

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**Rôle de Dok-1 et Dok-2
lors du développement des cellules T CD8⁺
effectrices et mémoires**

Par
Constance Laroche-Lefebvre

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examinateur interne

Alain Lamarre
INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Sylvie Fournier
Département d'immunologie
Université McGill

Directeur de recherche

Pascale Duplay
INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

Simona Stäger
INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Les protéines de la famille Dok sont des molécules dites adaptatrices. Elles possèdent différents domaines et motifs qui leur permettent de recruter, à l'aide d'interactions protéine-protéine des molécules impliquées dans la transduction de signaux intracellulaires. Parmi les 7 membres de cette famille, Dok-1 et Dok-2 sont exprimés dans les lymphocytes T. Les protéines Dok sont des régulateurs négatifs de la voie de signalisation initiée par le TCR. Les cibles régulées par les protéines Dok sont encore mal connues.

Les lymphocytes T CD8 sont des cellules de l'immunité adaptative qui participent à la réponse de l'hôte suite à une infection par un pathogène. Lors d'une première infection, les cellules CD8 naïves se différencient en cellules effectrices puis en cellules mémoires qui seront capables de répondre très rapidement et plus efficacement lors d'une nouvelle rencontre avec les antigènes du pathogène. Trois types de signaux sont nécessaires pour obtenir l'induction d'une réponse effectrice et mémoire efficace: les signaux générés en aval du TCR, ceux de co-stimulation et ceux provenant de cytokines pro-inflammatoires.

Il a été clairement démontré *in vitro* que les protéines Dok régulent à la baisse la force du signal initié suite à la stimulation TCR. Par contre, l'influence des protéines Dok dans la réponse des cellules T suite à une infection n'a pas encore été étudiée. Étant donné que la réponse CD8 à un pathogène est influencée par la force du signal généré en aval du TCR, nous avons émis l'hypothèse que les protéines Dok contrôlent *in vivo* le niveau d'activation des lymphocytes T CD8 et par le fait même leur différenciation en cellules effectrices et mémoires.

Afin de démontrer cette hypothèse, nous avons étudié l'influence de Dok dans la réponse CD8 suite à une infection avec le virus de la vaccine. Nous avons comparé la réponse CD8 effectrice *in vivo* lors d'une infection i.v. par le virus de la vaccine exprimant le peptide ova₂₅₇₋₂₆₄ (VV-ova) dans 2 types de modèles de souris. Pour le premier modèle, nous avons infecté directement des souris C57BL/6 sauvage (WT) ou Dok-1^{-/-}Dok-2^{-/-}(DKO). Dans un deuxième modèle, nous avons générée des souris mutantes TCR transgénique (OTI) Dok1^{-/-} Dok2^{-/-}. Le TCR OTI reconnaît le peptide ova₂₅₇₋₂₆₄ présenté par H-2K^b. Pour ce modèle, nous avons transféré adoptivement dans des souris sauvages, les cellules T CD8⁺ naïves isolées de souris C57BL/6 OTI WT ou OTI Dok1^{-/-}Dok2^{-/-} un jour avant l'infection par VV-ova. Nous avons récolté les organes lymphoïdes secondaires à différents temps post-infection et comparé les réponses CD8 *in vivo* entre les souris WT et Dok1^{-/-}Dok2^{-/-} en étudiant l'apparition de marqueurs d'activation, les fonctions effectrices et l'induction de facteur de transcription connus pour réguler la réponse CD8.

Cette étude a mis en évidence une légère diminution de l'expansion des cellules T CD8⁺ Dok-1^{-/-}Dok-2^{-/-} spécifiques au virus. Suite à l'infection par VV-ova, les cellules T CD8⁺ DKO effectrices générées ne possèdent pas d'altération au niveau de leur capacité de prolifération, ni au niveau de l'induction d'apoptose. Par contre, ces cellules expriment une plus forte concentration de TCR à la surface cellulaire et sécrètent une plus grande quantité de granzyme B et TNF suite à la stimulation *ex vivo*. De plus, les résultats obtenus démontrent que les cellules en absence de Dok-1 et Dok-2 développent un problème majeur au niveau de la formation de la mémoire immunologique suite à l'infection par VV-ova. L'ensemble de ces données démontrent une implication cruciale des protéines Dok-1 et Dok-2 au niveau du seuil d'activation des cellules naïves, ainsi qu'au niveau de la boucle de rétro-inhibition qui empêche l'hyper-activation des cellules suite à leur activation.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	VI
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	VIII
INTRODUCTION.....	2
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1 ACTIVATION D'UN LYMPHOCYTE T CD8 NAÏF.....	7
1.1 Les trois signaux d'activation.....	7
1.1.1 Signal 1 : Reconnaissance d'un épitope spécifique.....	8
1.1.2 Signal 2 : Co-stimulation.....	9
1.1.3 Signal 3 : Cytokines.....	15
1.2 Cascade de signalisation intracellulaire.....	17
1.2.1 Régulation positive,,,.....	17
1.2.2 Régulation négative.....	20
2 FAMILLE DES PROTÉINES DOK.....	20
2.1 Domaines et structure.....	21
2.1.1 Pleckstrin homology (PH).....	21
2.1.2 Phosphotyrosine binding (PTB).....	22
2.1.3 Motif ciblé par Src-homology 2 (SH2).....	22
2.1.4 Motif ciblé par Src-homology 3 (SH3).....	23
2.2 Expression.....	23
2.3 Rôle des protéines Dok-1 et Dok-2 dans les cellules T.....	25
3 MODÈLE D'INFECTION VIRAL EXPÉRIMENTAL.....	28
3.1 Modèle d'infection par le virus de la vaccine.....	28
3.2 Étapes d'une réponse cellulaire à une infection virale aiguë.....	29
3.2.1 Lymphocytes T CD8 naïf.....	29
3.2.2 Activation et expansion.....	30
3.2.3 Contraction.....	34
3.2.4 Maintien de la mémoire.....	35

ARTICLE.....	38
DISCUSSION.....	92
CONCLUSION.....	98
RÉFÉRENCES.....	100
ANNEXE.....	109

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure A :	Représentation schématique du modèle des 3 signaux d'activation des cellules T CD8.....	7
Figure B :	Représentation schématique des différentes molécules de co-stimulation impliquées lors de l'activation des cellules T.....	10
Figure C :	Représentation schématique de la signalisation intracellulaire du co-récepteur CD28.....	12
Figure D :	Vue d'ensemble de la signalisation du TCR.....	19
Figure E :	Représentation schématique des domaines structuraux partagés par les membres de la famille des protéines Dok.....	21
Figure F :	La famille des protéines Dok.....	23
Figure G :	Modèle simplifié du rôle des protéines Dok dans la signalisation du TCR.....	27
Figure H :	Représentation schématique de la cinétique d'une réponse T CD8 spécifique lors d'une infection virale aiguë.....	31
Tableau A :	Expression de Dok-1/2/3 dans les cellules hématopoïétiques.....	24
Tableau B :	Expression des différents marqueurs à la surface cellulaire et facteurs de transcription jouant un rôle dans la réponse T CD8 spécifique à un virus selon le niveau de différenciation cellulaire.....	37
Figure 1 :	Down-modulation of Dok expression levels following TCR stimulation.....	80
Figure 2 :	The absence of Dok-1 and Dok-2 diminishes the response to VV-Ova <i>in vivo</i>	81
Figure 3 :	Dok-1 and Dok-2 promote the number of memory cells generated following VV-Ova infection.....	82
Figure 4 :	Absence of Dok-1 and Dok-2 does not affect proliferation and apoptosis <i>in vivo</i> after infection with VV.....	83

Figure 5 :	Dok proteins regulate the effector capacity of CD8+ T cells after infection with VV-Ova.....	84
Figure 6 :	IL-2 signaling is not affected by Dok-1/2 deficiency.....	85
Figure 7 :	Activation of mTOR, Akt and Erk-1/2 is comparable in WT and DKO effector CD8+ T cells after VV-Ova infection.....	86
Figure 8 :	Dok proteins regulate cell surface expression of TCR and PD-1 on effector CD8+ T cells during VV-Ova infection.....	87
Supplemental Figure 1 :	Purified naive DKO OT-I CD8 ⁺ T cells present a similar phenotype than WT OT-I CD8 ⁺ T cells and do not have a skewed distribution after VV-Ova infection and persist in absence of infection.....	88
Supplemental Figure 2 :	Dok1/2 regulate the cytokine production and Eomes expression of effector CD8+ T cells following LM-Ova infection	89
Supplemental Figure 3 :	Dok1/2 regulate the cell surface TCR expression of CD8+ T cells stimulated <i>in vitro</i>	90

LISTE DES ABRÉVIATIONS

7-AAD	7-amino-actinomycin D
ADN	Acide désoxyribonucléique
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCR4	CXCR4 chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritic cell
DKO	Double knock out
DOK	Downstream of tyrosine kinase
EOMES	Eomesodermin
I.V.	Intraveineuse
ID	Inhibitor of DNA binding
IFN	Interféron
IG	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KLRG-1	Killer lectin receptor G-1
LLMC	Long lived memory cell
LM	Listeria monocytogenes

MPEC	Memory precursol effector cell
MTOR	Mammalian target of rapamycin
NF-κB	Nucleor factor- κB
PD	Programmed cell death
PH	Pleckstrin homology
pi	post-infection
PTB	Phospho-tyrosine binding
RAS-GRP	Ras-guanyl-releasing protein
RAS-GAP	Ras GTPase activating protein
S6K	Ribosomal protein S6 kinase
SH	Src homology
SHIP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
SLAM	Signaling lymphocytic activation molecule
SLEC	Short lived effector cell
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TCR	T cell receptor
TNF	Tumor necrosis factor
VV	Virus de la vaccine
VV-OVA	Virus de la vaccine-OVA
WT	Wild type
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase-70

INTRODUCTION

Suite à une infection virale, le système immunitaire inné et adaptatif joue un rôle essentiel dans la défense de l'organisme, menant généralement à la détection et l'élimination du pathogène. Le virus, étant un agent infectieux dépendant de la présence d'un hôte pour sa réPLICATION et sa dissémination, il nécessite le développement de réponses humorale et cellulaire spécifiques pour être éliminé et pour développer une protection immunitaire à long terme. Les principales cellules de la réponse cellulaire sont les lymphocytes T CD8⁺. Ces cellules suivent différentes étapes de différenciation qui permettent à la fois la destruction du pathogène au cours d'une infection aiguë et le développement d'une protection à long terme en cas de réinfection ultérieure à l'aide de la formation de cellules mémoires. L'efficacité des cellules produites lors de ces phases de la réponse dépend essentiellement des signaux reçus par la cellule T CD8⁺ naïve. Parmi les facteurs essentiels à l'initiation d'une réponse cellulaire efficace, on retrouve la force et la nature du signal TCR, le type et l'intensité des signaux de co-stimulation, ainsi que la présence de cytokines inflammatoires (Butler *et al.*, 2011). Suite à ces signaux, une cascade de réactions intracellulaires va être engendrée et impliquera une multitude de facteurs qui peuvent favoriser ou inhiber la transmission du signal. L'objectif de cette cascade de signalisations est l'activation de différents facteurs de transcription qui stimuleront plusieurs processus cellulaires dont, entre autres, la prolifération et la survie, ainsi que la différenciation cellulaire.

Une cellule naïve qui reçoit ces signaux de manière adéquate, suite à une infection virale aiguë (par exemple: Virus de la vaccine), va d'abord entrer dans une phase d'activation et d'expansion. À ce moment, les cellules stimulées vont acquérir une grande capacité de prolifération, ainsi qu'une capacité de sécréter des molécules cytotoxiques. La grande majorité de ces cellules cytotoxiques effectrices vont avoir une très courte durée de vie et ainsi sont communément appelées « short lived effector cell » (SLEC). Suite à l'atteinte du pic d'expansion, correspondant aussi à l'élimination du pathogène lors d'une infection aiguë, la grande majorité de ces cellules vont mourir par apoptose. Seulement un faible pourcentage (5-10%) des cellules produites lors de cette étape survivront. Ces cellules sont nommées « memory precursor effector cell » (MPEC). Les MPEC sont les cellules qui ont la capacité de se différencier en « long lived memory cell » (LLMC) qui formeront un bassin de cellules mémoires capables de répondre plus rapidement et efficacement en cas de réinfection par le même pathogène.

Lors de toutes ces étapes, la signalisation intracellulaire est cruciale et permet de développer des réponses adéquates selon les signaux reçus par les cellules. Plusieurs types de protéines interagissent et permettent la transmission et la régulation du signal. Parmi celles-ci, on retrouve, entre autres, des kinases, des phosphatases et des molécules adaptatrices. Les molécules adaptatrices ne possèdent pas de fonction enzymatique, mais elles ont une grande capacité à recruter d'autres molécules effectrices à proximité de leur cible d'action. Parmi ces molécules-ci, on retrouve la famille des protéines Dok.

Les protéines Dok sont une famille de molécules adaptatrices qui contient à ce jour 7 membres (Dok-1 à Dok-7). Parmi ceux-ci, Dok-1/2/3 sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques et seulement Dok-1 et Dok-2 sont exprimés dans les cellules T. Les protéines Dok-1 et Dok-2 régulent les voies de signalisation du TCR, de CD28, de SLAM, de CD2 ainsi que CXCR4 (Nemorin *et al.*, 2000; Latour *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2001; Latour *et al.*, 2003; Gerard *et al.*, 2004; Boulay *et al.*, 2005; Okabe *et al.*, 2005; Yasuda *et al.*, 2007; Mashima *et al.*, 2009). Par contre, toutes ces études ont été effectuées à l'aide de modèle *in vitro*, avec des lignées cellulaires ou des cellules T primaires. Aucune étude, à ce jour, n'a été faite dans un modèle *in vivo*. C'est pourquoi mon projet de recherche porte sur l'implication des protéines Dok-1 et Dok-2 dans le développement des cellules T CD8⁺ effectrices et mémoires lors d'une infection par le virus de la vaccine dans un modèle murin *in vivo*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ACTIVATION D'UN LYMPHOCYTE T CD8 NAÏF

Les lymphocytes T CD4 et CD8 sont un type de cellules spécifiques faisant partie du système immunitaire adaptatif. Ce sont les principaux acteurs de l'immunité cellulaire versus les cellules B, qui elles sont responsables de l'immunité humorale. Leur rôle est de défendre l'organisme contre les cellules devenues étrangères suite à une infection virale ou encore suite à leur transformation en cellules cancéreuses. Pour être activé, un lymphocyte T CD8 naïf doit recevoir différents signaux, dont la reconnaissance d'un épitope spécifique, ainsi que la présence de signaux de co-stimulation et d'inflammation. Ces signaux permettront d'induire une cascade de réactions intracellulaires nécessaires au développement de ces cellules en lymphocytes matures et fonctionnels.

1.1 Les trois signaux d'activation

Suite à l'entrée du pathogène dans l'organisme et l'action de la première ligne de défense par le système immunitaire inné, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) ayant internalisées le pathogène vont migrer au niveau des ganglions lymphatiques. À ce moment, ce sont particulièrement les cellules dendritiques qui vont présenter les antigènes via les molécules de CMH I dans le but d'activer les cellules T CD8 naïves spécifiques. Une activation efficace et optimale des lymphocytes T nécessite l'implication de trois signaux (Figure A) : la reconnaissance d'un épitope spécifique par le TCR, un signal de co-stimulation et un environnement inflammatoire (Hernandez *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2007; Butler *et al.*, 2011).

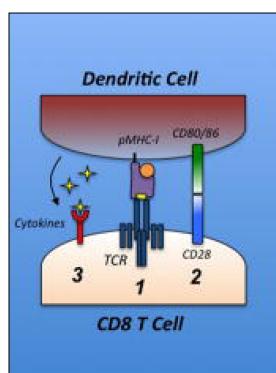


Figure A: Représentation schématique du modèle des 3 signaux d'activation des cellules T CD8

Signal 1 : TCR; Signal 2 : CD28; Signal 3 : Cytokines

(Butler, Nolz *et al.*, 2011)

1.1.1 Signal 1 : Reconnaissance d'un épitope spécifique

Le récepteur TCR est une structure qui possède beaucoup de similarité avec les immunoglobulines produites par les cellules B. Il est composé d'une chaîne α et une chaîne β reliées entre elles par des cystéines créant des ponts disulfures. Chaque chaîne contient un domaine constant et un domaine variable qui possède trois régions hyper-variables. Les chaînes possèdent une région transmembranaire, qui permet l'ancrage du récepteur à la membrane, ainsi qu'une courte queue cytoplasmique. Les domaines transmembranaires du TCR possèdent des résidus chargés positivement qui leur permettent de former un complexe avec des molécules CD3 (Rojo *et al.*, 2008). Cette particularité est essentielle à la transduction du signal puisque le récepteur TCR ne possède pas de domaine cytoplasmique permettant la signalisation. Ce sont donc les molécules CD3, possédant des régions dans le cytoplasme nommées ITAMs, qui ont la capacité d'induire une cascade de réactions intracellulaires qui transmettent ainsi le signal reçu par le TCR. En plus du TCR et des molécules CD3, le complexe fonctionnel contient le co-récepteur CD8, qui augmente la stabilité de la liaison entre le complexe TCR et le complexe CMH-antigène.

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un groupe de glycoprotéines transmembranaires qui peut être divisé en deux classes. On y retrouve les molécules de CMH de classe I et de classe II, qui sont reconnues respectivement par les lymphocytes T CD8 et CD4. Les molécules de CMH de classe I sont formées d'une chaîne lourde α, contenant trois domaines α1, α2 et α3, qui sont associé à une molécule de β2-microglobuline par des liens non covalents. La structure est ancrée dans la membrane cellulaire grâce à un domaine transmembranaire, contenant plusieurs acides aminés hydrophobes, qui est rattaché au domaine α3. La structure tridimensionnelle des différents domaines du CMH I forme une poche de fixation du peptide qui permet ainsi, lors de sa maturation vers la membrane cellulaire, de présenter un antigène spécifique aux cellules T CD8.

L'activation d'une cellule T CD8 naïve nécessite tout d'abord une stimulation appropriée du récepteur TCR. La liaison du TCR avec un peptide spécifique présenté par une molécule de CMH I sur une cellule dendritique est la première étape menant à la formation d'une synapse immunologique (Dustin, 2004). Le signal 1 est crucial à l'activation d'une cellule naïve et est dépendant, entre autres, de la quantité et de l'accessibilité du peptide, ainsi que de la force

d'affinité du récepteur de la cellule T (Hernandez *et al.*, 2002; Butler *et al.*, 2011). L'interaction doit être suffisamment forte et soutenue afin d'induire un signal intracellulaire, mais ne doit pas être trop forte pour ne pas créer une hyperactivation de la cellule qui la conduirait vers l'apoptose.

1.1.2 Signal 2 : Co-signalisation

Suite à la liaison du TCR avec le complexe CMH-antigène, un signal de co-stimulation positif est essentiel à l'amplification de la transduction du signal. Il existe plusieurs types de molécules de co-signalisation qui peuvent jouer un rôle positif ou négatif au niveau de la signalisation du TCR (Figure B). En tant que régulateur positif de la signalisation, on retrouve par exemple des molécules telles que CD28, CD27, OX40 et 4-1BB. Tandis que les régulateurs négatifs principaux connus sont PD-1 et CTLA-4 (Williams *et al.*, 2007; Butler *et al.*, 2011). Une cellule dendritique qui a été activée grâce à une interaction entre ses TLRs (Toll-like receptors) et des motifs PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) ou suite à une interaction impliquant la molécule CD40 avec une cellule T CD4⁺, va exprimer les ligands spécifiques à certaines molécules de co-stimulation en plus de présenter son antigène (Fujii *et al.*, 2004; Mescher *et al.*, 2006). Lorsqu'une cellule T CD8 naïve reçoit le signal 1 du TCR, mais ne reçoit pas de signal de co-stimulation, elle va entrer dans un état d'anergie (Hernandez *et al.*, 2002; Mescher *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2011). La régulation de ce deuxième signal de co-stimulation permet ainsi de contrôler efficacement l'activation des lymphocytes T CD8 naïfs en fonction du contexte d'infection.

On retrouve deux vagues de co-signalisation lors de l'activation d'un lymphocyte T. D'abord, la première vague, qui est essentielle à l'activation initiale de la cellule, implique le co-récepteur CD28 et ses ligands. La deuxième vague, qui peut inclure une variété de différents co-récepteurs, est induite suite à l'activation et joue un rôle important dans le maintien de la signalisation, ainsi que la diversification et l'amplification de la réponse T (Cannons *et al.*, 2001).

