-223

- Seres I, Csongor J, Mohacsi A, Leovey A, et Fulop T (1993) Age-dependent alterations of human recombinant GM-CSF effects on human granulocytes *Mech Ageing Dev* **71**:143-54
- Sha'afi RI et Molski TF (1988) Activation of the neutrophil *Prog Allergy* **42**:1-64
- Shao D, Segal AW, et Dekker LV (2003) Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils *FEBS Lett* **550**:101-6
- Shen L, Fahey JV, Hussey SB, Asin SN, Wira CR, et Fanger MW (2004) Synergy between IL-8 and GM-CSF in reproductive tract epithelial cell secretions promotes enhanced neutrophil chemotaxis *Cell Immunol* **230**:23-32
- Shen SH, Bastien L, Posner BI, et Chretien P (1991) A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases *Nature* **352**:736-9
- Sheth K, Friel J, Nolan B, et Bankey P (2001) Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase increases lipopolysaccharide induced inhibition of apoptosis in neutrophils by activating extracellular signal-regulated kinase *Surgery* **130**:242-8
- Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, Yi T, Ihle JN, Matthews RJ, Thomas ML, et Beier DR (1993) Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene *Cell* **73**:1445-54
- Simon HU (2003) Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation *Immunol Rev* **193**: 101-10
- Simons K et Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes *Nature* **387**:569-72

- Smith WB, Gamble JR, et Vadas MA (1994) The role of granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors in neutrophil transendothelial migration: comparison with interleukin-8 *Exp Hematol* **22**:329-34
- Somani AK, Bignon JS, Mills GB, Siminovitch KA, et Branch DR (1997) Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase *J Biol Chem* **272**:21113-9
- Stanley E, Ralph S, McEwen S, Boulet I, Holtzman DA, Lock P, et Dunn AR (1991) Alternatively spliced murine lyn mRNAs encode distinct proteins *Mol Cell Biol* **11**:3399-406
- Starr R et Hilton DJ (1999) Negative regulation of the JAK/STAT pathway *Bioessays* **21**:47-52
- Tiku K, Tiku ML, et Skosey JL (1986) Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils *J Immunol* **136**:3677-85
- Toker A et Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase *Nature* **387**:673-6
- Tortorella C, Polignano A, Piazzolla G, Serrone M, Jirillo E, et Antonaci S (1996) Lipopolysaccharide-, granulocyte-monocyte colony stimulating factor and pentoxifylline-mediated effects on formyl-methionyl-leucine-phenylalanine-stimulated neutrophil respiratory burst in the elderly *Microbios* **85**:189-98
- Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Jirillo E, et Antonaci S (1999) Age-related effects of oxidative metabolism and cyclic AMP signaling on neutrophil apoptosis *Mech Ageing Dev* **110**:195-205
- Tortorella C, Piazzolla G, Napoli N, et Antonaci S (2001) Neutrophil apoptotic cell death: does it contribute to the increased infectious risk in aging? *Microbios*

106:129-36

- Townley R, Shen SH, Banville D, et Ramachandran C (1993) Inhibition of the activity of protein tyrosine phosphate 1C by its SH2 domains *Biochemistry* **32**:13414-8
- Tran KT, Rusu SD, Satish L, et Wells A (2003) Aging-related attenuation of EGF receptor signaling is mediated in part by increased protein tyrosine phosphatase activity *Exp Cell Res* **289**: 359-67
- Treweeke AT, Aziz KA, et Zuzel M (1994) The role of G-CSF in mature neutrophil function is not related to GM-CSF-type cell priming *J Leukoc Biol* **55**:612-6
- Tsui HW, Siminovitch KA, de Souza L, et Tsui FW (1993) Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene *Nat Genet* **4**:124-9
- Tyagi SR, Winton EF, et Lambeth JD (1989) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes human neutrophils for increased diacylglycerol generation in response to chemoattractant *FEBS Lett* **257**:188-90
- Veillette A, Latour S, et Davidson D (2002) Negative regulation of immunoreceptor signaling *Annu Rev Immunol* **20**:669-707
- Vlahos CJ et Matter WF (1992) Signal transduction in neutrophil activation. Phosphatidylinositol 3-kinase is stimulated without tyrosine phosphorylation *FEBS Lett* **309**:242-8
- Ward C, Murray J, Clugston A, Dransfield I, Haslett C, et Rossi AG (2005) Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and extracellular signal-regulated kinase activation in human neutrophils *Eur J Immunol* **35**:2728-37
- Watanabe S, Itoh T, et Arai K (1997) Roles of JAK kinase in human GM-CSF receptor