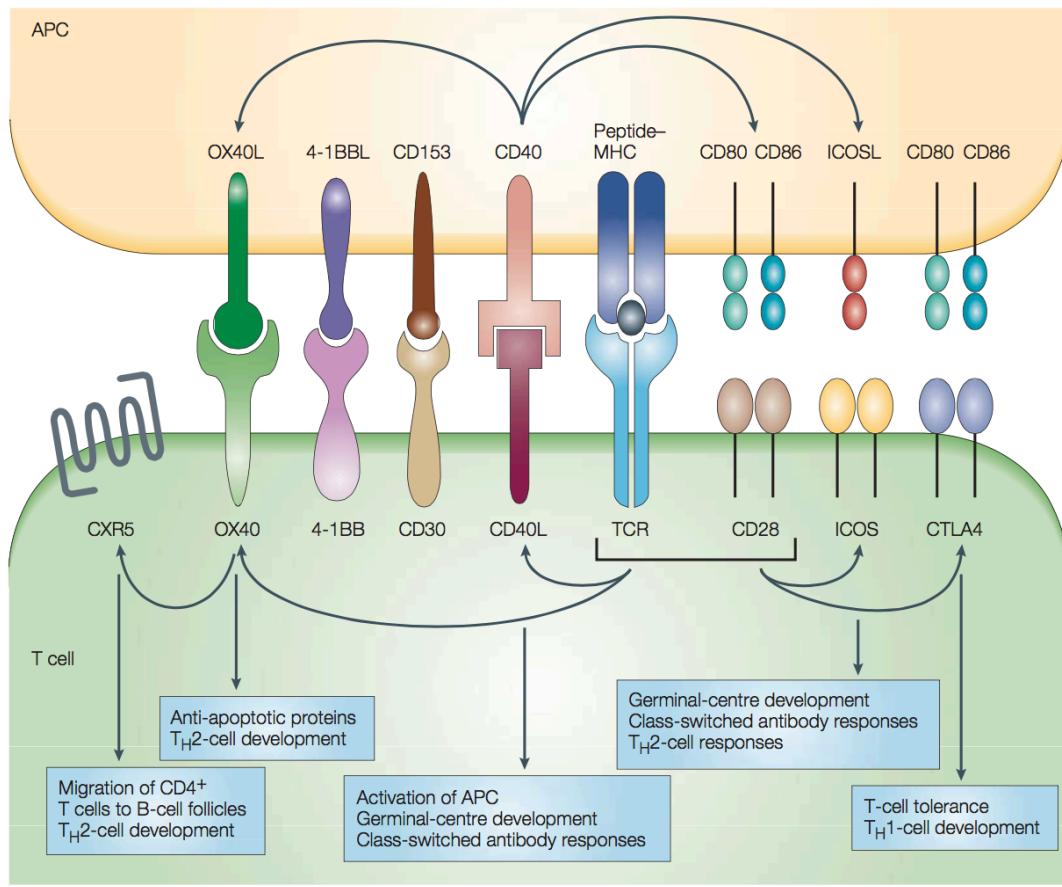


Figure B: Représentation schématique des différentes molécules de co-stimulation impliquée lors de l'activation des cellules T.

Chaque co-récepteur de la cellule T peut interagir avec son ligand lorsqu'il est exprimé à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (APC) et peut ainsi induire un signal positif ou négatif selon la nature des molécules impliquées.

(Acuto and Michel, 2003)

Régulateurs positifs

CD28

CD28 est la molécule de co-stimulation au niveau des cellules T la plus étudiée à ce jour. Il s'agit d'une glycoprotéine homodimérique, membre de la superfamille des immunoglobulines et qui est caractérisée par un domaine extracellulaire variable « Ig-like » (DuttaGupta *et al.*, 2010), un domaine transmembranaire et un petit domaine cytoplasmique permettant la transduction du signal. Le récepteur CD28 possède deux ligands spécifiques. D'abord, B7.1 (CD80) qui est exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène suite à leur activation, puis B7.2 (CD86) qui est exprimé de manière constitutive sur les CPA (Acuto *et al.*, 2003). Suite à la liaison du récepteur avec un de ses ligands, CD28 est phosphorylé au niveau du motif Tyr-Met-Asn-Met, situé sur la queue cytoplasmique, par Lck et/ou Fyn, lui permettant ainsi de recruter la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) (Michel *et al.*, 2001). La signalisation induite par la molécule de co-stimulation va permettre d'amplifier le signal du TCR via la cascade d'activation déclenchée par PI3K. Cette signalisation intracellulaire comprend essentiellement l'activation des molécules PI3K, Itk, Vav1 et Akt, ainsi que l'inhibition par phosphorylation de la kinase glycogène-synthétase 3a (GSK3a) (Acuto *et al.*, 2003). La signalisation TCR et CD28 synergisent pour permettre l'activation de gènes favorisant la différenciation et la prolifération des cellules T (Figure C).

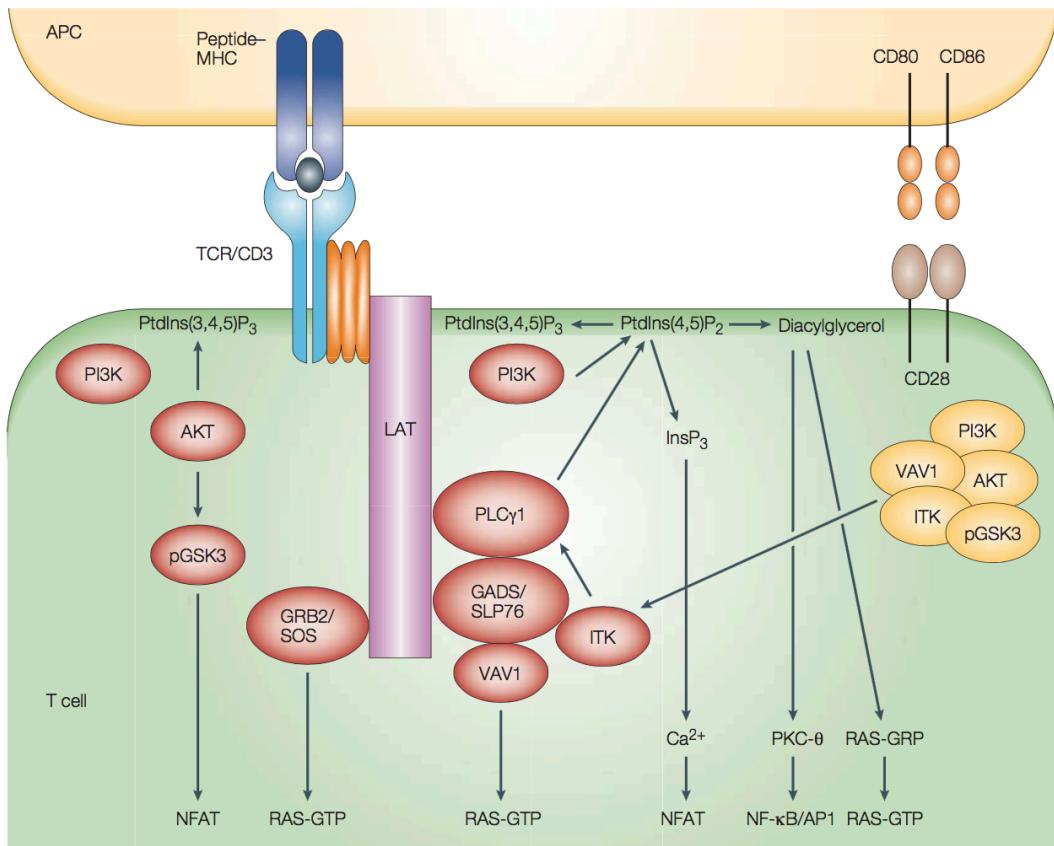


Figure C: Représentation schématique de la signalisation intracellulaire du co-récepteur CD28.

La liaison de CD28 à ses ligands permet d'amplifier le signal TCR via la voie PI3K, qui active certains facteurs de transcription tels que NFAT et NF-κB.

(Acuto and Michel, 2003)

CD27

CD27 est un co-récepteur, membre de la superfamille des TNFR (tumor necrosis factor receptor), qui est exprimé de manière constitutive sur les cellules T CD8 naïves (Willoughby *et al.*, 2014). Les CPA activés vont exprimer le ligand, nommé CD70. L'activation du TCR avec en parallèle la stimulation du récepteur CD27 augmente la réponse primaire des lymphocytes T. Effectivement, la co-stimulation via CD27 favorise davantage la génération de cellules T CD8 effectrices et augmente leur niveau d'expression de perforine (Willoughby *et al.*, 2014). De plus, les cellules mémoires produites vont avoir une durée de vie plus courte que celles qui ont reçu un signal de co-stimulation par d'autres récepteurs tel que 4-1BB. Certaines études suggèrent que cette conséquence sur la réponse T serait due, entre autres, à la différence au niveau de l'expression du récepteur à l'IL-2 et à la production d'interféron-γ (IFNγ). Effectivement, la co-stimulation via CD27 semble augmenter considérablement la quantité de récepteurs à l'IL-2 exprimés à la surface cellulaire, ainsi que la quantité d'IFNγ sécrétée lors d'une infection aiguë (Willoughby *et al.*, 2014). Ainsi, en augmentant considérablement le niveau d'expression du récepteur à l'IL-2 des cellules lors de leur différenciation, il contribuera au développement de cellules effectrices et de cellules mémoires à courte durée de vie (Mitchell *et al.*, 2010). En supplément, une forte production d'IFNγ va contribuer au déclin de la population de cellules mémoires au cours de la réponse.

4-1BB (CD137)

4-1BB est un co-récepteur faisant partie de la superfamille TNFR. Il est exprimé sur les cellules T suite à leur activation. Son ligand, nommé 4-1BBL, est exprimé au niveau des CPA préalablement activées. La signalisation via 4-1BB va, entre autres, encourager l'activation de NF-κB (Vinay *et al.*, 1998). Il s'agit donc d'un récepteur de co-stimulation qui promouvoit la différenciation et le développement des lymphocytes T (Cannons *et al.*, 2001). Comparativement à la signalisation via CD27, il va favoriser la génération d'une population de cellules mémoires centrales fonctionnelles permettant d'acquérir une protection immunitaire efficace à long terme (Willoughby *et al.*, 2014).

OX40 (CD134)

OX40 est un co-récepteur de la superfamille TNFR. Il est exprimé sur les cellules T seulement suite à leur activation. Tout comme son ligand, OX40L, qui est, entre autres, exprimé au niveau des CPA activées. La stimulation de ce récepteur va également induire l'activation de NF-κB, ce qui favorise la survie de la cellule. De plus, la signalisation via ce co-récepteur semble affecter à la hausse la production de cytokines par les cellules (De Smedt *et al.*, 2002).

Régulateurs négatifs

CTLA-4

CTLA-4 est une molécule de co-inhibition de la voie de signalisation du TCR. Elle fait partie de la famille CD28 et partage des similarités structurales avec la molécule de co-stimulation du même nom. Effectivement, CTLA-4 se lie aux mêmes ligands que CD28, mais avec une affinité de 10 à 20 fois plus élevée (Stamper *et al.*, 2001). Ce récepteur n'est pas exprimé de manière constitutive, mais plutôt suite à l'activation des lymphocytes T. Ainsi, lorsque CTLA-4 est exprimé à la surface, elle va compétitionner fortement avec CD28 pour la liaison avec les molécules B7-1 et B7-2, ce qui va inhiber le signal TCR en interrompant la signalisation par CD28 et en induisant des signaux d'inhibition au niveau intracellulaire. Il s'agit donc d'une molécule impliquée dans la rétro-inhibition de la signalisation du TCR (Linsley *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 2003).

PD-1

Le récepteur PD-1 est un co-inhibiteur de la signalisation du TCR. Il fait également partie de la famille CD28 et possède une structure contenant un domaine extracellulaire variable Ig-like, ainsi qu'un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique possédant deux sites de phosphorylation (Ishida *et al.*, 1992; Duttagupta *et al.*, 2009). Son expression à la surface des cellules T est induite suite à l'activation du TCR. Les ligands spécifiques à PD-1 sont membres de la famille B7 et se nomment PD-L1 et PD-L2 (Brown *et al.*, 2010). Suite à l'activation des cellules dendritiques, PD-L1 et PD-L2 sont légèrement exprimés à leur surface cellulaire. La fonction du récepteur PD-1 est, entre autres, de contrôler le signalisation du TCR impliquée

dans la tolérance périphérique et la régulation de la réponse T CD8 lors d'une infection virale (Fuse *et al.*, 2009; Duttagupta *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2015; Ilie *et al.*, 2016). L'expression de PD-1 est transitoire lors d'une infection aiguë. Il a aussi été démontré que lors d'une infection virale chronique, les cellules T expriment toujours le récepteur PD-1, qui est impliqué dans le processus menant à leur épuisement (exhaustion).

1.1.3 Signal 3 : Cytokines

Le troisième signal, l'environnement inflammatoire, est nécessaire à une signalisation intracellulaire optimale suite à l'activation du TCR, ainsi que pour éviter la tolérance. L'inflammation est médiée par la sécrétion de cytokines spécifiques telles que l'IL-12 et les interférons de type I (IFN α et IFN β). De plus, la sécrétion d'autres cytokines telles que l'IL-2, l'IL-15, TNF, IL-21 et l'IFNy peuvent influencer la réponse T CD8 (Butler *et al.*, 2011). L'importance de chaque cytokine lors d'une réponse à une infection varie selon le type de pathogène.

IL-12

L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique sécrétée rapidement par les phagocytes et les DC suite à l'infection et qui promouvoit la prolifération des cellules T CD8 activées (Williams *et al.*, 2007). En outre, elle est importante pour l'acquisition des capacités cytotoxiques des CTL telles que la sécrétion de granzyme B et d'IFNy. La quantité d'IL-12 sécrétée par les DC varie selon le pathogène et va donc avoir une importance variable selon le modèle d'infection. Lors d'une infection par le virus de la vaccine (VV), la présence d'IL-12 est très importante pour avoir une réponse efficace (Keppler *et al.*, 2009).

Interféron de type I

Les IFN- α et IFN- β sont deux interférons de type I qui peuvent jouer un rôle crucial lors de l'activation de la réponse T suite à une infection. Effectivement, selon le type de pathogène, les interférons de type I peuvent avoir un impact plus ou moins important. Dans un modèle où leur présence est induite, ils vont correspondre au signal 3 et pouvoir favoriser la prolifération et la survie des cellules T CD8 activées (Keppler *et al.*, 2009). Lors d'une infection par VV, les

interférons de type I semblent jouer un rôle, mais ne sont pas essentiels pour avoir une réponse T fonctionnelle (Mescher *et al.*, 2006).

IL-15

Le récepteur à l'IL-15 possède certaines similarités avec le récepteur à l'IL-2. Effectivement, ils partagent la même chaîne β qui correspond au marqueur CD122. Lorsqu'il est stimulé, son rôle principal est d'induire des signaux soutenant la prolifération cellulaire des cellules mémoires suite à la rencontre de l'antigène. L'IL-7 et l'IL-15 jouent un rôle crucial dans la génération et le maintien de la mémoire (Schluns *et al.*, 2003).

IL-2

L'interleukine-2 joue un rôle très important au niveau de la différenciation des lymphocytes T, ainsi que pour induire des signaux de survie cellulaire. La signalisation via l'IL-2R va activer le facteur de transcription STAT5. La signalisation par l'IL-2 est nécessaire à la production normale de perforine, de granzyme B et d'interféron- γ par les cellules T CD8 activées (Pipkin *et al.*, 2010). Lorsque la stimulation de l'IL-2R est grande, elle va favoriser la balance vers la différenciation des CTL en cellules effectrices plutôt que mémoires.

TNF

Le facteur de nécrose cellulaire (TNF) est une cytokine impliquée au niveau de l'inflammation systémique et joue un rôle important lors de la réponse T CD8 à une infection aiguë. Il s'agit d'une molécule pyrogénique qui a donc la capacité d'induire de la fièvre, l'apoptose cellulaire, ainsi que de l'inflammation.

IFN- γ

L'interféron- γ est une cytokine membre du groupe d'interféron de type II. Il s'agit d'une molécule importante qui joue différents rôles au sein du système immunitaire. Entre autres, elle permet l'activation des macrophages et induit l'expression des molécules de CMH de classe I à la surface cellulaire. Il s'agit également d'une molécule qui a la capacité d'inhiber un virus en affectant directement sa réplication suite à l'infection par exemple.

1.2 Cascade de signalisation intracellulaire

La présence des trois signaux, à une certaine intensité et d'une durée adéquate, permet d'induire une cascade de réactions à l'intérieur de la cellule, qui lui permet de réagir à son environnement. La cascade de réactions, qui est régulée au niveau de plusieurs étapes de manière positive ou négative, permet l'activation de différents facteurs de transcription qui régulent, à leur tour, différents processus cellulaires (Figure D).

1.2.1 Régulation positive

La stimulation du récepteur des lymphocytes T va induire une cascade de phosphorylation et d'activation permettant la signalisation intracellulaire dont le but est de favoriser l'expression de différentes molécules cibles. La première étape, suite à l'interaction du TCR avec un complexe CMH-peptide spécifique, est la phosphorylation des motifs ITAMs (immunoreceptor-based tyrosine activation motif). Ces motifs sont situés au niveau des régions cytoplasmiques des chaînes ζ et des molécules CD3 associées au TCR et vont être phosphorylés par les protéines tyrosine kinase (PTK) Fyn et Lck, membres de la famille Src. Cette phosphorylation va permettre de recruter une autre PTK, membre de la famille Syk, nommée ZAP-70, qui va se lier aux ITAMs phosphorylés. ZAP-70 va ainsi être phosphorylée à son tour par LCK et va pouvoir ensuite phosphoryler ses cibles, les protéines adaptatrices LAT et SLP-76. La phosphorylation de ces protéines va permettre le recrutement de différentes protéines dont GADS, PLC γ 1, ainsi que le complexe GRB2/SOS. D'abord les protéines GADS et SLP-76 vont induire une cascade qui agit au niveau du réarrangement du cytosquelette. D'un

autre côté, la phospholipase Cy1 (PLC γ 1) activée va hydrolyser les phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), présents dans la membrane cellulaire, en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycerol (DAG). Les molécules IP₃ vont favoriser l'activation de la voie du calcium (Ca^{2+}) en permettant l'ouverture des canaux calciques au niveau de la membrane plasmique. L'influx de calcium extracellulaire va activer la calcineurine, une phosphatase, qui va mener à la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT. Le DAG va activer, via RasGRP, la voie Ras et par conséquent la voie MAP kinase, et va également activer la voie PKC-θ (Brownlie *et al.*, 2013). Cette cascade d'activation intracellulaire a pour objectif d'activer des facteurs de transcription qui vont induire la production d'IL-2, le déclenchement du cycle cellulaire et le développement des fonctions effectrices des lymphocytes T.

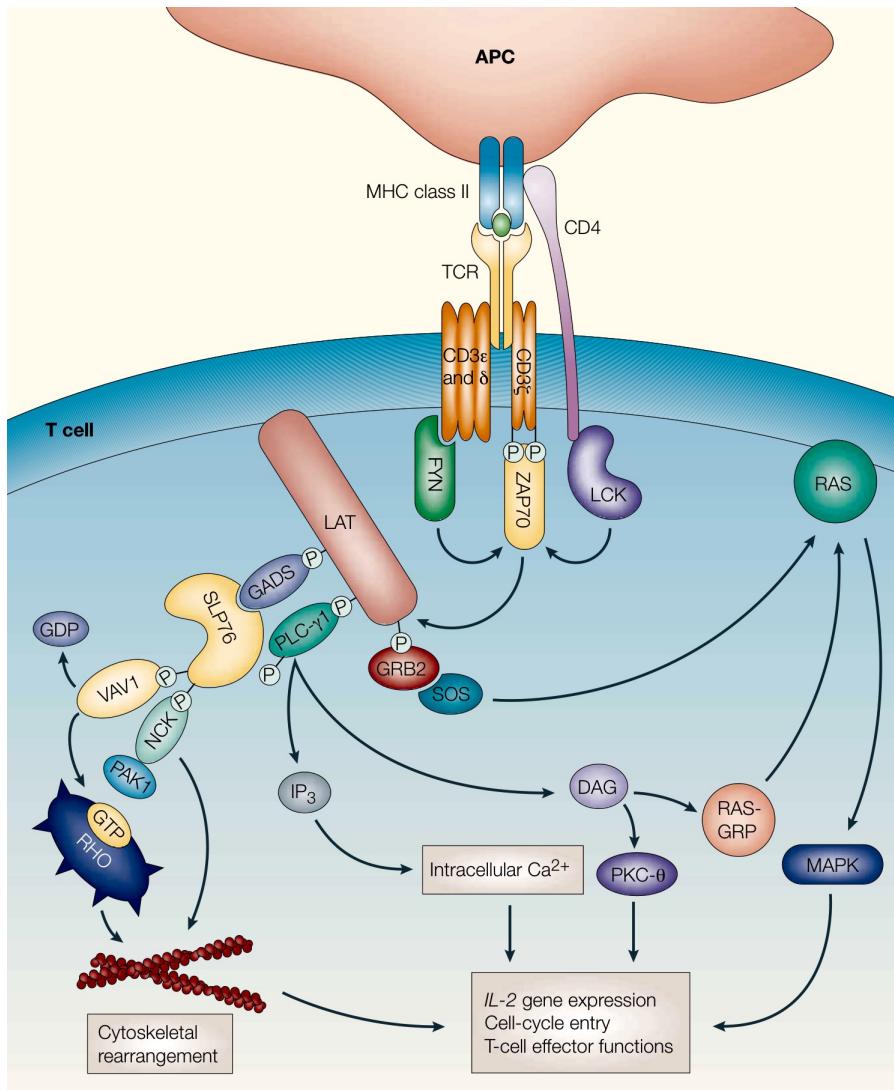


Figure D: Vue d'ensemble de la signalisation du TCR

La signalisation TCR induit une cascade de réactions impliquant plusieurs kinases (telles que ZAP-70, Fyn et Lck) qui permettent l'activation de certaines voies de signalisation (telles que Ras, MAP kinase et PKC- θ) qui induisent la production d'IL-2, le déclenchement du cycle cellulaire et le développement des fonctions effectrices des lymphocytes T.

(Weiss *et al.*, 2004)

1.2.2 Régulation négative

Les lymphocytes T utilisent plusieurs mécanismes de régulation permettant de contrôler l'intensité et la durée de la signalisation induite par la voie du TCR. Ces mécanismes forment une boucle de rétro-inhibition qui empêche l'hyper-activation des cellules T. Plusieurs types de molécules sont impliquées, dont des molécules adaptatrices et des phosphatases. D'abord, d'importants acteurs, tels que les tyrosines kinase Lck et Fyn, doivent être phosphorylées afin d'être activées et ainsi poursuivre la cascade de phosphorylation. Par contre, il existe des phosphatases, tel que LAR, qui ont la capacité de déphosphoryler ces protéines et ainsi arrêter le signal (Stanford *et al.*, 2012). De plus, les protéines ubiquitinases, tel que Cbl, et le protéasome jouent un rôle important en dégradant, plus ou moins rapidement, des molécules essentielles à la signalisation, tel que le récepteur TCR (Koretzky *et al.*, 2001). Finalement, certaines molécules adaptatrices, telle que Dok-1 et Dok-2, ont la capacité de recruter des inhibiteurs de molécules impliquées dans la voie de signalisation intracellulaire, tel que RasGAP, qui a la capacité d'inhiber Ras, une GTPase impliquée dans la cascade de phosphorylation. Le projet de recherche de ce mémoire étudie spécifiquement cette famille de molécules adaptatrices essentielles au cours de la signalisation du TCR, les protéines Dok.

2. FAMILLE DES PROTÉINES DOK

Les protéines Dok (Downstream of tyrosine kinase) sont des molécules dites adaptatrices. Ce sont des protéines qui ne possèdent aucune activité enzymatique, mais qui ont la capacité de recruter certains partenaires de liaison à l'aide d'interaction protéines-protéines (Flynn, 2001). Ces liaisons permettent de former des complexes de signalisation qui vont se situer dans un environnement subcellulaire spécifique tel que la membrane. Le rôle des protéines adaptatrices est de réguler la signalisation cellulaire grâce à leur capacité de recruter certaines molécules effectrices à un lieu spécifique, et/ou stabiliser une liaison entre d'autres protéines, et/ou réguler l'activité d'une enzyme (Flynn, 2001; Mashima *et al.*, 2009).

La famille des protéines Dok contient à ce jour sept membres connus (Dok-1 à Dok-7), qui partagent certains domaines structuraux fonctionnels. Ces différentes structures vont

permettre de créer des liaisons protéines-protéines ou protéines-lipides. Ces interactions sont essentielles à leur fonction lors de la signalisation cellulaire.

2.1 Domaines et structure

Chaque protéine de la famille Dok possède un domaine PH (pleckstrin homology) et un domaine PTB (phosphotyrosine binding) à la portion NH₂ terminale, ainsi que des motifs ciblés par les domaines SH2 à la portion terminale COOH de la molécule (Figure E) (Yamanashi *et al.*, 2009). De plus, les protéines Dok-1 et Dok-2, celles étudiées dans le cas présent, possèdent également des régions riches en proline pouvant être la cible de domaines SH3.

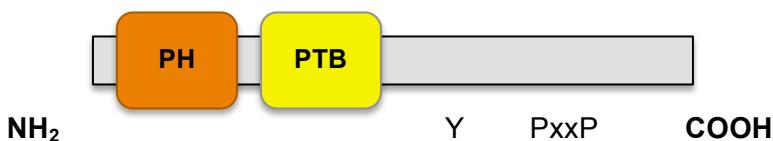


Figure E: Représentation schématique des domaines structuraux partagés par les membres de la famille des protéines Dok

PH : pleckstrin homology; PTB : Phosphotyrosine binding;

Y : tyrosine (cible de phosphorylation); PxxP : région riche en prolines (cible des domaines SH3)

2.1.1 Pleckstrin homology (PH)

Le domaine PH est une structure qui permet de créer des liens de type protéine-lipide. La liaison des protéines adaptatrices à certains phospholipides leur permet de se localiser au niveau de la membrane cellulaire (Lemmon *et al.*, 2000). Les protéines Dok ont la capacité de se lier à certains phosphoinositides phosphorylés, tel que le phosphoinositol biphosphate (PIP2) ou le phosphoinositol triphosphate (PIP3), qui sont générés lors d'une activation cellulaire (Zhao *et al.*, 2001; Mashima *et al.*, 2009). Le domaine PH permet ainsi, dans certaines circonstances, aux protéines Dok et par conséquent à ses molécules cibles de liaison, d'être recrutées à proximité de molécules cibles situées au niveau de la membrane cellulaire.

2.1.2 Phosphotyrosine binding (PTB)

Le domaine PTB est une structure qui permet de créer des liaisons de type protéine-protéine. Il a d'abord été reconnu pour s'associer à un motif de tyrosine phosphorylée contenant la séquence consensus NPXpY (Forman-Kay *et al.*, 1999). Par contre, la séquence consensus de liaison au domaine PTB peut varier selon les différentes protéines. La protéine Dok-1 par exemple, peut autant se lier aux séquences consensus NPXpY et NXlpY (Songyang *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2007). La spécificité de la reconnaissance dépend davantage de la structure du motif que de sa séquence linéaire (Zhou *et al.*, 1995). Le domaine PTB permet ainsi aux protéines Dok de former des complexes multi-protéiques avec certaines molécules cibles de liaison. Parmi les protéines qui ont été démontrées comme capables de se lier aux molécules adaptatrices Dok-1 et Dok-2 via le domaine PTB, on retrouve Dok-1, Dok-2, le récepteur EGF, SHIP-1, TCR ζ , ainsi que CD3 ϵ (Boulay *et al.*, 2005; Mashima *et al.*, 2009). D'un autre côté, Abl, la chaîne intégrine β et Ret peuvent se lier à Dok-1. Tandis que la chaîne α du récepteur à l'IL-4 et Tie2 ont la capacité de lier Dok-2 via son domaine PTB.

2.1.3 Motif ciblé par les domaines SH2

Les motifs ciblés par les domaines SH2 contiennent une tyrosine phosphorylée suivie par trois à cinq résidus à l'extrémité COOH-terminale (ex: YXXP). L'interaction entre un domaine SH2 et son motif permet de créer des liaisons protéine-protéine. Les motifs des protéines Dok peuvent interagir avec les domaines SH2 de différentes protéines suite à leur phosphorylation. La liaison la plus étudiée à ce jour est celle impliquant la protéine p120 RasGAP (Carpino *et al.*, 1997; Yamanashi *et al.*, 1997; Noguchi *et al.*, 1999; Schaeffer *et al.*, 1999; Songyang *et al.*, 2001; Gugasyan *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Miyazaki *et al.*, 2011). De plus, les molécules Dok-1 et Dok-2 peuvent aussi interagir avec les protéines Abl, Cas, Crk, CrkL, Csk, Lyn, Nck, ainsi que SHIP-1 (Mashima *et al.*, 2009). Tandis que Frg, Hck, PI3K p85, PLCyl, SH2DIA, Src, Tec, Vav et Yes ont la capacité de lier seulement Dok-1 (Kadri *et al.*, 2008, Mashima *et al.*, 2009). Ainsi, les motifs de liaison aux domaines SH2 sont essentiels au rôle des protéines adaptatrices puisqu'ils leur permettent de recruter des protéines effectrices telles que des kinases, phosphatases ou guanosine triphosphatasées (GTPases) qui peuvent jouer un rôle

direct dans la signalisation intracellulaire suite à l'activation de récepteurs cellulaires (Pawson et al., 1997).

2.1.3 Motif ciblé par les domaines SH3

Les motifs ciblés par les domaines SH3 sont des séquences riches en prolines, dont la séquence consensus est PXXP (Feng et al., 1994).

Les protéines Dok-1 et -2, dans le cas présent, ont la capacité de former des complexes de liaison avec une variété de protéines leur permettant de jouer un rôle essentiel au sein de la signalisation intracellulaire des cellules. Malgré tout, encore peu d'informations sont connues sur l'implication et les mécanismes d'action de ces molécules adaptatrices.

2.2 Expression

Les 7 membres connus des protéines Dok (Dok-1 à Dok-7) peuvent être classés en trois sous-groupes selon leur structure primaire et leur expression tissulaire (Figure F).

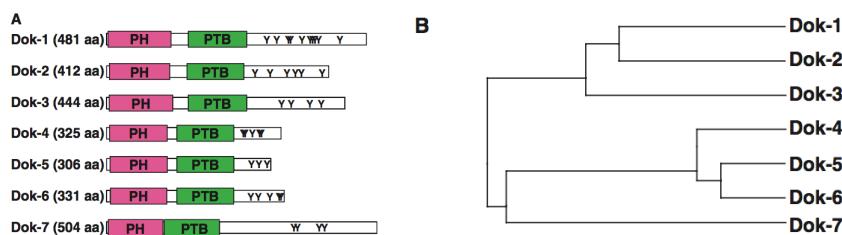


Figure F: La famille des protéines Dok. (A) Représentation schématique des protéines Dok de souris. Y correspond à un résidu tyrosine à la région COOH-terminale. (B) Un arbre phylogénétique des protéines Dok de souris (Mashima, Hishida et al. 2009)

Le premier sous-groupe rassemble les membres Dok-1, Dok-2 et Dok-3. Ces protéines sont essentiellement exprimées dans les cellules hématopoïétiques. Effectivement, Dok-1 est fortement exprimée au niveau des cellules B, T et myéloïdes, qui comprennent entre autres les

macrophages et les neutrophiles. Tandis que Dok-2 est exprimée à des niveaux importants dans les cellules T et myéloïdes, mais n'est que faiblement ou pas exprimée au niveau des cellules B. De son côté, Dok-3 est exprimée à des niveaux considérables dans les cellules B et myéloïdes, mais elle est très peu ou pas exprimée dans les cellules T (Mashima *et al.*, 2009). Les protéines présentes au niveau des cellules T sont donc Dok-1 et Dok-2.

Tableau A: Expression de Dok-1/2/3 dans les cellules hématopoïétiques

Dok	Cellules B	Cellules T	Cellules myéloïdes
Dok-1	+	+	+
Dok-2	-	+	+
Dok-3	+	-	+

+, forte expression; -, faible ou aucune d'expression

Adapté de Mashima, Hishida *et al.* 2009.

Le deuxième sous-groupe comprend Dok-4, Dok-5 et Dok-6. Ces protéines sont exprimées surtout au niveau de cellules non-hématopoïétiques. Dok-5 et Dok-6 sont essentiellement exprimées dans les cellules neuronales, tandis que Dok-4 est également exprimée au niveau du cœur, des muscles squelettiques, des poumons et des reins (Mashima *et al.*, 2009).

Dok-7 est le seul membre actuel du troisième sous-groupe. La protéine est détectable au niveau du cœur et des muscles squelettiques, plus particulièrement dans les régions post-synaptiques des jonctions neuromusculaires (Mashima *et al.*, 2009).

2.3 Rôle des protéines Dok-1 et Dok-2 dans les cellules T

Les protéines Dok-1 et Dok-2 sont impliquées au niveau de la signalisation de plusieurs récepteurs cellulaires, dont le récepteur des cellules T (TCR), la molécule de co-stimulation CD28, SLAM (signalling lymphocyte activation molecule) et CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) (Latour *et al.*, 2001; Gerard *et al.*, 2004; Okabe *et al.*, 2005).

Il a clairement été démontré que Dok-1 et Dok-2 sont des régulateurs négatifs de la signalisation du TCR. En effet, en absence de ces protéines adaptatrices, chez des souris Dok-1^{-/-}Dok-2^{-/-}, on observe une augmentation de la réponse IgG face aux antigènes thymus dépendants (Yasuda *et al.*, 2007). De plus, lorsque les cellules T CD4⁺ de ces souris sont stimulées à l'aide d'anti-CD3ε dans un système *in vitro*, on observe une augmentation de la prolifération et de la production d'IL-2 comparativement aux cellules primaires provenant de souris sauvages (Yasuda *et al.*, 2007). Par contre, les effets ne sont pas observables chez les souris simple KO, ce qui suggère que les protéines Dok-1 et Dok-2 partagent un certain niveau de redondance dans leur fonction (Mashima *et al.*, 2009). Ainsi, Dok-1 a la capacité de compenser une partie du rôle de Dok-2 en son absence et vice versa.

Dok-1 et Dok-2 sont également impliquées dans la signalisation via les co-récepteurs CD28 et SLAM. Effectivement, des expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires et des cellules T primaires ont montré leur capacité à être phosphorylées suite à la signalisation, et par conséquent à recruter des molécules inhibitrices telle que RasGAP (Latour *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2001; Latour *et al.*, 2003). En sus, Dok-1 et Dok-2 peuvent aussi être phosphorylées suite à la stimulation du récepteur CD2, ce qui mène à l'inhibition de l'activation d'ERK1/2 et NFAT (Nemorin *et al.*, 2000; Boulay *et al.*, 2005).

En plus, il a été montré, dans les cellules T Jurkat, que la liaison de CXCR4 avec son ligand SDF-1α (stromal cell-derived factor-1) induit la phosphorylation de tyrosine de Dok-1 par Lck et permet ainsi de recruter RasGAP (Okabe *et al.*, 2005).

Mécanisme d'action des protéines Dok

Le mécanisme d'action des protéines Dok au niveau de leur fonction de régulateur négatif dans la signalisation du TCR a été partiellement élucidé grâce à certaines études. Effectivement, il a été démontré que Dok-1 et Dok-2 agissent sur la signalisation du TCR au cours de deux étapes de la cascade de réactions (Figure G).

En premier lieu, le domaine PTB des protéines Dok-1 et Dok-2 a la capacité de lier les motifs ITAMs phosphorylés du complexe du TCR (Yasuda *et al.*, 2007). Ainsi, lorsque les protéines Dok se lient à ces structures, cela bloque l'accès à la PTK ZAP-70. Dok-1 et Dok-2 peuvent donc inhiber la signalisation du TCR en compétitionnant avec l'activation de ZAP-70 qui est une molécule clé de la cascade de réaction intracellulaire.

Le deuxième mode d'action des protéines Dok est sa capacité de recruter RasGAP, une molécule inhibitrice de la voie Ras qui mène normalement à l'activation de ERK1/2 (Yasuda *et al.*, 2007). Effectivement, lorsque Dok-1/2 est activée et phosphorylée, il va recruter la molécule RasGAP, via son domaine SH2, et l'amener à la membrane à proximité de Ras, où il pourra réguler négativement l'activation ERK1/2.

De plus, il a été démontré que Dok-1 et Dok-2 sont impliquées dans un complexe formé avec les protéines SHIP-1 et Grb-2. Ce complexe se lie à la protéine LAT et régule négativement la voie Akt et l'activation de ZAP-70 (Dong *et al.*, 2006). Ainsi, Dok-1/2 semblent aussi jouer un rôle crucial dans une boucle de rétro-inhibition du signal TCR qui est dépendante de la protéine LAT.

Par contre, l'ensemble des résultats obtenus sur la fonction des protéines Dok provient d'expérience *in vitro*. Aucune étude *in vivo* n'a encore été faite sur l'implication des protéines Dok lors de la réponse. C'est pourquoi mon projet de recherche se concentre sur l'étude *in vivo* de l'implication des protéines Dok-1 et Dok-2 dans le développement des cellules T CD8⁺ effectrices et mémoires à l'aide d'un modèle murin d'infection par le virus de la vaccine.

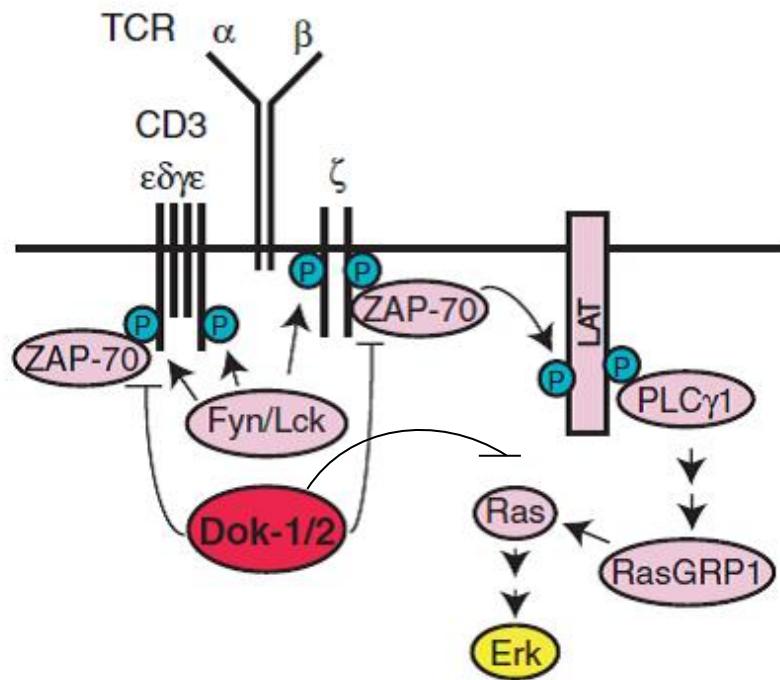


Figure G: Modèle simplifié du rôle des protéines Dok dans la signalisation du TCR

Dok-1/2 joue son rôle de régulateur négatif de la voie TCR en compétitionnant avec ZAP-70 au niveau des ITAMs et en recrutant l'inhibiteur RasGAP à proximité de Ras. De plus il inhibe Akt et l'activation de ZAP-70 via sa liaison avec SHIP-1 et LAT (absent sur l'image).

(Adaptation de Mashima, Hishida et al., 2009)

3. MODÈLE D'INFECTION VIRAL EXPÉRIMENTAL

La bonne compréhension du système immunitaire et de son fonctionnement est essentielle au développement de méthodes et de médicaments facilitant notre combat face à plusieurs maladies. Afin d'étudier une réponse immunitaire spécifique face à différents agents pathogènes, il existe plusieurs modèles qui sont utilisés aujourd'hui dans le milieu de la recherche. On retrouve entre autre des modèles d'infection de rongeurs avec les virus LCMV, VV et VSV, ou encore avec la bactérie *Listeria monocytogenes*. Pour cette étude, nous avons utilisé le modèle d'infection du virus de la vaccine (VV) qui est un virus naturel de la souris, qui est asymptomatique et crée une forte réponse immunitaire lymphocytes T CD8 spécifique.

3.1 Modèle d'infection par le virus de la vaccine

Le virus de la vaccine (VV) est un grand virus enveloppé à ADN double brin faisant partie de la famille des *Poxviridae* et du genre *Orthopoxvirus*. L'ensemble de son cycle de vie se produit dans le cytoplasme des cellules hôtes infectées (Shen *et al.*, 2005). Il possède un génome de 192-Kb qui encode environ 200 gènes et contient des ITRs (inverted terminal repeats). Suite à une infection, VV va produire trois formes de particules virales infectieuses, c'est-à-dire des virus intracellulaires matures, des virus enveloppés associés à la cellule et des virus extracellulaires enveloppés (Shen *et al.*, 2005). Ces différentes formes permettent ainsi au virus d'avoir différents sites de liaison à la surface des cellules et d'utiliser différents mécanismes pour entrer dans les cellules lors de l'infection. Le virus a la capacité d'infecter un grand nombre de cellules incluant les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, lymphocytes B), ainsi que les cellules T activées (Chahroudi *et al.*, 2005), mais il possède un fort tropisme pour les tissus ovariens (Zhao *et al.*, 2011). Lors d'une infection virale, la réponse immunitaire induite implique plusieurs types cellulaires. Suite à la réponse du système immunitaire inné, l'activation des cellules du système adaptatif est cruciale pour l'élimination complète du virus. VV va induire une réponse humorale et une réponse cellulaire (Xu *et al.*, 2004), mais l'action des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) semble critique à l'obtention d'une réponse antivirale efficace (Shen *et al.*, 2005).

3.2 Étapes d'une réponse cellulaire à une infection virale aiguë

La réponse T CD8 spécifique lors d'une infection virale aiguë peut être divisée en plusieurs étapes. D'abord il y a la période d'activation et d'expansion, suivi par une étape de contraction et finalement un maintien de la mémoire immunologique. À chaque étape, l'expression de plusieurs marqueurs d'activation et de facteurs de transcription varie, ainsi que la capacité cytotoxique des CD8. Les rôles principaux d'une réponse T sont d'abord de générer une grande quantité de cellules T effectrices dans le but d'éliminer le pathogène, puis de générer une population de cellules T mémoires qui pourra répondre plus efficacement et plus rapidement dans le cas d'une réinfection par le même pathogène.

3.2.1 Lymphocytes T CD8 naïf

Les cellules T dérivent initialement de cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la moelle osseuse. Les CSH ont la capacité de se différencier en cellules progénitrices lymphoïdes, puis de migrer au niveau du thymus où elles subiront différentes étapes de développement et de sélection. Les cellules, qui peuvent être activées, avec une force de signal raisonnable par un peptide présenté par le CMH du soi, mais pas un auto-antigène, vont survivre et deviennent des lymphocytes T CD8 naïfs. Ces cellules vont quitter le thymus et se rendre dans les ganglions lymphatiques, où ils attendront de rencontrer leur antigène spécifique pour être activé.