signals *Leukemia* **11 Suppl 3**:76-8

Watt AP, Courtney J, Moore J, Ennis M, et Elborn JS (2005) Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis *Thorax* **60**:659-64

Wei S, Liu JH, Epling-Burnette PK, Gamero AM, Ussery D, Pearson EW, Elkabani ME, Diaz JJ, et Djeu JY (1996) Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *J Immunol* **157**:5155-62

Weinmann P, Gaehtgens P, et Walzog B (1999) Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3 *Blood* **93**:3106-15

Wenisch C, Patruta S, Daxbock F, Krause R, et Horl W (2000) Effect of age on human neutrophil function *J Leukoc Biol* **67**:40-5

Woodcock JM, Bagley CJ, et Lopez AF (1999) The functional basis of granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-3 and interleukin-5 receptor activation, basic and clinical implications *Int J Biochem Cell Biol* **31**:1017-25

Yasui K, Sekiguchi Y, Ichikawa M, Nagumo H, Yamazaki T, Komiyama A, et Suzuki H (2002) Granulocyte macrophage-colony stimulating factor delays neutrophil apoptosis and primes its function through Ia-type phosphoinositide 3-kinase *J Leukoc Biol* **72**:1020-6

Yeh SH, Chang FR, Wu YC, Yang YL, Zhuo SK, et Hwang TL (2005) An anti-inflammatory ent-kaurane from the stems of *Annona squamosa* that inhibits

various human neutrophil functions *Planta Med* **71**:904-9

Yetter A, Uddin S, Krolewski JJ, Jiao H, Yi T, et Plataniias LC (1995) Association of the Interferon-Dependent Tyrosine Kinase Tyk-2 With the Hematopoietic Cell Phosphatase *J Biol Chem* **270**:18179-82

Yi T et Ihle JN (1993) Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand *Mol Cell Biol* **13**:3350-8

Yousefi S, Green DR, Blaser K, et Simon HU (1994) Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:10868-72

Yousefi S et Simon HU (2003) SHP-1: a regulator of neutrophil apoptosis *Semin Immunol* **15**:195-9

Yousfi ME, Mercier S, Breuille D, Denis P, Papet I, Mirand PP, et Obled C (2005) The inflammatory response to vaccination is altered in the elderly *Mech Ageing Dev* **126**:874-81

Yuli I, Tomonaga A, et Synderman R (1982) Chemoattractant receptor functions in human polymorphonuclear leukocytes are divergently altered by membrane fluidizers *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:5906-10

Yuo A, Kitagawa S, Azuma E, Natori Y, Togawa A, Saito M, et Takaku F (1993) Tyrosine phosphorylation and intracellular alkalinization are early events in human neutrophils stimulated by tumor necrosis factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor *Biochim Biophys Acta* **1156**:197-203

Yuo A, Okuma E, Kitagawa S, et Takaku F (1997) Tyrosine phosphorylation of p38 but not extracellular signal-regulated kinase in normal human neutrophils stimulated by tumor necrosis factor: comparative study with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *Biochem Biophys Res Commun* **235**:42-6

Zhang Z, Shen K, Lu W, et Cole PA (2003) The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation *J Biol Chem* **278**:4668-74

Zhou MJ, Lublin DM, Link DC, et Brown EJ (1995) Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon Fc gamma RII or Fc gamma RIIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory burst *J Biol Chem* **270**:13553-60

Zu YL, Qi J, Gilchrist A, Fernandez GA, Vazquez-Abad D, Kreutzer DL, Huang CK, et Sha'afi RI (1998) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation *J Immunol* **160**:1982-9