L'organisme contient un large éventail de cellules T CD8 naïves qui ont la capacité de reconnaître chacune un peptide spécifique présenté par un CMH de classe I. Les lymphocytes T naïfs peuvent être identifiés selon la présence et/ou l'absence de certains marqueurs à leur surface cellulaire. D'abord, on retrouve un fort niveau d'expression des molécules CD62L et CD127, qui correspondent respectivement à la L-sélectine et à la chaîne- α du récepteur à l'IL-7. L'expression de L-sélectine à la surface des cellules naïves permet sa localisation au niveau des ganglions lymphatiques et la signalisation via l'IL-7 permet de recevoir des signaux de survie. La molécule CD44, qui est un marqueur d'activation des cellules T, n'est pas exprimé dans les cellules naïves.

3.2.2 Activation et expansion

Lors d'une infection virale, la première étape d'activation des lymphocytes T CD8 est l'activation et d'expansion (Figure H). Il s'agit du moment où les cellules naïves rencontrent l'antigène, suivi par la différenciation des cellules et une importante période de prolifération (Williams *et al.*, 2007).

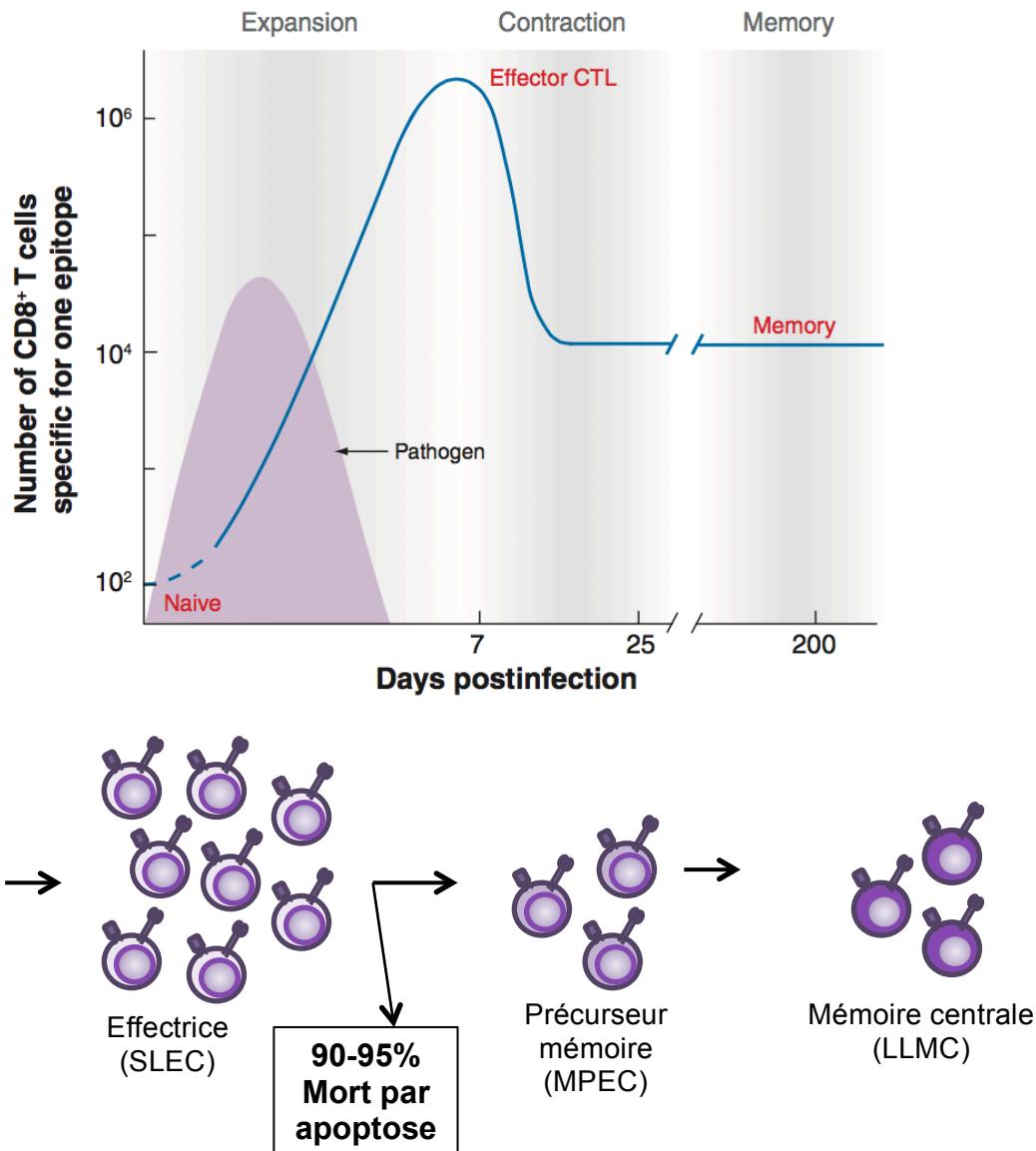


Figure H: Représentation schématique de la cinétique d'une réponse T CD8 spécifique lors d'une infection virale aiguë.

Suite à la rencontre de l'antigène, les cellules T naïves entrent en phase d'expansion, ce qui mène à la production d'une grande quantité de cellules effectrices. Suite à l'élimination du pathogène, seulement 5-10% des cellules vont survivre suite à la phase de contraction et vont devenir précurseur mémoire, pour ensuite devenir des cellules de mémoire centrale.

(Adapté de Williams and Bevan, 2007)

Activation de mTOR

L'enzyme mTOR est une cible de la rapamycine qui fait partie de la famille des sérine/thréonine kinases. Elle est impliquée dans plusieurs processus cellulaires importants tels que la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que la biosynthèse des protéines et la régulation de la transcription (Xiaojin *et al.*, 2013). Il existe deux complexes de signalisation impliquant des sous-unités de mTOR connues, mTORC1 et mTORC2 (Laplante *et al.*, 2009). La voie de signalisation mTORC1 est associée davantage à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la croissance cellulaire. Elle est régulée positivement, entre autres, par la molécule Akt qui a la capacité d'inhiber certains de ses répresseurs, tels que le TSC (Tuberous Sclerosis complex) et PRAS40 (Laplante *et al.*, 2012). Lorsque mTORC1 est activé, il a la capacité de phosphoryler les protéines S6K (p70-S6 kinase), ainsi que le facteur d'initiation eucaryote 4E-BP, qui une fois activés vont promouvoir le processus de traduction des protéines (Mamane *et al.*, 2006). Il a été démontré que mTOR jouerait un rôle dans la différenciation des lymphocytes T CD8 (Araki *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2009). Effectivement, mTORC1 semble favoriser la différenciation des cellules effectrices aux cellules mémoires (Pollizzi *et al.*, 2009). D'un autre côté, mTORC2 est impliqué dans le processus de survie cellulaire et au niveau de la réorganisation du cytosquelette (Zinzalla *et al.*, 2011).

Différenciation et prolifération

Dans un contexte d'infection virale, suite à l'entrée du virus et la présentation de ses antigènes par des molécules de CMH I sur les cellules dendritiques, les cellules T CD8 naïves vont être activées. Au cours de cette activation, les lymphocytes T vont induire leur expansion clonale, ainsi que leur différenciation en cellules effectrices. Les cellules effectrices T CD8 générées, aussi appelées SLEC (short lived effector cell), sont caractérisées par une forte capacité de prolifération, l'expression de plusieurs marqueurs cellulaires, l'activation de plusieurs facteurs de transcription, ainsi qu'une capacité de sécréter des molécules cytotoxiques. L'objectif de la portion de cette réponse est donc de générer une grande quantité de cellules effectrices dans le but d'éliminer le pathogène.

L'activation des cellules T CD8 naïves induit l'expression de gènes stimulant la division cellulaire. Ainsi, les lymphocytes T ayant reçu une stimulation antigénique adéquate vont

d'abord augmenter leur taille, puis vont rapidement se multiplier. Certaines expériences ont d'abord montré que la durée du signal est cruciale lors de l'entrée de la cellule en phase d'expansion. Effectivement, suite à la préparation des cellules pour l'expansion clonale durant les premières 24 heures environ, les lymphocytes T CD8 acquièrent la capacité de se diviser à toutes les 6 à 8 heures (Kaech *et al.*, 2002). De plus, dans un modèle d'infection par LCMV, les cellules T CD8 ont la capacité de se diviser de 15 à 20 fois au cours de la phase aiguë (Homann *et al.*, 2001; Murali-Krishna *et al.*, 2001).

Afin d'étudier et suivre la prolifération cellulaire, l'une des méthodes les plus utilisées à ce jour est l'incorporation de la molécule CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) aux cellules. Il s'agit d'un marqueur fluorescent qui diminue en intensité, suite à chaque division cellulaire, dans les cellules filles (Parish *et al.*, 2009). Une autre technique pour comparer le niveau de prolifération cellulaire est l'utilisation du marqueur Ki-67. Il s'agit d'une protéine exprimée par les cellules en division cellulaire.

Les lymphocytes T CD8 effecteurs, ou SLEC, possèdent plusieurs caractéristiques phénotypiques qui permettent de les identifier suite à leur différenciation et au cours de leur expansion. Effectivement, les principaux marqueurs cellulaires qui permettent de caractériser cette population sont CD62L, CD127, KLRG-1, CD44 et PD-1.

Tout d'abord, on observe une diminution de l'expression de la L-sélectine (CD62L), ce qui permet aux cellules de circuler dans le sang, et une diminution de l'expression du récepteur à l'interleukine-7 (CD127) à la surface cellulaire, ce qui diminue la durée de vie des SLEC.

Les cellules T effectrices expriment un niveau important des molécules CD44 et KLRG-1. CD44 est une glycoprotéine de surface impliquée dans les interactions cellulaires et induite à la surface des lymphocytes T suite à la stimulation du TCR. Tandis que KLRG-1 (killer cell lectin like receptor G-1) est une protéine qui médie les fonctions effectrices des cellules T activées. Puis PD-1 (programmed cell death 1) est un co-récepteur qui inhibe la signalisation TCR lorsqu'il est exprimé à la surface des lymphocytes T activés.

Lors de la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices, d'importants changements se produisent dans la cellule tel que la modulation de l'expression de plusieurs

facteurs de transcription. Certains des principaux facteurs de transcription impliqués au cours de la réponse T sont Eomes (Eomesodermin), T-bet, Blimp-1, Id2 et Id3 (Omilusik *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014). Ces facteurs peuvent jouer des rôles complémentaires ou opposés et généralement c'est la balance de l'expression et l'activité de deux facteurs cibles qui dirige la différenciation cellulaire (Omilusik *et al.*, 2013). Le niveau d'expression des facteurs de transcription T-bet (Intlekofer *et al.*, 2007), Blimp-1 (Kallies *et al.*, 2009; Rutishauser *et al.*, 2009) et Id3 (Yang *et al.*, 2011) est élevé et très important lors de la différenciation des cellules T en SLEC. Tandis qu'Eomes (Banerjee *et al.*, 2010) et Id2 (Masson *et al.*, 2013) sont très peu exprimés au cours de la différenciation en cellules effectrices, mais sont très importants lors du développement des lymphocytes T mémoires.

Il y a aussi un changement du métabolisme important (Fernandez-Ramos *et al.*, 2016). Les cellules passent d'un métabolisme catabolique (phosphorylation oxydative dans la mitochondrie) à un métabolisme anabolique (avec une augmentation de l'entrée du glucose et de l'activité de mTOR et de la glycolyse).

Les SLEC qui circulent dans l'organisme possèdent une fonction effectrice essentielle à l'élimination du virus. En effet, elles vont d'abord avoir la capacité de sécréter des molécules cytotoxiques perforines et granzymes. Puis, elles vont développer leur capacité à sécréter des cytokines antivirales telles que l'interféron- γ (IFN- γ) et le tumor necrosis factor (TNF) (Williams *et al.*, 2007; Parish *et al.*, 2009).

3.2.3 Contraction

Suite à l'atteinte du pic d'expansion et, dans le cas d'une infection aiguë, à l'élimination du virus, c'est le début de la période de contraction. C'est un moment où 90 à 95% des cellules effectrices (SLEC) vont mourir par apoptose. Seulement 5 à 10% des cellules vont posséder les caractéristiques et les signaux nécessaires à leur survie. L'un des signaux très important à cette étape est via l'interleukine-7 et son récepteur IL-7R (Williams *et al.*, 2007). Ces cellules sont appelées MPEC (memory precursor effector cell) et deviendront des cellules mémoires. Elles sont identifiables par une augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-7 (CD127), la perte

de l'expression de KLRG-1 et la présence continue du marqueur d'activation CD44 à la surface cellulaire.

L'apoptose et la mort cellulaire sont des phénomènes cruciaux à cette étape et il est possible de caractériser leur niveau à l'aide de marqueurs tels qu'annexin V et 7AAD (7-Aminoactinomycin D) et l'activation de caspase-3. Ce sont des marqueurs qui permettent d'identifier les cellules apoptotiques ou mortes selon la situation. D'abord, caspase-3 est une protéine qui est activée à la fin d'une cascade de signalisation menant à la mort programmée de la cellule. Une autre méthode est l'utilisation combinée des marqueurs annexin V et 7AAD. Une cellule entrant en apoptose va commencer à exprimer à sa surface des molécules de phosphatidylsérine et l'annexin V a une très forte affinité pour ce phospholipide. De plus, le 7AAD est un composé fluorescent ayant une grande affinité avec l'ADN, il va donc avoir la capacité de marquer les cellules mortes ou apoptotiques qui ont une membrane altérée. L'utilisation de ces deux marqueurs ensemble va permettre de distinguer les cellules vivantes, en apoptose précoce, en apoptose tardive ou en nécrose et les débris cellulaires (Lecoeur *et al.*, 1997).

Il est aussi possible de caractériser la capacité des cellules à survivre selon le niveau d'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques. Parmi celles-ci, on retrouve la protéine Bim, une molécule pro-apoptotique, et la protéine Bcl-2, une molécule anti-apoptotique. La balance entre le niveau d'expression de ces deux molécules permet d'évaluer si les signaux intracellulaires favorisent la survie ou la mort cellulaire.

3.2.4 Maintien de la mémoire

L'un des rôles du système immunitaire adaptatif est de générer une population de cellules mémoires centrales, aussi appelées LLMC (long lived memory cell). Elles expriment plusieurs marqueurs cellulaires importants tels que CD62L, CD127 et CD44. De plus, l'expression des facteurs de transcription Eomesodermin et Id3 sont très importants lors de la différenciation des cellules T mémoires. Le maintien de la mémoire permet aux LLMC de se régénérer au même rythme qu'elles meurent. Ainsi, les lymphocytes T CD8 mémoires générés ont une longue durée de vie et conserve un nombre stable de cellule dans l'organisme. Parmi

les cellules T CD8 mémoires, on distingue plusieurs groupes qui se différencient, entre autres, par le lieu où elles résident dans l'organisme, qui détermine par le fait même leur rôle principal. En effet, il y a les cellules T de la mémoire centrale (T_{CM}) qui se situent principalement au niveau des ganglions lymphatiques et qui ont la capacité de stimuler les cellules dendritiques, pouvant ainsi induire une deuxième stimulation, au besoin, qui a pour résultat de générer la différenciation de cellules T de la mémoire effectrice (T_{EM}) (Sallusto *et al.*, 1999). Les cellules T de la mémoire effectrices, quand à elles, circulent dans le sang et procure une protection à l'organisme en cas de réinfection par un pathogène exprimant l'épitope spécifique au T_{EM} . De plus, il y a les cellules T de la mémoire résident dans les tissus (T_{RM}). Les cellules T_{RM} se situent principalement au niveau des tissus de la barrière épithéliale (tractus gastro-intestinal, respiratoire, génital, ainsi que la peau) et procure une immunité protectrice efficace à proximité de l'interface entre les barrières naturelles de l'organisme et l'environnement extérieur (Park *et al.*, 2015).

Le principe du vaccin est basé sur ce phénomène menant au développement de cellules mémoires, puisque ces cellules ont la capacité de répondre plus rapidement et plus efficacement dans le cas d'une réinfection par le même pathogène. Il est donc important de comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus afin de développer des vaccins permettant le développement d'une réponse cellulaire T CD8 mémoire efficace.

Tableau B: Expression des différents marqueurs à la surface cellulaire et facteurs de transcription jouant un rôle dans la réponse T CD8 spécifique à un virus selon le niveau de différenciation cellulaire

	Cellule naïve (N)	Cellule effectrice (SLEC)	Cellule précurseur mémoire (MPEC)	Cellule mémoire centrale (LLMC)
CD62L	+	-	-	+
CD127	+	-	+	+
KLRG-1	-	+	-	-
CD44	-	+	+	+
PD-1	-	+	+/-	-
Eomes	-	+/-	+	++
T-bet	-	++	+/-	-
Blimp-1	-	++	-	-
Id2	+	++	+	+/-
Id3	+	+/-	+	++

ARTICLE

Participation des auteurs

Constance Laroche-Lefebvre, première auteure de l'article intitulé « **Dok-1 and Dok-2 regulate the formation of memory CD8+ T cells** » a effectué les expériences et les analyses ayant menées aux résultats présentés dans les figures 1A, 2, 3, 4A, 4B, 4D, 4E, 4F, 5, 6B, 7A, 8, Supplemental 1, Supplemental 3 et en partie dans la figure 7B. Elle a générée les figures nommés ci-haut présentées dans l'article.

Jean-François Daudelin, assistant de recherche dans le laboratoire du Dr Nathalie Labrecque, a effectué les expériences ayant menées aux résultats de la figure Supplemental 2.

Mitra Yousefi, graduée au doctorat, a contribué à la génération des souris OTI Dok-1^{-/-} Dok-2^{-/-}, et a effectué des expériences et des analyses ayant menées aux résultats présentés dans les figures 4B, 4C et 7A.

Tania Charpentier, assistante de recherche dans le laboratoire du Dr Simona Stäger, a purifié le virus VV-ova, a effectué les injections lors des transferts adoptifs et les infections par VV-ova.

Esther Tarrab, associé de recherche dans le laboratoire du Dr Alain Lamarre, a générée les tétramères Ova spécifiques et a effectué le titrage dans l'expérience présentée dans la figure 8C.

Les RT-PCR quantitatifs ont été réalisés par la plateforme de génomique fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke dont le Dr Roscoe Klinck à la responsabilité.

Le Dr Pascale Duplay a supervisé le projet, effectué les expériences ayant menées aux figures 1B, 6A et 8B, et a rédigé le manuscrit.

Dok-1 and Dok-2 regulate the formation of memory CD8⁺ T cells

Constance Laroche-Lefebvre^{2,*}, Mitra Yousefi^{2,*}, Jean-François Daudelin[†], Tania Charpentier*, Esther Tarrab*, Roscoe Klinck‡, Alain Lamarre*, Nathalie Labrecque†, Simona Stäger* and Pascale Duplay^{1,*}

*Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC H7V 1B7 Canada

†Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montréal, Montréal, QC H1T 2M4 Canada

‡Laboratoire de génomique fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

¹To whom correspondence should be addressed: Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

Tel : (450) 687 5010; Fax : (450) 686 5301 E-mail: pascale.duplay@iaf.inrs.ca

² C.L.-L. and M.Y. contributed equally to this work

Running title: Doks control CD8⁺ T cell memory

Abstract

Diverse signals received by CD8⁺ T cells are integrated to achieve the required magnitude of cell expansion and the appropriate balance of effector/memory CD8⁺ T cell generation. Notably, the strength and nature of TCR signaling influence the differentiation and functional capacity of effector and memory CD8⁺ T cells. Dok-1 and Dok-2, the two members of Dok family expressed in T cells, negatively regulate TCR signaling *in vitro*. However, the role of Dok proteins in modulating T cell function *in vivo* has not yet been studied. Here, we studied the function of Dok-1 and Dok-2 proteins in the regulation of the CD8⁺ T cell response to vaccinia virus (VV) infection. Comparison of responses to VV-Ova by WT and *Dok-1/2*^{-/-} CD8⁺ OT-I cells showed that the absence of Dok-1 and Dok-2 slightly reduced the magnitude of virus-specific effector CD8⁺ T cell expansion. This was not due to reduced proliferation or enhanced apoptosis of effector CD8⁺ T cells. *Dok-1/2*-deficient effector CD8⁺ T cells showed increased cell surface TCR expression following virus infection *in vivo* and increased expression of granzyme B and TNF upon stimulation with peptide Ag *ex vivo*. Finally, *Dok-1/2*-deficient effector CD8⁺ T had a severe defect in survival that resulted in impaired generation of memory CD8⁺ T cells. These results reveal the critical involvement of Dok-1 and Dok-2 in a negative feedback loop that prevents overactivation of CD8⁺ T cells and promotes memory formation.

Introduction

After encountering antigen, naive CD8⁺ T cells proliferate and differentiate into effector cells, resulting in expansion of antigen-specific T cell populations. Once the antigen is cleared these cells undergo a contraction phase, where most effector CD8⁺ T cells die. The small portion of antigen-specific memory T cells that remain protects the host from re-infection.

The effector versus memory differentiation program integrates signals from TCR, co-stimulatory receptors and inflammatory cytokines (1). The strength and duration of the antigenic signal during T cell activation is one key factor that will specify effector and memory T cell lineages. Using high and low affinity TCR ligands, it has been demonstrated that during infection, a weak TCR signal diminishes the magnitude of expansion and shortens the expansion period, compared to a strong TCR signal (2). Optimum T cell expansion requires persistence of antigen through the T cell expansion phase. Indeed, T cell memory differentiation is hastened, if the level of antigen or the duration of antigen exposure is decreased (3, 4). Very small differences in the functional avidity of the TCR for its ligand lead to significant differences in the number of antigen-specific CD8⁺ T cells. Therefore, even if the strength (2) and duration (3, 4) of infection has no impact on the functional capacity of effector and memory cells, it clearly regulates the rate of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation.

The differentiation fate of CD8⁺ T cells is also affected by the strength and the nature of signaling downstream of the TCR. Diminished TCR signaling favors the development of memory cells at the expense of terminally differentiated effector cells, while increased signaling promotes full effector differentiation (5). However, TCR signaling pathways required for effector and memory CD8⁺ T cell development are different. For example, deficiency in ERK-2 signaling or

in upstream activators of ERK, such as PKC-θ and RasGRP lead to a decrease in cell survival during the contraction phase of the primary response, and as a consequence, to reduced numbers of memory cells (6-8). NF-κB signaling is also important for the generation of memory CD8⁺ T cells, but has little impact on the generation of primary effector CD8⁺ T cells (9). In summary, both the intensity of signal generated downstream of the TCR as well as differences in TCR signaling itself, play a role in the differentiation of CD8⁺ T cells.

Dok adaptor proteins contain a pleckstrin homology domain, a phosphotyrosine binding domain, and a COOH-terminal region containing multiple tyrosine phosphorylation sites (10, 11). Dok-1 and Dok-2, the two members of Dok family proteins expressed in T cells, are involved in signaling downstream of a variety of receptors in hematopoietic cells (reviewed in 12, 13, 14). A role of Dok proteins in the negative regulation of TCR signals has been clearly demonstrated. TCR stimulation induces Dok-1 and Dok-2 phosphorylation in primary T cells (15, 16). More direct evidence that Dok-1 and Dok-2 are implicated as transducers of TCR signals came from studies with primary murine Dok-deficient cells, where deficiency of Dok-1 and Dok-2 expression resulted in increased TCR-mediated cytokine production and proliferation (15). How Dok proteins negatively regulate TCR signaling is not fully understood. In Dok-1 and Dok-2 deficient T cells, phosphorylation of ZAP-70, LAT, SLP-76, AKT and ERK1/2 is increased compared to wild-type cells (15, 16). Competitive binding of the Dok PTB domain to the ITAMs of CD3ζ/ε and complex formation of Dok with RasGAP, Csk and SHIP might be responsible for the inhibition of TCR-mediated activation of the Ras and AKT/PI3-kinase pathway (15, 17). In addition to their role in TCR signaling, Dok proteins may be involved downstream of the co-stimulatory receptors CD28 and CD2, chemokine receptor CXCR4, SLAM and IL-4 receptor (18-21).

Despite the well-recognized role of Dok proteins in the negative regulation of TCR signaling, the function of Dok in regulating T cell function *in vivo* has not yet been studied. By setting the threshold of T cell activation, Dok could be a critical regulator in the initiation phase of the T cell response. By regulating the intensity of antigen receptor signaling, Dok proteins could also influence the duration and efficiency of the T cell responses. In this study, we investigated the role of Dok-1 and Dok-2 in regulating CD8⁺ T cell effector and memory generation following vaccinia virus (VV) infection. CD8⁺ T cells that lack Dok-1 and Dok-2 showed modest defects in effector population expansion but a severe defect in the formation of memory cells. These findings establish a previously unappreciated role of Dok proteins in regulating CD8⁺ T cell responses to viral infection.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 (CD45.2) WT mice were obtained from the Jackson Laboratories. 129/Sv *Dok-1^{-/-}* and *Dok-2^{-/-}* mice (22) were backcrossed to C57BL/6 for at least ten generations to be on a C57BL/6 genetic background. OT-I TCR is specific for the ovalbumin peptide (Ova) ²⁵⁷SIINFEKL²⁶⁴ presented by H-2K^b (23). C57BL/6.SJL (CD45.1) mice were obtained from the Jackson Laboratories. OT-I Rag-1^{-/-} mice were crossed with DKO mice to generate OT-I DKO Rag-1^{-/-}. All experiments were carried out in mice 6- to 10-wk-old mice. All mice were maintained in our pathogen-free animal facilities (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada). Mice were manipulated in strict accordance to protocols 1201-03 and 1201-02, approved by the institutional animal care committee of the INRS-Institut Armand-Frappier. This protocol respects guidelines on good animal practice provided by the Canadian Council on animal care.

VV infection of mice and adoptive transfer of OT-I CD8⁺ T cells

The recombinant vaccinia virus (VV-Ova) encoding SIINFEKL (chicken ovalbumin 257–264) has been described (24). Enriched naive CD8⁺ OT-I cells were injected i.v. to mice 24 h prior to i.v. infection with VV-Ova (10⁶ pfu). Naive CD8⁺ T cells were enriched from splenocytes and lymph nodes of OT-I/Rag1^{+/+} or OT-I-Rag^{-/-} animals using an EasySep™ mouse naive CD8⁺ T cell isolation kit (StemCell Technologies) following the manufacturer's instructions. Enrichment of OT-I CD8⁺ T cells was confirmed by flow cytometry with a yield of 85-95% CD8⁺ Ova (257-264)/H-2K^b tetramer (Ova/tet)⁺ T cells. Based on their expression of CD44 and CD62L, naive CD8⁺ T cells were enriched at >95%. Depending on the experiment, 1 × 10⁴ or 1 × 10⁶ cells were

injected into the lateral tail vein of B6/CD45.1/2 congenic mice. To measure *in vivo* cell proliferation, cells were labeled with CFSE before injection. Briefly, cells were resuspended at 5×10^7 cells/ml in PBS and incubated with 5 μ M CFSE (Molecular Probes, USA) for 10 min at 37°C.

Antibodies

FITC-Bcl-2 (BCL/10C4), PE-anti-CD4 (RM4-5), FITC-anti-CD8 α or Pacific Blue-anti-CD8 α (53-6.7), PE-anti-CD25 (PC61-5), APC-CD27 (LG3A10), Alexa Fluor488-anti-CD45.1 (A20), Alexa-Fluor700-anti-CD45.2 (104), PE-Cy7-CD43 (1B11), PE-anti-CD44 or APC-Cy7-anti-CD44 (IM7), FITC-anti-CD62L (MEL-14), FITC-anti-CD69 (H1.2F3), PE-anti-CD122 (5H4), PE-anti-CD127 (A7R34), PE-Cy7-anti-Eomesodermin (dan11mag), PE-FasL (MFL3), APC-anti-KLRG1 (2F1), APC-anti-PD1 (RMP1-30), Pacific Blue-anti-T-bet (4B10), anti-TCR β (H57-597), and APC-anti-IFN- γ (XMG1.2) were purchased from eBioscience or Biolegend. Anti-Dok-2, Alexa-Fluor488-anti-active Caspase-3, PE-Cy7-anti-Ki67 (SoIA15), Alexa-Fluor647-anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Alexa-Fluor488-anti-phospho S6 Ribosomal Protein (Ser240/244) and anti-total ERK1/2 were purchased from Cell Signaling Technology. PE-anti-granzyme B, PE-anti-IL-2, PE-Cy7-anti-TNF, PE-CF594-anti-phospho-AKT (M89-61) and Alexa-Fluor488-anti-phospho-STAT5 (47) from BD Biosciences. Anti-total S6 Ribosomal Protein (C-8) were from Santa Cruz Biotechnology. Anti-mouse Dok-1 antibodies directed against the C-terminal region of murine Dok-1 were produced in rabbits using a glutathione S-transferase fusion protein encompassing amino acids 252-482 of murine Dok-1 (a gift from Dr. J. Nunes, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France).

Qantitative RT-PCR

Total RNA extractions were performed on pelleted CD8⁺purified T cells with the Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene) as recommended by the manufacturer, except that DNase treatments were done at 37°C. RNA quality and presence of contaminating genomic DNA was verified as previously described (25). RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Reverse transcription and qPCR were performed as described (26). Reactions were performed in triplicate using the following cycling conditions: 10 min at 95°C; 50 cycles: 15 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C. Relative expression levels were calculated using the qBASE framework (27) and the geometric average of three reference genes, UBC, HPRT1 and GAPDH. Primer design and validation was evaluated as described elsewhere (25). Primer sequences are available upon request.

Flow cytometry and cell isolation

Cell suspensions from spleen were prepared as previously described (28). Red blood cells were removed using ACK lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃ and 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2). Lungs were harvested after perfusion with PBS. Lungs were first incubated with 0.1 mg/mL collagenase IV and DNase1 for 30 min at 37 °C. Single cell suspensions were prepared by mechanical dissociation of lung tissue through a cell strainer with a 10 ml syringe piston in the presence of FACS buffer (PBS + 1% FCS + 0.01% NaN₃). Lymphocytes from blood were separated by density gradient centrifugation over Ficoll-plaque plus solution (GE Healthcare). After centrifugation, cells were washed twice with FACS buffer. The H-2K^b-Ova monomers were generated as described (29), and PE-tetramers or APC-tetramers were generated using streptavidin-PE and extravidin-APC (Molecular Probes). For intracellular IFN-γ, TNF, IL-2 or

granzyme B detection, splenocytes were stimulated with 0.1 µM Ova peptide in the presence of GolgiPlug (BD Pharmingen) for 4 h at 37°C. Surface and intracellular antigens were stained sequentially using a fixation and permeabilization kit from BD Biosciences according to the manufacturer's instructions. Detection of apoptosis was determined by staining cells with annexin V-PE plus 7-amino-actinomycin D (7-AAD) according to the manufacturer's instructions (BD PharMingen). For detection of phosphorylated ERK1/2, AKT, S6 and STAT-5, cells were immediately fixed with 2 % PFA for 10 min at RT. Cells were washed with FACS buffer and resuspended in 90 %. methanol and incubated for at least one hour on ice or for up to a month at -20°C. Cells were washed twice in FACS buffer and stained with phospho-antibodies in FACS buffer.

BrdU incorporation

Mice were injected i.p. with 1 mg BrdU (in PBS). After 12 h, cells were stained for cell surface markers, followed by fixation, permeabilization, and intracellular staining for BrdU following the manufacturer's instructions (BD Biosciences).

Cell stimulation *in vitro*

Purified naive CD8⁺ T cells (10^6 cells/ml) in RPMI 1640 complete medium (RPMI 1640 supplemented with non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen), 50 µM 2-ME, 2 mM L-glutamine and 10% FCS) were left unstimulated or stimulated with plate-bound anti-CD3 mAbs in the presence of soluble anti-CD28 mAbs at 10 µg/ml. mAbs were coated on plastic at 10 µg/ml in PBS at 4°C overnight.

For Ova/tet stimulation, purified naive CD8 T cells were washed in RPMI 1640 and resuspended at 4×10^7 cells/ml in RPMI-1640. Cells were left unlabelled or labeled with Ova/tet for 30 minutes on ice and then washed once with RPMI 1640 10% FBS. Cells were incubated for the time indicated at 37°C in presence of anti-CD28 mAbs at 10 µg/ml. For stimulation with Ova peptide, purified naive CD8⁺ (CD45.2) T cells were stimulated with 0.1 µM Ova peptide presented by WT SJL splenocytes (CD45.1) at a ratio 1:1. On day 1, cells were washed twice to remove peptide and cells were incubated for two additional days. On the third day of culture, lymphocytes were purified by density centrifugation over a Ficoll-plaque plus solution (GE Healthcare). After 3 days of stimulation with Ova, Ova/tet and anti-CD28 mAbs or anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, cells were washed twice and cultured at 10^6 cells/ml with IL-15 at 20 ng/ml and incubated for two additional days. For short-time stimulation with IL-2, after 48 h of stimulation with Ova, cells were washed and incubated overnight at 37°C. Cells were washed twice and stimulated with 50 U/ml IL-2 (Roche).

Western blotting

Cells were harvested and lysed in 1% NP-40 containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA in the presence of protease and phosphatase inhibitors. Immunoblotting was performed as previously described (17).

ELISA

Purified naive CD8⁺ T cells (2×10^5 /well in 96 well plates) were stimulated with Ova/tet plus anti-CD28 mAbs, anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs or anti-CD28 mAbs alone. Supernatants were

harvested after 24 h and 48 h of culture. IFN- γ and IL-2 production was evaluated using mouse *ELISA* kits (eBioscience).

Virus titration by plaque assay

Organs were harvested from infected mice in DMEM with 2 % FCS and homogenized. Serial dilutions were made and virus titers were determined by plaque assay on confluent Vero cells as described (30).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Prism software (Graphpad). Two groups were compared using a two-tailed unpaired student *t* test. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$. The p values were defined as following: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ and ns, non-significant. Graph results are shown as the mean \pm SEM.

Results

Modulation of Dok-1 and Dok-2 expression after TCR-stimulation

To investigate how Dok-1 and Dok-2 regulate CD8⁺ T cell responses, we examined whether TCR stimulation modulates the expression of Dok-1 and Dok-2. CD8⁺ T cells from OT-I TCR transgenic mice specific for the Ova peptide ²⁵⁷SIINFEKL²⁶⁴ presented by H-2K^b were stimulated for 3 days with Ag/APCs then removed from stimulation and cultured in media containing IL-15. TCR stimulation induced the downmodulation of Dok-1 and Dok-2 mRNAs (\approx 2-fold Fig. 1A). After removal of the TCR stimulus and three days in culture media containing IL-15, levels of Dok-1 and Dok-2 mRNA increased and in the case of Dok-2 mRNA returned to basal levels (Fig. 1A). We next evaluated the levels of expression of Dok-1 and Dok-2 proteins following stimulation of CD8⁺ OT-I cells with Ova (257-264)/H-2K^b tetramer (Ova/tet) and anti-CD28 mAbs. Consistent with the qRT-PCR results, expression of Dok-2 protein was clearly reduced after 24 h of Ag stimulation (Fig. 1B). In resting CD8⁺ T cells, Dok-2 migrated on SDS-PAGE as two major diffuse bands of approximately 56 kDa. After stimulation, only a faint band corresponding to the upper band of Dok-2 was detectable. Ag stimulation did not downmodulate the Dok-1 protein level (Fig. 1B) indicating a greater stability of Dok-1 protein compared to Dok-2 upon TCR stimulation. After further differentiation in the presence of IL-15, Dok-2 is upregulated and migrated as a diffuse doublet as found in naive OT-I cells (Fig. 1B). Ova-activated CD8⁺ T cells differentiated *in vitro* under the influence of IL-15 possess the phenotype and functional features of memory CD8⁺ cells (31). Thus, these results suggest that Dok-2 is downregulated in stimulated cells and re-expressed in memory cells. Since Dok proteins act as

attenuator of TCR signaling, the modulation of Dok-2 expression may serve to control the fate of CD8⁺ T cells in response to *in vivo* infection.

Dok proteins are important for the generation of memory CD8⁺ T cells

We first measured the impact of *Dok-1/2* deficiency on CD8⁺ T cell responses, by comparing the CD8⁺ T cell-specific response following VV-Ova infection in WT and *Dok-1/2*^{-/-} (DKO) mice. We observed a 2-fold reduction in the percentage and number of Ova-specific CD8⁺ T cells in DKO mice compared to WT mice at the peak of the effector response (day 7) and at a later time point (day 14) after infection (Fig. 2). Since Dok-1 and Dok-2 are expressed in many cell lineages of the immune system, *Dok-1/2* deficiency could have pleiotropic effects in modulating anti-viral responses. In addition, by regulating the strength of TCR signal, Dok proteins could also interfere with thymocyte selection. *Dok-1/2* deficiency could therefore affect the repertoire of mature T cells and the number of precursors for a given epitope. To test the intrinsic requirement of Dok in mature CD8⁺ T cell responses following antigenic stimulation, we generated DKO mice expressing the transgenic OT-I TCR. Consistent with a negative role in TCR signaling, we found that DKO CD8⁺ T cells from B6 mice or OT-I mice displayed a slightly higher number of CD44^{high} cells (Supplemental Fig. 1A and data not shown). After purification of CD44^{low} CD8⁺ OT-I cells, WT and DKO OT-I cells presented an identical naive phenotype (Supplemental Fig. 1B). To assess specifically the role of Dok in CD8⁺ T cell responses *in vivo*, we adoptively transferred 1×10^4 purified naive DKO and WT OT-I CD8⁺ T cells into congenic recipient mice and monitored the expansion of the antigen-specific DKO and WT OT-I cell population in wild-type host mice after VV-Ova infection. At day 4, similar numbers of WT and DKO OTI were found in the spleen (Fig. 3). At the peak of the expansion (day 7 p.i.) approximately 2-fold fewer DKO cells were present in the spleen (Fig. 3). The diminished

response of DKO CD8⁺ T cells to VV-Ova infection was more pronounced after the contraction phase. Approximately 7-fold less Ova-specific memory DKO CD8⁺ T cells persisted in the spleen at day 35 (Fig. 3). These differences were not due to altered organ tropism of DKO CD8⁺ T cells since we found the same differences in other lymphoid and non-lymphoid tissues (Supplemental Fig. 1C). Importantly, in absence of infection, both WT and DKO OT-I transferred cells persisted equally well (Supplemental Fig. 1D). Since recipient mice have an intact immune system that can support effector CD8⁺ T cell development of transferred DKO OT-I cells, these data demonstrate that Dok proteins play a T cell intrinsic role in generation of memory CD8⁺ T cells following infection.

Dok-1 and Dok-2 do not regulate apoptosis of effector CD8⁺ T cells after VV infection

To determine whether the reduced cell numbers of DKO OT-I cells at day 7 p.i. was a consequence of decreased cell expansion, CFSE-labeled cells were adoptively transferred and proliferation was assessed at day 2 p.i. WT and DKO OT-I cells started proliferation with similar kinetics in response to *in vivo* VV-Ova infection (Fig. 4 A). The percentage of OT-I cells expressing the proliferation-associated Ag, Ki-67, is slightly superior in DKO OT-I cells at day 4 p.i. (Fig. 4B). By day 7, WT and DKO OT-I cells expressed similar levels of Ki-67 (Fig. 4B). To examine whether the increase of Ki-67⁺ DKO OT-I cells was due to an increase in T cell proliferation, we assessed the proportion of actively cycling cells *in vivo* by giving mice an injection of BrdU 12 h before harvesting the cells. Staining cells for BrdU incorporation at day 4 p.i. showed that the percentage of cycling BrdU⁺ WT and DKO OT-I donor cells was very similar (Fig. 4C). BrdU is incorporated exclusively into S-phase cells. Ki-67 is a nuclear protein that is expressed by proliferating cells during all stages of the cell cycle (G1/S/G2/M) and is

downregulated after cell cycle exit in G1. Therefore, in the absence of Dok1/2, cell cycle exit might be impaired and consequently the percentage of Ki-67⁺ DKO cells increased compared to WT cells. *In vitro*, CD3/CD28 stimulation induced similar proliferation of WT and DKO CD8⁺ T cells (Fig. 4D). Since the proliferation rate of DKO CD8⁺ OT-I cells was not decreased compared to that of WT CD8⁺ OT-I cells, reduced accumulation at peak expansion of DKO CD8⁺ OT-I cells could be the result of increased apoptosis. At day 7 p.i., WT and DKO CD8⁺ OT-I cells underwent apoptosis at a similar frequency as determined by expression of active caspase-3 and annexin V/7-AAD staining (Fig. 4E-F). Consistent with the comparable rate of apoptosis of WT and DKO OT-I cells, Bcl-2 and FasL expression was similar in WT and DKO OT-I cells (Fig. 4E). Thus, the diminished survival of DKO Ova-specific CD8⁺ T cells after VV-Ova infection is not due to enhanced apoptosis or reduced proliferation of effector CD8⁺ T cells, but rather could be due to a defect of differentiation of effector cells into memory cells.

Increased effector capacity of CD8⁺ T cells but similar MPEC/SLEC differentiation in the absence of Dok proteins

In response to acute infection, CD8⁺ T cells undergo rapid expansion and differentiate into distinct populations with divergent potentials for the formation of memory CD8⁺ T cells. SLECs are CD127^{low}KLRG^{high} and represent more terminally differentiated cells with reduced longevity whereas MPECs are CD127^{high}KLRG^{low} and have a preferential capacity to differentiate into long-lived memory CD8⁺ T cells. We observed a significant increase in the percentage of KLRG1^{high} DKO OT-I cells at day 4 after infection with VV-Ova (Fig. 5A). However, this subset skewing was not maintained later during infection with VV-Ova. At day 7 p.i., the percentage of SLECs and MPECs of DKO OT-I cells is comparable to that of WT OT-I cells (Fig. 5A). We

also examined the influence of Dok-1 and Dok-2 on the SLEC/MPEC cell population after infection with another pathogen, *Listeria monocytogenes*. We infected WT mice with *Listeria* expressing Ova (LM-Ova) after adoptive transfer of WT or DKO OT-I cells. At the peak of the response at day 7, the expansion of WT and DKO OT-I cells was comparable (Supplemental Fig. 2A). In agreement with infection with VV-Ova, at day 7 after infection with LM-Ova DKO and WT OT-I cells contained a similar frequency of MPECs and SLECs (Supplemental Fig. 2B). We then analyzed the effector activity of the OT-I transferred cells following VV-Ova. After 4 h *ex vivo* stimulation with Ova peptide, a larger percentage of DKO effector CD8⁺ T cells produced granzyme B (at days 4 and 7 p.i.) and TNF (at day 7 p.i.) compared to WT cells (Fig. 5B-C). The percentage of effector CD8⁺ T cells producing IFN- γ or IL-2 was not affected by *Dok-1/2* deficiency (Fig. 5B-C and data not shown). These results suggest that DKO CD8⁺ T cells have increased effector capacity after infection with VV-Ova. To investigate the underlying mechanisms that account for the altered differentiation of DKO OT-I cells, we analyzed the expression of Eomes and T-bet. The expression of T-bet was slightly reduced in DKO effector CD8⁺ OT-I cells following VV-Ova infection and was comparable in WT and DKO effector CD8⁺ OT-I cells following LM-Ova infection at day 7 p.i. (Fig. 5D and Supplemental Fig. 2C). By contrast, *Dok-1/2* deficiency enhanced the expression of Eomes in OT-I cells at day 7 after infection with VV-Ova and LM-Ova (Fig. 5D and Supplemental Fig. 2C). In agreement with *in vivo* data, stimulation of OT-I cells *in vitro* with Ova peptide induced similar amounts of T-bet in WT and DKO OT-I cells but higher amounts of Eomes in DKO cells (Fig. 5E). Together, these results indicate that *Dok-1/2* deficiency results in the increase generation of Eomes^{high} effector CD8⁺ T cells with enhanced capacity to produce TNF and granzyme B but reduced potential to become memory CD8⁺ T cells.

Comparable IL-2 signaling in WT and DKO CD8⁺ T cells

Dok-1/2 deficiency has been reported to enhance the *in vitro* production of TCR-induced IL-2 production by CD4⁺ cells (15). IL-2 plays a major role in the effector CD8⁺ T cells fate decision (32-35). Since prolonged IL-2 signaling has been shown to promote effector at the expense of memory CD8⁺ T cell development, we studied whether *Dok-1/2* deficiency modulates the IL-2 response of CD8⁺ T cells. *In vitro* TCR stimulation induced more IL-2 and IFN- γ production in DKO than in WT OT-I cells (Fig. 6A). However, the Ag-induced upregulation of CD25 expression and induction of STAT-5 phosphorylation was similar in WT and DKO OT-I cells (Fig. 6B). In addition, the responsiveness of activated CD8⁺ T cells to IL-2 signals, as measured by the induction of phosphorylated-STAT-5 upon IL-2 stimulation, is comparable in WT and DKO OT-I cells (Fig. 6C). More importantly, the kinetics of expression of CD25 during infection with VV-Ova is comparable for WT and DKO OT-I (Fig. 6D). Together, these results indicate that IL-2 signaling in response to VV infection is comparable in WT and DKO CD8⁺ T cells.

Dok proteins do not regulate mTOR, Akt and Erk-mediated signals during VV-Ova infection

The AKT and ERK-1/2 pathways are negatively regulated by Dok-1 and Dok-2 in multiple cell types and represent important regulators of CD8⁺ T cell differentiation upon infection (reviewed in 6, 14, 36). We therefore examined whether Dok proteins influence the activity of these pathways during CD8⁺ T cell responses. At day 4 following VV-Ova infection, the phosphorylation of AKT and ERK1/2 was clearly detectable, but was similar in WT and DKO

OT-I cells (Fig. 7A). Recently, a central role for mTOR in antigen induced memory CD8⁺ T cell generation has been reported (37, 38). In particular, mTORC1 activation has been shown to favor the generation of CD8⁺ T cells with a terminally differentiated effector phenotype (39). To test the potential role of Dok proteins in the regulation of mTOR activity during VV infection, we evaluated the phosphorylation of the mTORC1 downstream target S6K1, ribosomal protein S6. DKO and WT OT-I CD8⁺ T cells showed comparable mTORC1 activity as indicated by comparable phosphorylation of ribosomal protein S6 at day 4 p.i. (Fig. 7A). These results can be recapitulated *in vitro* since TCR/CD28-induced mTOR, AKT and ERK-1/2 activation were comparable in WT and DKO OT-I cells (Fig. 7B).

Dok proteins regulate the cell surface expression of TCR and PD-1 on effector CD8⁺ T cells following VV infection

Like many other cell surface receptors, the TCR is downregulated following ligand triggering. Ligand-induced receptor downregulation represents a way to desensitize receptor signaling and thereby to prevent harmful hyper-stimulation (40). Surprisingly, TCR expression in Ova-specific T cells, as measured by Ova/tet binding or TCR β staining, was higher in DKO than in WT effector CD8⁺ OT-I cells at days 4 and 7 p.i. (Fig. 8A-B). At day 35 p.i. DKO and WT OT-I cells expressed similar levels of TCR at their cell surface (Fig. 8A). In addition, at day 7 p.i., DKO OT-I cells expressed a higher amount of PD-1 than WT OT-I cells (Fig. 8A-B). Importantly, *Dok-1/2* deficiency selectively affected TCR and PD-1 expression, but not that of other cell surface molecules such as CD8 and CD25 (Fig. 8B and Fig. 6D). The altered TCR expression of

DKO OT-I cells following VV-Ova infection was not secondary to differences in infection kinetics and/or prolonged antigenic stimulation since the virus was cleared by day 4 in the liver, spleen and kidney (data not shown) and similar titers were found in the ovaries of mice with adoptively transferred WT and DKO OT-I cells (Fig. 8C). In addition, the increased cell surface expression of TCR, but not that of PD-1, could be recapitulated *in vitro* after stimulation with Ag for 24 h and up to 72 h (Supplemental Fig. 3). *Dok-1/2* deficiency did not affect the cell surface expression of TCR expression in naive CD8⁺ T cells or the initial Ag-induced down-modulation of cell surface expression that occurred after 4 h of stimulation *in vitro* (Supplemental Fig. 3). Thus, Dok proteins negatively regulate the rate of re-expression of the TCR at the cell surface following Ag-induced down-modulation. Together, our results support a direct role for Dok in controlling the expression TCR in CD8⁺ T cells during infection with VV-Ova.

Discussion

In this study we examined the role of Dok-1 and Dok-2 in regulating Ag-specific CD8⁺ T cell responses during an acute viral infection. We reveal an important function of Dok-1 and Dok-2 in promoting the generation of long-lived memory CD8⁺ T cells.

We showed that *Dok-1/2* deficiency did not affect proliferation of CD8⁺ T cells *in vitro*. Previous studies have demonstrated a positive function of Dok proteins in the regulation of T cell proliferation *in vitro* (15, 16). This discrepancy in findings might be related to differences in experimental conditions, including the nature of the T cells (CD4⁺ T cells versus CD8⁺ T cells), or genetic background (mixed C57Bl/6/129 versus C57Bl/6). Under *in vivo* conditions, Dok proteins did not regulate CD8⁺ T cell proliferation as monitored by CSFE dilution and BrdU incorporation following infection with VV-Ova. However, our data demonstrate that Dok expression is necessary for optimal CD8⁺ T cell expansion upon VV-Ova infection. While signal received by DKO cells does not enhance the proliferative rate of DKO cells, it may shorten cell survival by promoting apoptosis. This will result in the generation of a smaller number of effector CD8⁺ T cells. While we cannot exclude this hypothesis, the present study does not support this scenario since apoptosis was comparable in WT and DKO OT-I cells. Early expansion of CD8⁺ T cells during infection was initially correlated with an increased number of KLRG-1⁺ cells. Therefore, the nature of TCR signals received by DKO CD8⁺ T cells may be initially optimal for effector differentiation and detrimental for programming memory longevity. Alternatively, increased expression of KLRG-1 may reflect increased signal rather than a bias toward an effector fate. In agreement with this hypothesis, by day 7 the ratio of SLEC/MPEC in the effector cell population was similar in WT and DKO CD8⁺ T cells. During the expansion phase, a small

number of cells down-modulate their proliferative capacity to escape contraction and enter into the memory differentiation pathway (41). Therefore, Dok may act at a specific step in the transition from effector to memory state where inhibition of the cell cycle is required to return to a quiescent state. The increased percentage of Ki-67⁺ DKO OT-I T cells supports the hypothesis that the absence of Dok protein impairs cell cycle exit. Moreover, recently, Dok proteins have been involved in the regulation of hematopoietic progenitor cell cycle (42). Further studies are clearly needed to determine whether and how Dok-1 and Dok-2 regulate the cell cycle and/or promote the differentiation of memory CD8⁺ T cells.

At peak expansion, the effector DKO CD8⁺ T cells generated after VV-Ova and LM-Ova infection present a clear increase in their expression of Eomes, while T-bet expression is similar or slightly reduced compared to that of WT OT-I cells. At first sight this may seem surprising since Eomes was first described as a factor associated with improved memory differentiation (37). Indeed, compared with effector CD8⁺ T cells at peak expansion, memory CD8⁺ T cells have elevated Eomes expression (43, 44). However, expression of Eomes early after activation does not lead to enhanced memory formation but rather correlates with efficient central memory formation (45). We did not test the persistence of memory CD8⁺ T cells beyond day 35 p.i. However, at day 35 the functional capacity of the cells, as determined by *ex vivo* re-stimulation with Ova peptide, is similar between WT and DKO OT-I CD8⁺ T cells. Eomes and T-bet have cooperative or redundant functions in regulating the genes encoding IFN-γ and cytolytic molecules in CD8⁺ T cells (43, 46). The increased percentage of Eomes^{high} cells correlate with key functional properties of effector CD8⁺ T cells in DKO OT-I cells which displayed enhanced expression of granzyme B and TNF compared to WT OT-I cells upon infection with VV-Ova. Interestingly, the DKO effector CD8⁺ T cells expressed a transient increase in the expression of

inhibitory receptor PD-1 at their cell surface. High expression of Eomes or PD-1 correlates with increased granzyme B production in exhausted CD8⁺ T cells during chronic viral infection, but decreased IFN- γ and TNF secretion (32, 47). This difference in cytokine secretion of Eomes^{high} cells may reflect important dichotomies in the transcriptional target of Eomes in CD8⁺ T cells from acute versus chronic infection. (48). Further studies are required to clearly define the molecular mechanisms by which Dok-deficiency may modulate the complex transcriptional network that controls effector and memory CD8⁺ T cell differentiation.

We found that absence of Dok-1 and Dok-2 did not result in a hyperactivation of individual TCR proximal signaling pathways. Nonetheless, our data support a model in which Dok proteins control the duration of TCR signaling by controlling the extent of steady state TCR down-modulation during an acute viral infection. Dok-1 and Dok-2 do not regulate TCR internalization in resting cells, or the first rapid internalization of ligand-engaged TCR-complexes but rather control the turnover rate of the activated TCR. As proposed for the E3 ubiquitin ligase Cbl-b (49), Dok-mediated regulation of TCR-downregulation likely limits sustained signaling and avoids excessive responses of CD8⁺ T cells in a temporal manner.

In this study we show that Dok expression levels are tightly regulated during CD8⁺ T cell activation. Both Dok-1 and Dok-2 are phosphorylated following TCR/CD28 stimulation (16). Nevertheless, the amount of Dok-2, but not Dok-1 is considerably reduced in TCR/CD28-stimulated cells. The different cellular targeting of Dok-1 and Dok-2 upon TCR stimulation is consistent with our preliminary data indicating that Dok-2 and Dok-1 do not have fully overlapping roles in regulating CD8⁺ T cell response during infection (data not shown). Proteasome-mediated down-modulation of Dok-1 and Dok-3 has been shown to take place in the regulation of several cellular processes such as proliferation, transformation, and responses to

TLR stimuli (50, 51). Additional experiments are underway to determine whether the regulation of Dok-2 protein levels occurs through the ubiquitination machinery and subsequent degradation by the proteasome. Remarkably, the expression of Dok-2 returns to basal levels once antigenic stimulation is over. Thus our data support a model in which TCR-mediated degradation of Dok-2 represents a mechanism to overcome the inhibitory effect of Dok-2, thereby allowing the initiation of T cell activation. Once Ag is cleared, we propose that lack of TCR signal induces the upregulation of Dok-2, and thereby promote cell survival and/or homeostatic proliferation.

In conclusion, we identified Dok-1 and Dok-2 as key regulators of the formation of memory CD8⁺ T cells during an acute infection. Dok-1 and Dok-2 may set the activation threshold of signaling pathways downstream of TCR required to initiate the CD8⁺ T cell responses. In addition, we propose that Dok-1 and Dok-2 act in a negative feedback signaling loop that tightly regulates TCR signaling after initial activation to prevent overstimulation. How Dok-mediated dampening of CD8⁺ T cell responses is linked to TCR responsiveness in effector and memory CD8⁺ T cells remains to be determined.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Jaramillo and Dr J. Van Grevenynghe for Abs and Dr P.P. Pandolfi for the 129Sv *Dok-1*^{-/-} and *Dok-2*^{-/-} mice.

Footnotes:

1. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grants MOP-74445 (PD), MOP-123293 (SS) and MOP-122105 (NL).
2. Abbreviations used: VV-Ova, Vaccinia virus expressing ovabulmin peptide SINFEKL; LM-Ova, *Listeria monocytogenes* expressing ovalbumin; MFI, Mean Fluorescence intensity, Ova/tet, Ova (257-264)/H-2K^b tetramer.

References

1. Kaech, S. M., and E. J. Wherry. 2007. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* 27: 393-405.
2. Zehn, D., S. Y. Lee, and M. J. Bevan. 2009. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458: 211-214.
3. Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos, and M. J. Bevan. 2006. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8⁺ T cell response. *J. Exp. Med.* 203: 2135-2143.
4. Dolfi, D. V., P. A. Duttagupta, A. C. Boesteanu, Y. M. Mueller, C. H. Oliai, A. B. Borowski, and P. D. Katsikis. 2011. Dendritic cells and CD28 costimulation are required to sustain virus-specific CD8⁺ T cell responses during the effector phase in vivo. *J. Immunol.* 186: 4599-4608.
5. Smith-Garvin, J. E., J. C. Burns, M. Gohil, T. Zou, J. S. Kim, J. S. Maltzman, E. J. Wherry, G. A. Koretzky, and M. S. Jordan. 2010. T-cell receptor signals direct the composition and function of the memory CD8⁺ T-cell pool. *Blood* 116: 5548-5559.
6. D'Souza, W. N., C. F. Chang, A. M. Fischer, M. Li, and S. M. Hedrick. 2008. The Erk2 MAPK regulates CD8 T cell proliferation and survival. *J. Immunol.* 181: 7617-7629.
7. Barouch-Bentov, R., E. E. Lemmens, J. Hu, E. M. Janssen, N. M. Droin, J. Song, S. P. Schoenberger, and A. Altman. 2005. Protein kinase C-theta is an early survival factor required for differentiation of effector CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 175: 5126-5134.

8. Priatel, J. J., S. J. Teh, N. A. Dower, J. C. Stone, and H. S. Teh. 2002. RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* 17: 617-627.
9. Teixeiro, E., M. A. Daniels, S. E. Hamilton, A. G. Schrum, R. Bragado, S. C. Jameson, and E. Palmer. 2009. Different T cell receptor signals determine CD8⁺ memory versus effector development. *Science* 323: 502-505.
10. Carpino, N., D. Wisniewski, A. Strife, D. Marshak, R. Kobayashi, B. Stillman, and B. Clarkson. 1997. p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 88: 197-204.
11. Yamanashi, Y., and D. Baltimore. 1997. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell* 88: 205-211.
12. Janssen, E., and W. Zhang. 2003. Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 269-276.
13. Chen, R., F. Relouzat, R. Roncagalli, A. Aoukaty, R. Tan, S. Latour, and A. Veillette. 2004. Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol. Cell. Biol.* 24: 5144-5156.
14. Mashima, R., Y. Hishida, T. Tezuka, and Y. Yamanashi. 2009. The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. *Immunol. Rev.* 232: 273-285.
15. Yasuda, T., K. Bundo, A. Hino, K. Honda, A. Inoue, M. Shirakata, M. Osawa, T. Tamura, H. Nariuchi, H. Oda, T. Yamamoto, and Y. Yamanashi. 2007. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int. Immunol.* 19: 487-495.

16. Dong, S., B. Corre, E. Foulon, E. Dufour, A. Veillette, O. Acuto, and F. Michel. 2006. T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J. Exp. Med.* 203: 2509-2518.
17. Nemorin, J. G., P. Laporte, G. Berube, and P. Duplay. 2001. p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. *J. Immunol.* 166: 4408-4415.
18. Latour, S., R. Roncagalli, R. Chen, M. Bakinowski, X. Shi, P. L. Schwartzberg, D. Davidson, and A. Veillette. 2003. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat. Cell Biol.* 5: 149-154.
19. Okabe, S., S. Fukuda, Y. J. Kim, M. Niki, L. M. Pelus, K. Ohyashiki, P. P. Pandolfi, and H. E. Broxmeyer. 2005. Stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 105: 474-480.
20. Inoue, A., T. Yasuda, T. Yamamoto, and Y. Yamanashi. 2007. Dok-1 is a positive regulator of IL-4 signalling and IgE response. *J Biochem* 142: 257-263.
21. Latour, S., G. Gish, C. D. Helgason, R. K. Humphries, T. Pawson, and A. Veillette. 2001. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat. Immunol.* 2: 681-690.
22. Niki, M., A. Di Cristofano, M. Zhao, H. Honda, H. Hirai, L. Van Aelst, C. Cordon-Cardo, and P. P. Pandolfi. 2004. Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression. *J. Exp. Med.* 200: 1689-1695.

23. Clarke, S. R., M. Barnden, C. Kurts, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath. 2000. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol. Cell Biol.* 78: 110-117.
24. Norbury, C. C., D. Malide, J. S. Gibbs, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2002. Visualizing priming of virus-specific CD8⁺ T cells by infected dendritic cells in vivo. *Nat. Immunol.* 3: 265-271.
25. Brosseau, J. P., J. F. Lucier, E. Lapointe, M. Durand, D. Gendron, J. Gervais-Bird, K. Tremblay, J. P. Perreault, and S. A. Elela. 2010. High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA* 16: 442-449.
26. Besin, G., M. Yousefi, I. Saba, R. Klinck, P. P. Pandolfi, and P. Duplay. 2012. Dok-1 overexpression promotes development of gammadelta natural killer T cells. *Eur. J. Immunol.* 42: 2491-2504.
27. Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, and J. Vandesompele. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
28. Dupuis, M., M. De Jesus Ibarra-Sanchez, M. L. Tremblay, and P. Duplay. 2003. Gr-1⁺ myeloid cells lacking T cell protein tyrosine phosphatase inhibit lymphocyte proliferation by an IFN-gamma- and nitric oxide-dependent mechanism. *J. Immunol.* 171: 726-732.
29. Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274: 94-96.

30. Remakus, S., and L. J. Sigal. 2011. Gamma interferon and perforin control the strength, but not the hierarchy, of immunodominance of an antiviral CD8⁺ T cell response. *J. Virol.* 85: 12578-12584.
31. Manjunath, N., P. Shankar, J. Wan, W. Weninger, M. A. Crowley, K. Hieshima, T. A. Springer, X. Fan, H. Shen, J. Lieberman, and U. H. von Andrian. 2001. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 108: 871-878.
32. Pipkin, M. E., J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan, and A. Rao. 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32: 79-90.
33. D'Souza, W. N., and L. Lefrancois. 2004. Frontline: An in-depth evaluation of the production of IL-2 by antigen-specific CD8 T cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 34: 2977-2985.
34. Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W. N. Haining, K. A. Smith, and R. Ahmed. 2010. Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32: 91-103.
35. Castro, I., M. J. Dee, and T. R. Malek. 2012. Transient enhanced IL-2R signaling early during priming rapidly amplifies development of functional CD8⁺ T effector-memory cells. *J. Immunol.* 189: 4321-4330.
36. Hand, T. W., W. Cui, Y. W. Jung, E. Sefik, N. S. Joshi, A. Chandele, Y. Liu, and S. M. Kaech. 2010. Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 16601-16606.

37. Rao, R. R., Q. Li, K. Odunsi, and P. A. Shrikant. 2010. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8⁺ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32: 67-78.
38. Araki, K., A. P. Turner, V. O. Shaffer, S. Gangappa, S. A. Keller, M. F. Bachmann, C. P. Larsen, and R. Ahmed. 2009. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460: 108-112.
39. Polizzi, K. N., C. H. Patel, I. H. Sun, M. H. Oh, A. T. Waickman, J. Wen, G. M. Delgoffe, and J. D. Powell. 2015. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8(+) T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 125: 2090-2108.
40. Duan, L., A. L. Reddi, A. Ghosh, M. Dimri, and H. Band. 2004. The Cbl family and other ubiquitin ligases: destructive forces in control of antigen receptor signaling. *Immunity* 21: 7-17.
41. Kinjyo, I., J. Qin, S. Y. Tan, C. J. Wellard, P. Mrass, W. Ritchie, A. Doi, L. L. Cavanagh, M. Tomura, A. Sakaue-Sawano, O. Kanagawa, A. Miyawaki, P. D. Hodgkin, and W. Weninger. 2015. Real-time tracking of cell cycle progression during CD8+ effector and memory T-cell differentiation. *Nat Commun* 6: 6301.
42. Coppin, E., M. De Grandis, P. P. Pandolfi, M. L. Arcangeli, M. Aurrand-Lions, and J. A. Nunes. 2016. Dok1 and Dok2 Proteins Regulate Cell Cycle in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *J. Immunol.* 196: 4110-4121.
43. Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A. P. Russ, T. Lindsten, J. S. Orange, A. W. Goldrath, R. Ahmed, and S. L. Reiner. 2005.

- Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6: 1236-1244.
44. Banerjee, A., S. M. Gordon, A. M. Intlekofer, M. A. Paley, E. C. Mooney, T. Lindsten, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2010. Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8⁺ T cells to compete for the memory cell niche. *J. Immunol.* 185: 4988-4992.
45. Paley, M. A., S. M. Gordon, E. K. Bikoff, E. J. Robertson, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2013. Technical Advance: Fluorescent reporter reveals insights into eomesodermin biology in cytotoxic lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 93: 307-315.
46. Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, H. Shen, N. Cereb, S. Y. Yang, T. Lindsten, J. Rossant, C. A. Hunter, and S. L. Reiner. 2003. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302: 1041-1043.
47. Paley, M. A., D. C. Kroy, P. M. Odorizzi, J. B. Johnnidis, D. V. Dolfi, B. E. Barnett, E. K. Bikoff, E. J. Robertson, G. M. Lauer, S. L. Reiner, and E. J. Wherry. 2012. Progenitor and terminal subsets of CD8⁺ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338: 1220-1225.
48. Doering, T. A., A. Crawford, J. M. Angelosanto, M. A. Paley, C. G. Ziegler, and E. J. Wherry. 2012. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* 37: 1130-1144.
49. Shamim, M., S. G. Nanjappa, A. Singh, E. H. Plisch, S. E. LeBlanc, J. Walent, J. Svaren, C. Seroogy, and M. Suresh. 2007. Cbl-b regulates antigen-induced TCR down-regulation

- and IFN-gamma production by effector CD8 T cells without affecting functional avidity.
J. Immunol. 179: 7233-7243.
50. Janas, J. A., and L. Van Aelst. 2011. Oncogenic tyrosine kinases target Dok-1 for ubiquitin-mediated proteasomal degradation to promote cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 31: 2552-2565.
51. Liu, N., B. Tang, P. Wei, W. Sun, S. Wang, and Q. Peng. 2015. TRAF6-mediated degradation of DOK3 is required for production of IL-6 and TNFalpha in TLR9 signaling. *Mol. Immunol.* 68: 699-705.

Figure legends

Figure 1: Down-modulation of Dok expression levels following TCR stimulation

(A) Purified CD8⁺ T cells from spleen of OT-I WT mice (were stimulated for the time indicated with SJL splenocytes in presence of 0.1 µM Ova peptide After 3 days, cells were cultivated in presence of IL-15 for an additional 2 days (IL-15). RNAs were prepared and quantitative RT-PCR was performed. Relative mRNA expression was compared by setting the expression of *Dok-1* and *Dok-2* in naive CD8⁺ T cells to an arbitrary value of 1. Data are representative of two independent experiments.

(B) Naive WT OT-I CD8⁺ T cells (-) were stimulated with Ova/tet and anti-CD28 mAbs (Tet) for the indicated time and then cultivated for 2 additional days in presence of IL-15 (IL-15). Total cell extracts were analyzed by western blotting (WB) with the indicated antibodies. Antibodies against GAPDH were used as loading controls. The fold changes of protein bands are indicated and were measured by spot densitometry, normalized to the GAPDH loading control and compared to naive control cells. Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 2: The absence of Dok-1 and Dok-2 diminishes the response to VV-Ova *in vivo*

T cells from VV-Ova–infected WT and DKO C57BL/6 mice were analyzed at days 7 and 14 p.i. Dot plots show representative CD8 versus Ova/tet staining. The percentage and number (Nb) of Ova/tet⁺ CD8⁺ T cells in the spleen from WT and DKO mice are shown at days 7 and 14 p.i. Data are from two independent experiments with at least two mice per group per time point. Each

symbol represents one individual mouse. *, p < 0.05 and ** p < 0.01. Results are shown as the mean ± SEM.

Figure 3: Dok-1 and Dok-2 promote the number of memory cells generated following VV-Ova infection

1×10^4 purified naive WT or DKO CD8⁺ OT-I cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient mice (CD45.1/CD45.2) mice one day prior to infection with 1×10^6 PFU VV-Ova. Representative dot plots show CD45.1 and CD45.2 staining in the spleen at the indicated time after infection (top). Numbers on the plots indicate the percentage of OT-I cells in the spleen. Numbers of OT-I cells in the spleen at days 4, 7 and 35 p.i. (bottom). Data are from at least three independent experiments with three mice per experiment. ***, p < 0.001 and NS, non-significant. Graph results are shown as the mean ± SEM.

Figure 4: Absence of Dok1 and Dok2 does not affect proliferation and apoptosis *in vivo* after infection with VV

(A) Proliferation of WT and DKO OT-I cells after transfer of CFSE-labeled 1×10^6 purified naive WT or DKO OT-I cells (CD45.2) into WT recipient mice (CD45.1 CD45.2) followed by infection with VV-Ova. Representative histograms on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen show CFSE dilution on day 2 after infection. Shaded histograms show CFSE levels of naive CD8⁺ OT-I cells before transfer.

(B-C) 1×10^4 purified naive WT or DKO OT-I cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient (CD45.1/CD45.2) mice one day prior to infection with 1×10^6 PFU VV-Ova.

Representative histograms show Ki-67 expression at day 4 and 7 p.i of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells (B). Numbers indicate the percentage of Ki-67⁺ of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells at day 4 p.i. Graph shows the percentage of Ki-67⁺ of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells in the spleen at day 4 p.i. (B). Representative histograms show BrdU incorporation at day 4 p.i of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells (C). Numbers indicate the percentage of BrdU⁺ of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells at day 4 p.i. Graph shows the percentage of BrdU⁺ of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells in the spleen at day 4 p.i (C).

(D) Purified naive CD8⁺ T cells from WT and DKO B6 mice were labeled with CFSE and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs *in vitro*. Representative histograms on gated CD8⁺ T cells show CFSE dilution at the time indicated.

(E) Representative histograms of FasL, Bcl-2 and active caspase-3 expression of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells in the spleen of WT and DKO infected mice as in B before injection and at days 4 and 7 p.i.

(F) Plot shows the percentage of annexin V/7AAD⁺ of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells in the spleen of WT and DKO infected mice as in B at day 7 p.i.

Data are representative of three experiments with three mice per group (B, day 7), two experiments with at least three mice per group (B, day 4), one experiment with at least three mice per group (C) and two experiments with two mice per group (F). Each symbol represents one individual mouse. **, p < 0.01 and NS, non-significant. Graph results are shown as the mean ± SEM.

Figure 5: Dok proteins regulate the effector capacity of CD8⁺ T cells after infection with VV-Ova

(A-D) 1×10^4 purified naive WT or DKO CD8⁺ OT-I cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient (CD45.1/CD45.2) mice one day prior to infection with 1×10^6 PFU VV-Ova. Representative plots (left) show KLRG-1 and CD127 on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen at day 4, 7, and 35 after infection with VV-Ova (A). Graphs (right) show the percentage of KLRG-1⁺ cells at day 4, 7 and 35 (A). Splenocytes stimulated *ex vivo* for 4 h with Ova peptide and analyzed for IFN- γ , TNF, and granzyme B expression (B-C). Plots show IFN- γ versus TNF staining on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen at days 4, 7, and 35 p.i. (B). Graphs show the percentage of IFN- γ ⁺/TNF⁺ and granzyme B⁺ on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen at days 4 and 7 p.i. as indicated (C). Representative histograms show the expression of Eomes and T-bet and numbers correspond to the Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen. Graphs show the MFI of Eomes and T-bet staining on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen before injection and at day 7 p.i. (D) Data are representative of at least three independent experiments with two to five mice per time point (A-D). (E) Purified naive WT and DKO CD8⁺ CD45.2 OT-I cells were stimulated for 48 h with Ova peptide presented by CD45.1 splenocytes. Representative histograms on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells show Eomes and T-bet expression. Data are representative of three independent experiments with at least two mice per group. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 and NS, non-significant.

Figure 6: IL-2 signaling is not affected by *Dok-1/2* deficiency

- (A) Purified naive CD8⁺ T cells from WT and DKO OT-I mice were stimulated *in vitro* with anti-CD28 mAbs, alone (CD28), anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs (CD3 + CD28) or Ova/tet plus anti-CD28 mAbs (Tet + CD28) for 24 h (IL-2) and 48 h (IFN- γ). Representative graphs show the concentration of IL-2 and IFN- γ in culture supernatant. Data are representative of at least five experiments.
- (B) Purified naive CD8⁺ T cells from WT and DKO OT-I mice (CD45.2) with Ova peptide presented by SJL splenocytes (CD45.1) for the time indicated. Representative histograms on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells show phospho-STAT5 and CD25 expression in naive cells and at the time indicated after Ag stimulation. Data are representative of three experiments.
- (C) Cells were stimulated as in B for 48 h and rested overnight in culture medium. Cells were then stimulated with IL-2 at 50 U/ml for 15 and 45 min as indicated. Representative histograms on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells show phospho-STAT5 induction at the time indicated after IL-2 stimulation. Data are representative of two experiments.
- (D) 1 x 10⁶ (day 2) or 1 x 10⁴ (day 4 and 7) purified naive WT or DKO CD8⁺ OT-I cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient (CD45.1/CD45.2) mice one day prior to infection with 1 x 10⁶ PFU VV-Ova. Expression of CD25 is shown on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen at days 2, 4 and 7 p.i. Data are representative of at least two experiments with three mice per group.

Figure 7: Activation of mTor, Akt and Erk-1/2 is comparable in WT and DKO effector CD8⁺ T cells after VV-Ova infection

(A) 1×10^4 purified naive WT or DKO CD8⁺ OT-I cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient (CD45.1/CD45.2) mice one day prior to infection with 1×10^6 PFU VV-Ova. Histograms show expression of phospho-S6 ribosomal protein (pS6), phospho-AKT (pAKT) and phospho-ERK1/2 (pERK1/2) on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen at day 4 p.i. (left). Numbers in the histogram correspond to the percentages of pS6⁺ cells. Graph shows the percentage of pS6⁺ cells (right). Data are from two experiments with three to five mice per group. Each symbol represents one individual mouse. NS, non-significant.

(B) Purified naive CD8⁺ T cells from WT and DKO OT-I mice were stimulated *in vitro* with Ova/tet plus anti-CD28 mAbs for the indicated time. Representative histograms of gated CD8⁺ T cells show expression of phospho-S6 ribosomal protein (pS6), phospho-AKT (pAKT) and phospho-ERK1/2 (pERK1/2) (left). Total cell extracts of naive CD8⁺ T cells from WT and DKO OT-I mice stimulated *in vitro* with Ova/tet plus anti-CD28 mAbs for the indicated time were analyzed by western blotting (WB) with the indicated antibodies (right). Antibodies against ERK1/2 and S6 ribosomal protein (S6) were used as loading controls. Data are representative of at least three different experiments.

Figure 8: Dok proteins regulate cell surface expression of TCR and PD-1 on effector CD8⁺

T cells during VV-Ova infection

(A-B) 1×10^4 purified naive WT or DKO CD8⁺ OT-I cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient (CD45.1/CD45.2) mice one day prior to infection with 1×10^6 PFU VV-Ova. Representative histograms show expression of TCR β and PD-1 and Ova/tet staining on gated CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells in the spleen at days 4, 7, and 35 p.i. (A). Graphs show the MFI of TCR β ⁺, Ova/tet⁺, PD-1⁺ and CD45.2⁺ CD8⁺ OT-I cells at day 7 p.i. (B). Data are from at least three experiments with three mice per group.

(C) Mice were treated as in (A). On day 7 p.i. virus titers in the ovaries were determined by plaque assay. Graph represents the number of pfu/ovary. Data are from one experiment with 4 mice per group.

Each symbol represents one individual mouse. **, p < 0.01; ***, p < 0.001 and NS, non-significant.

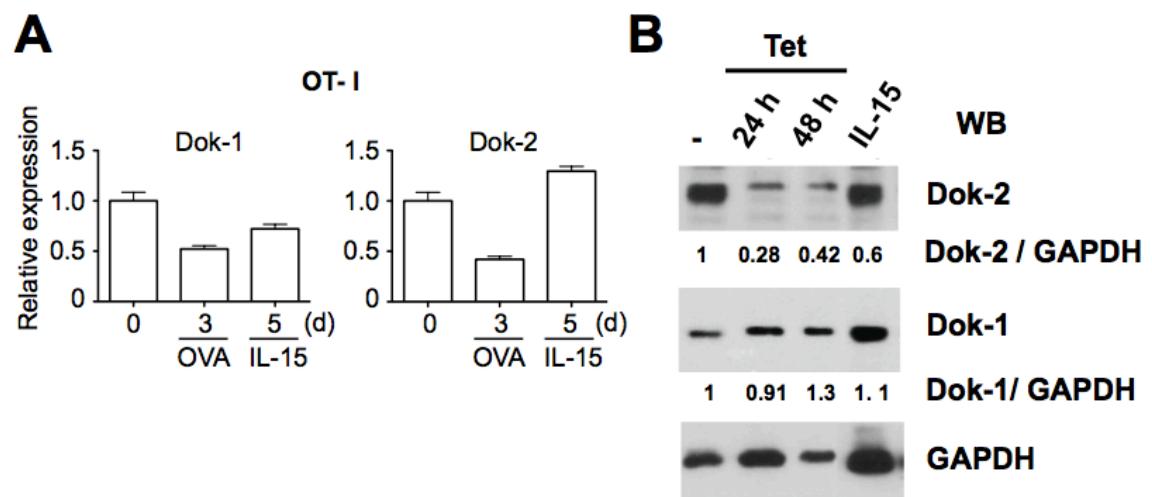


Figure 1: Down-modulation of Dok expression levels following TCR stimulation

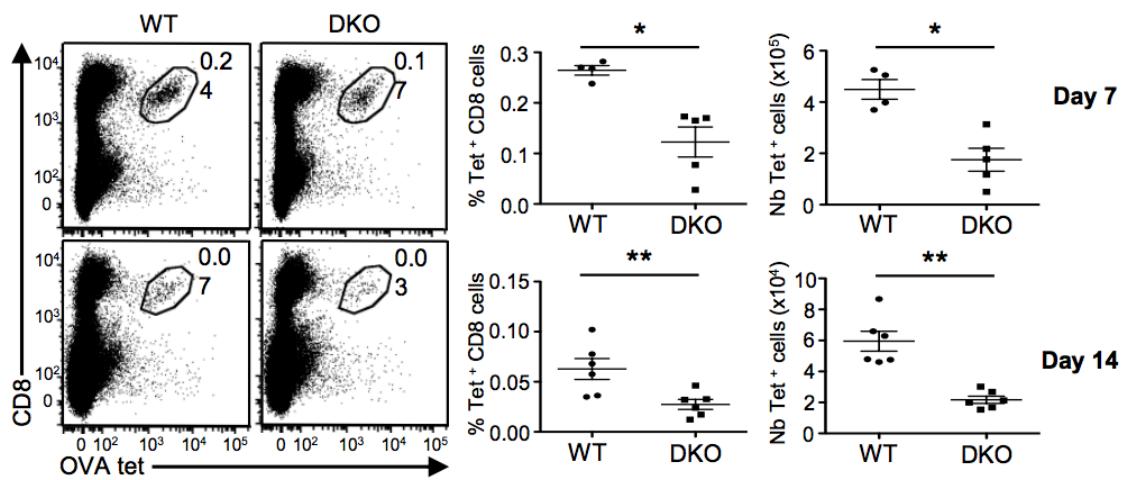


Figure 2: The absence of Dok-1 and Dok-2 diminishes the response to VV-Ova *in vivo*

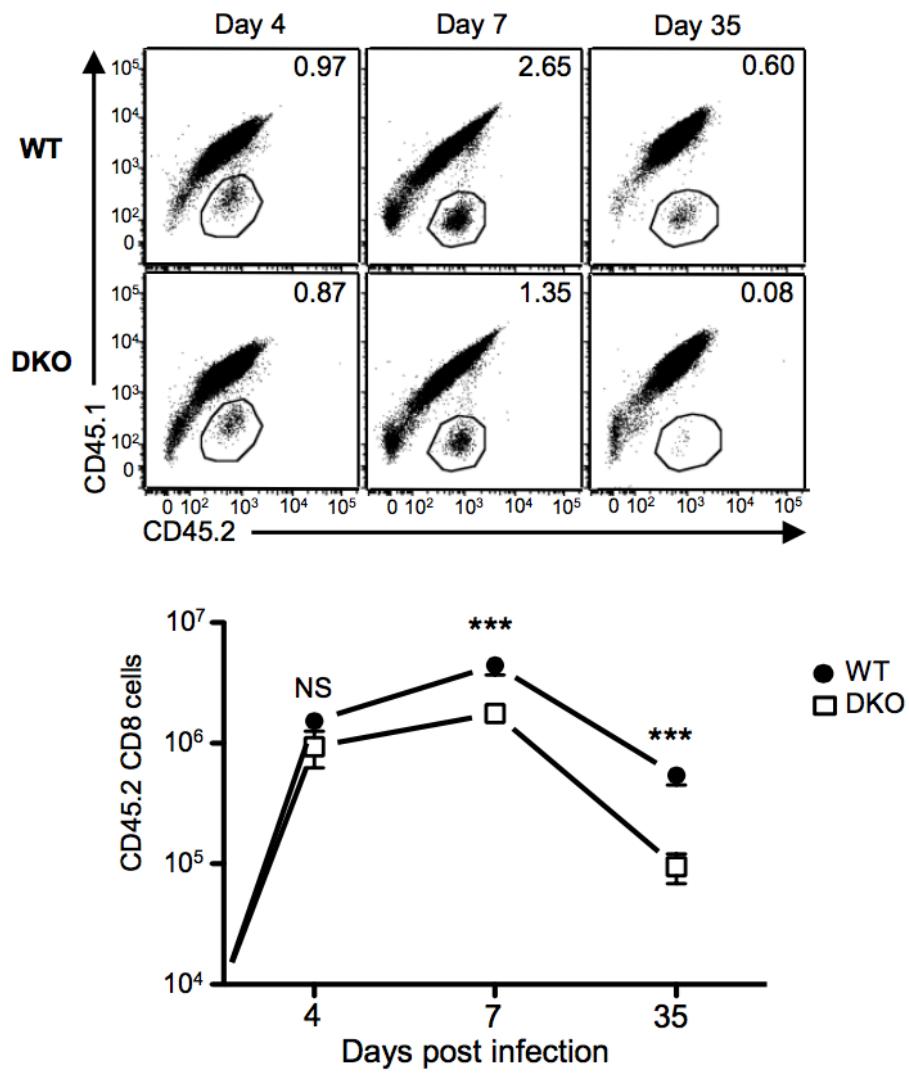


Figure 3: Dok-1 and Dok-2 promote the number of memory cells generated following VV-Ova infection

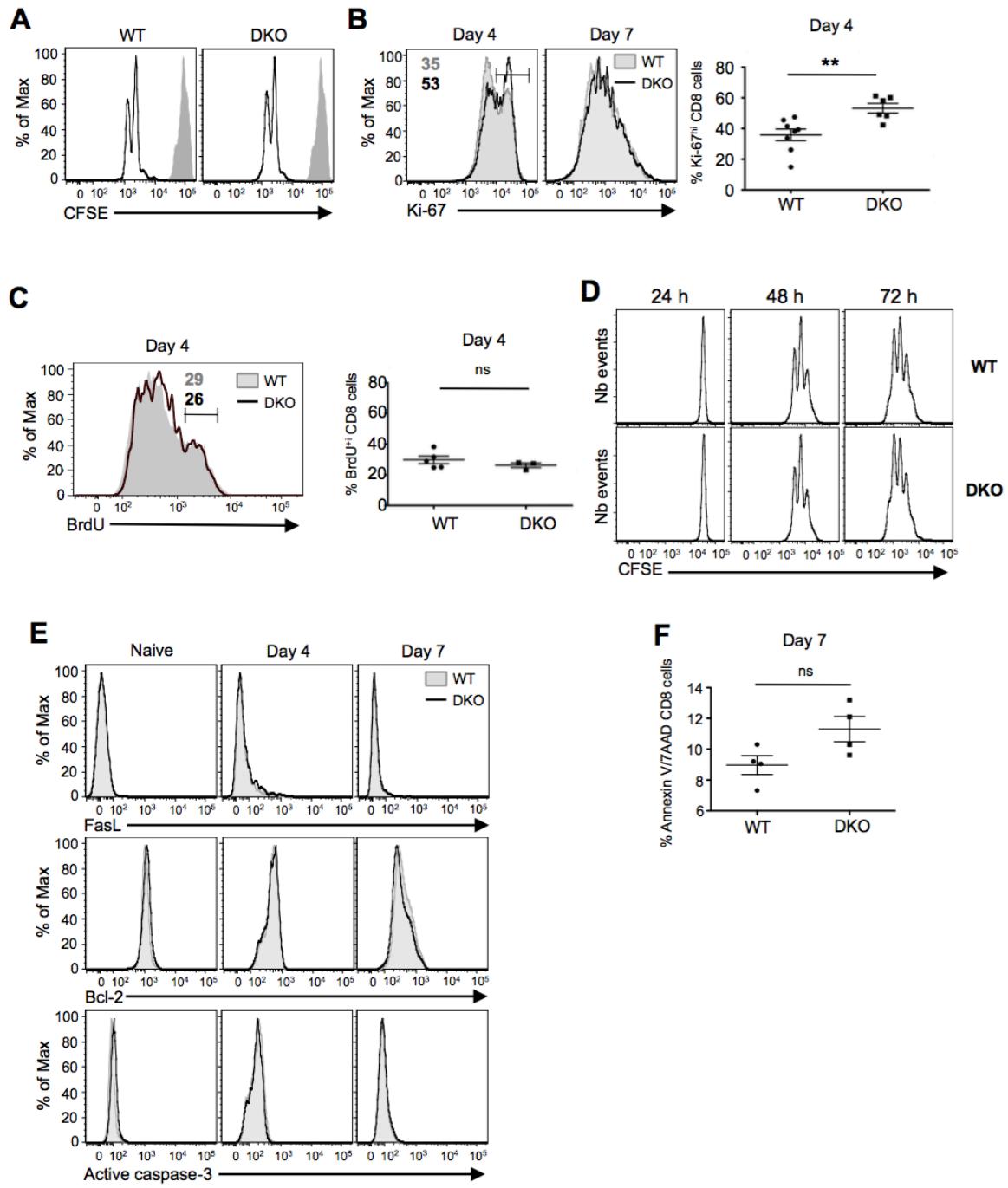


Figure 4: Absence of Dok-1 and Dok-2 does not affect proliferation and apoptosis *in vivo* after infection with VV

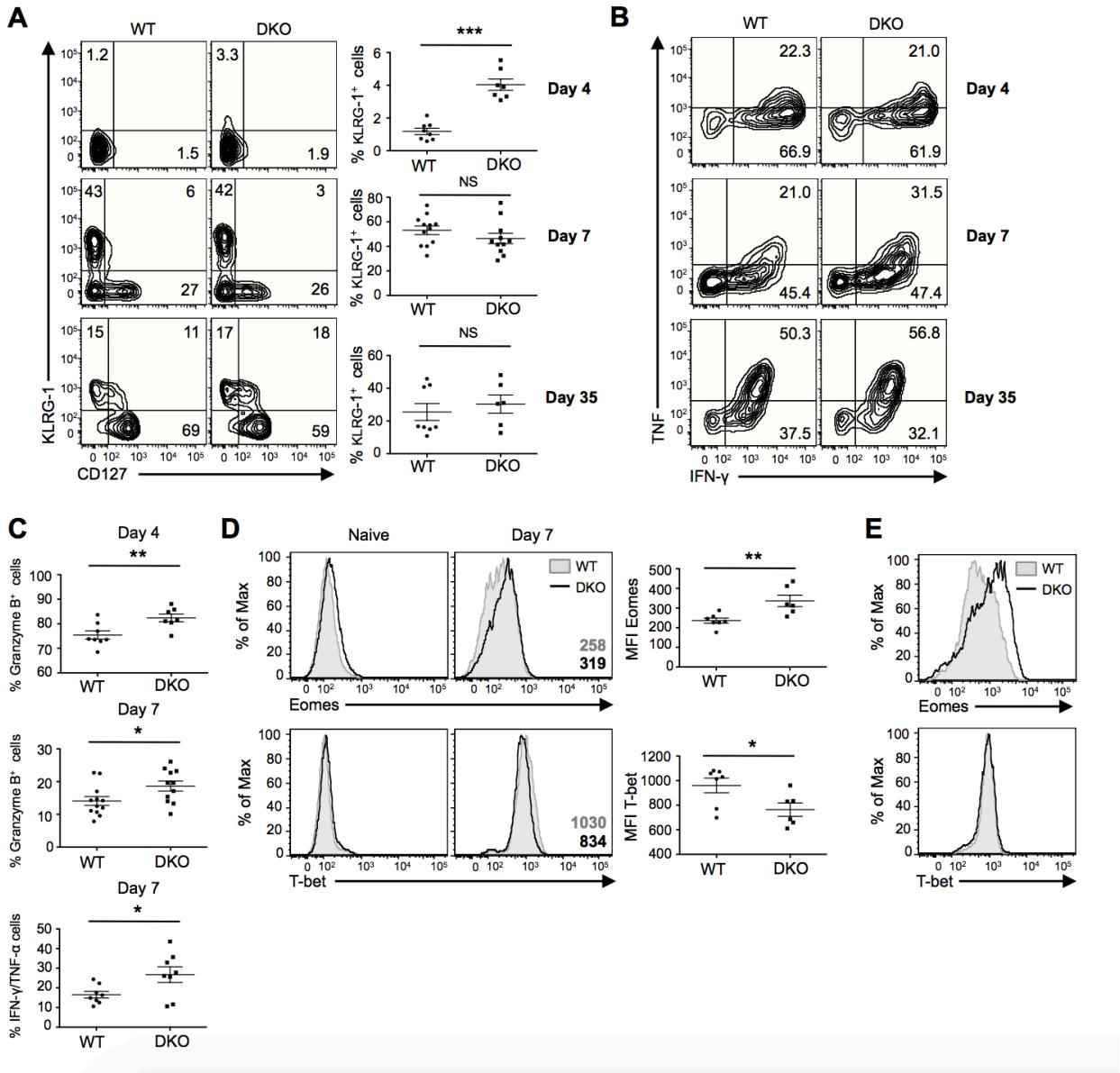


Figure 5: Dok proteins regulate the effector capacity of CD8+ T cells after infection with VV-Ova

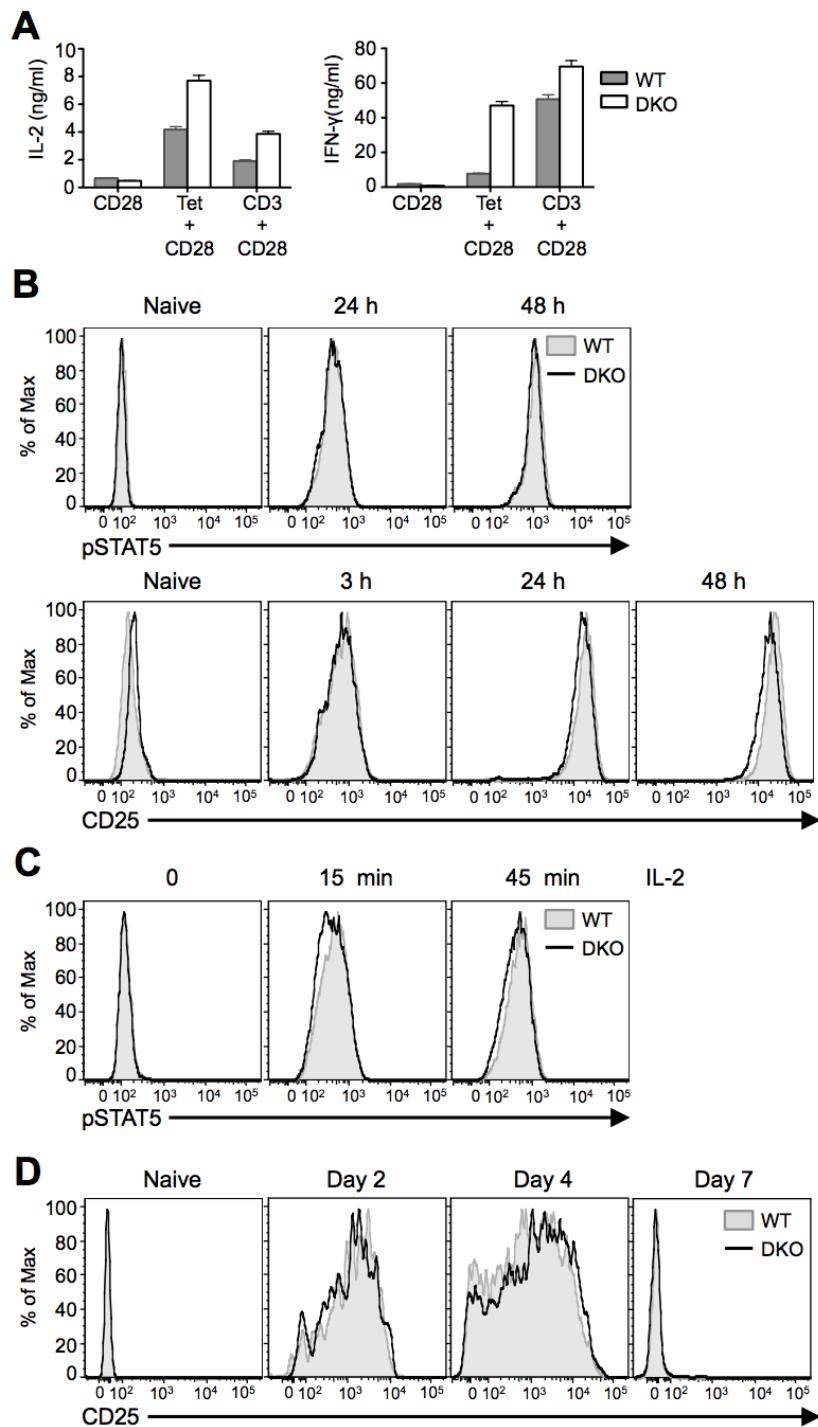


Figure 6: IL-2 signaling is not affected by Dok-1/2 deficiency

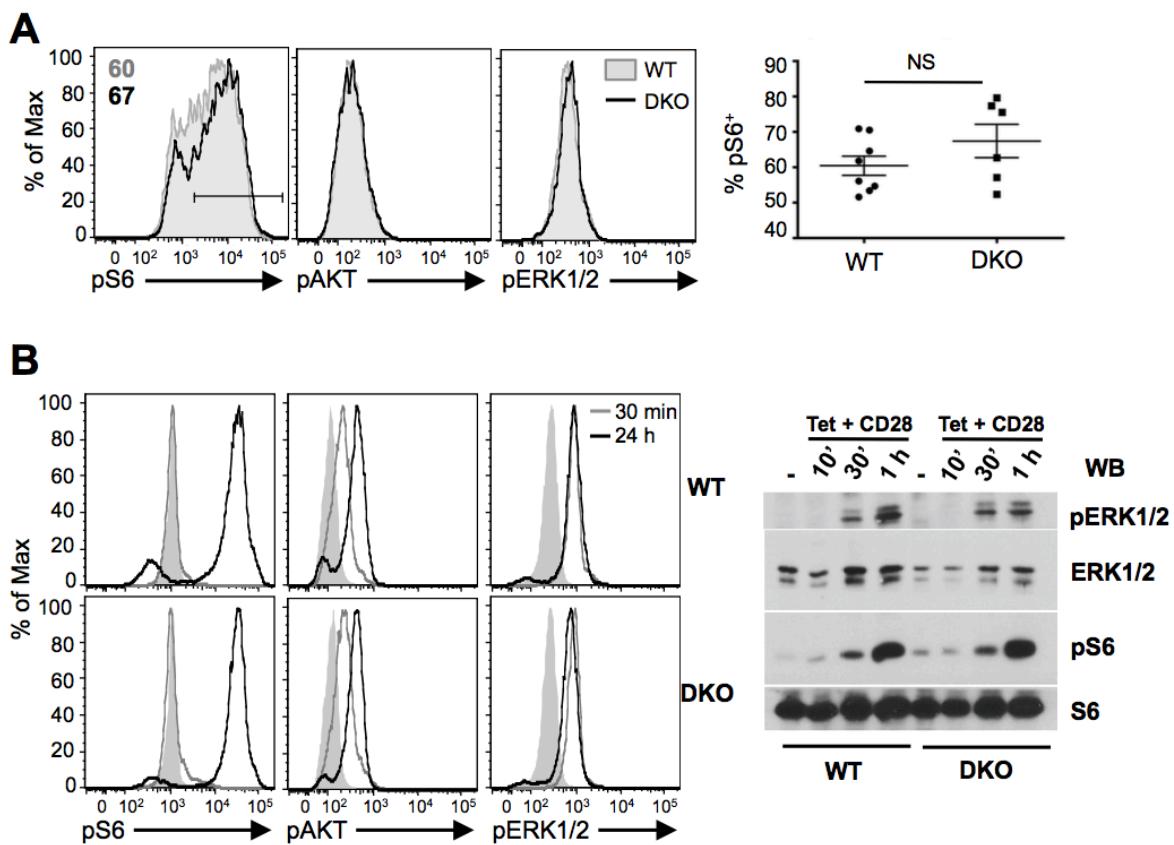


Figure 7: Activation of mTOR, Akt and Erk-1/2 is comparable in WT and DKO effector CD8+ T cells after VV-Ova infection

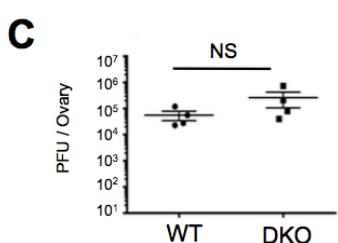
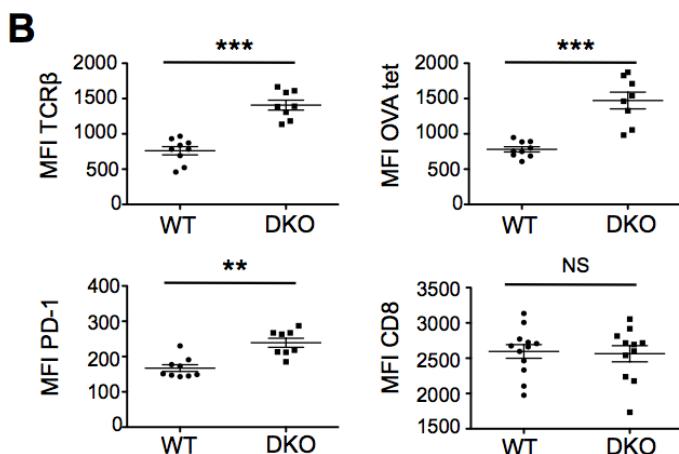
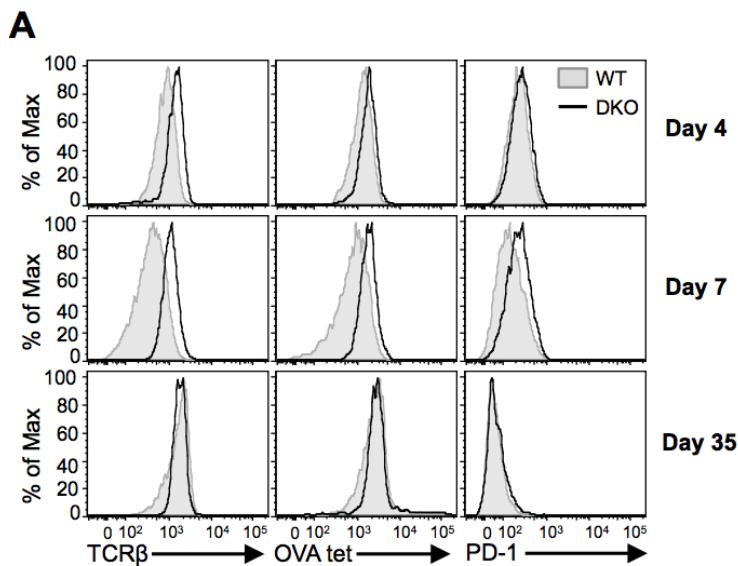
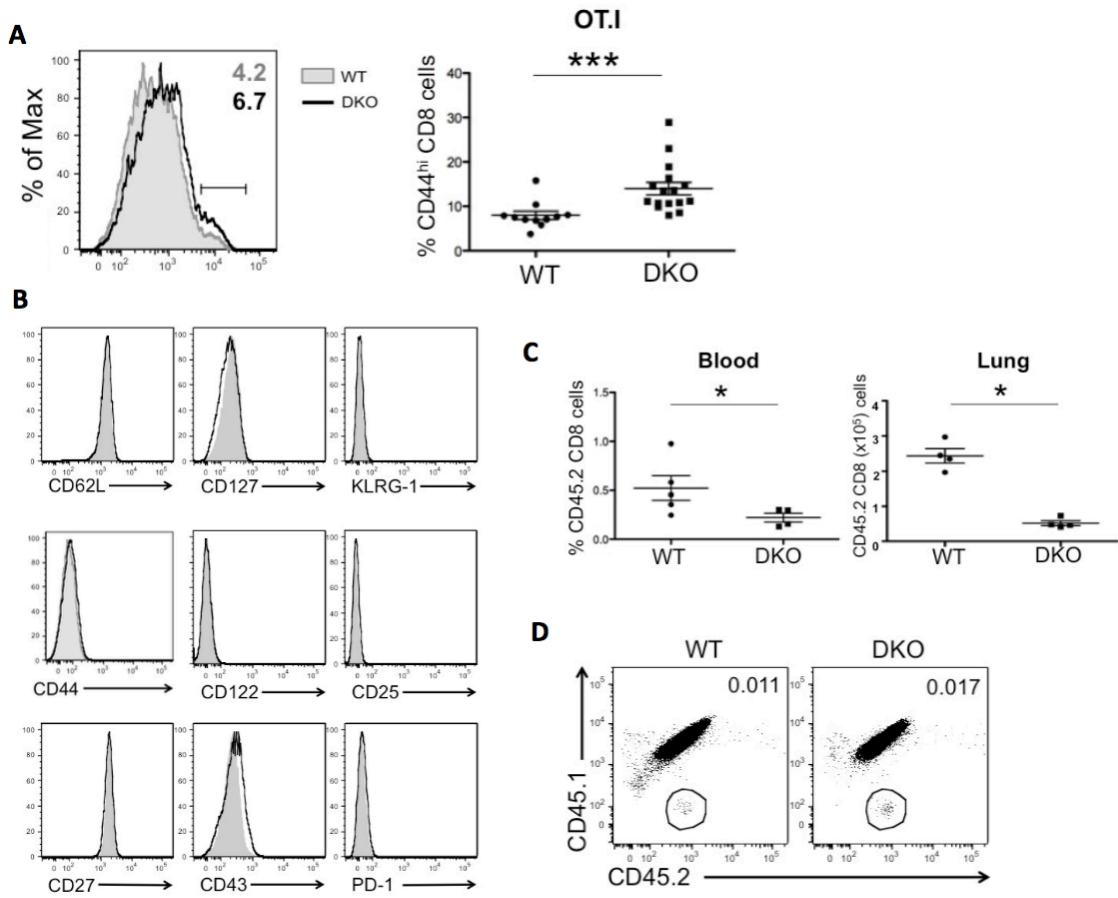


Figure 8: Dok proteins regulate cell surface expression of TCR and PD-1 on effector CD8+ T cells during VV-Ova infection



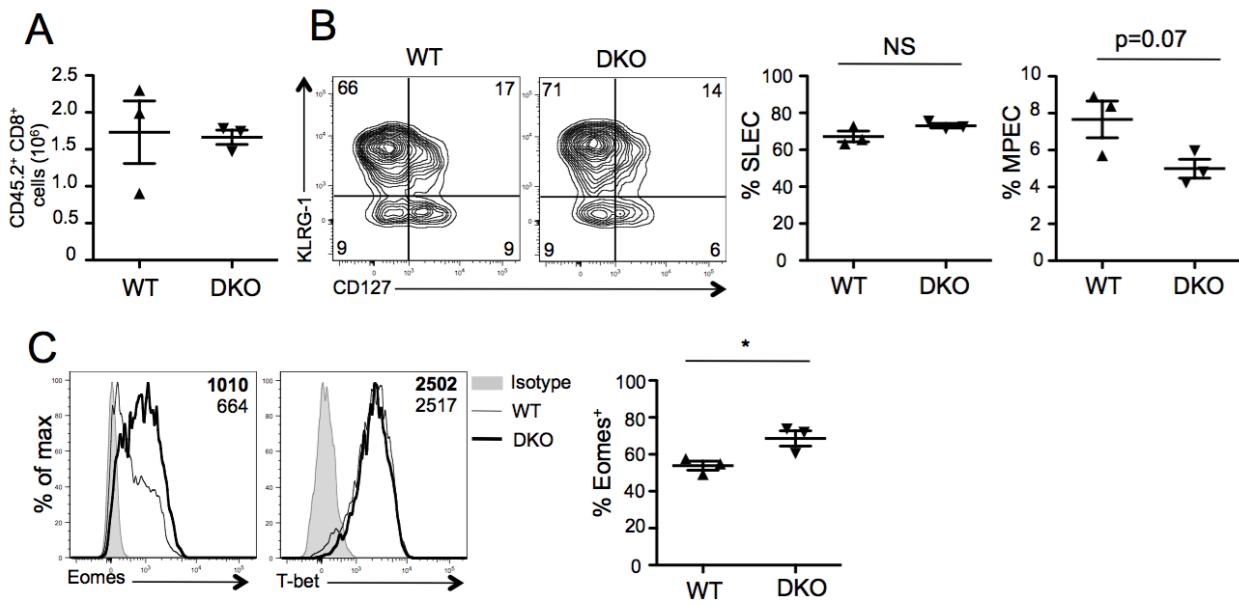
Supplemental Figure 1: Purified naive DKO OT-I CD8⁺ T cells present a similar phenotype than WT OT-I CD8⁺ T cells and do not have a skewed distribution after VV-Ova infection and persist in absence of infection

A. Representative histogram of CD44 expression (right) and statistical analysis (left) on gated CD8⁺ T cells in the spleen of WT and DKO Rag^{+/−} OT-I mice. Numbers indicate the percentage of CD44^{high} cells. CD44^{high} cells are CD25[−] CD69[−]. Each symbol represents an individual mouse 6 to 8 wks old. Data are from 14 independent experiments.

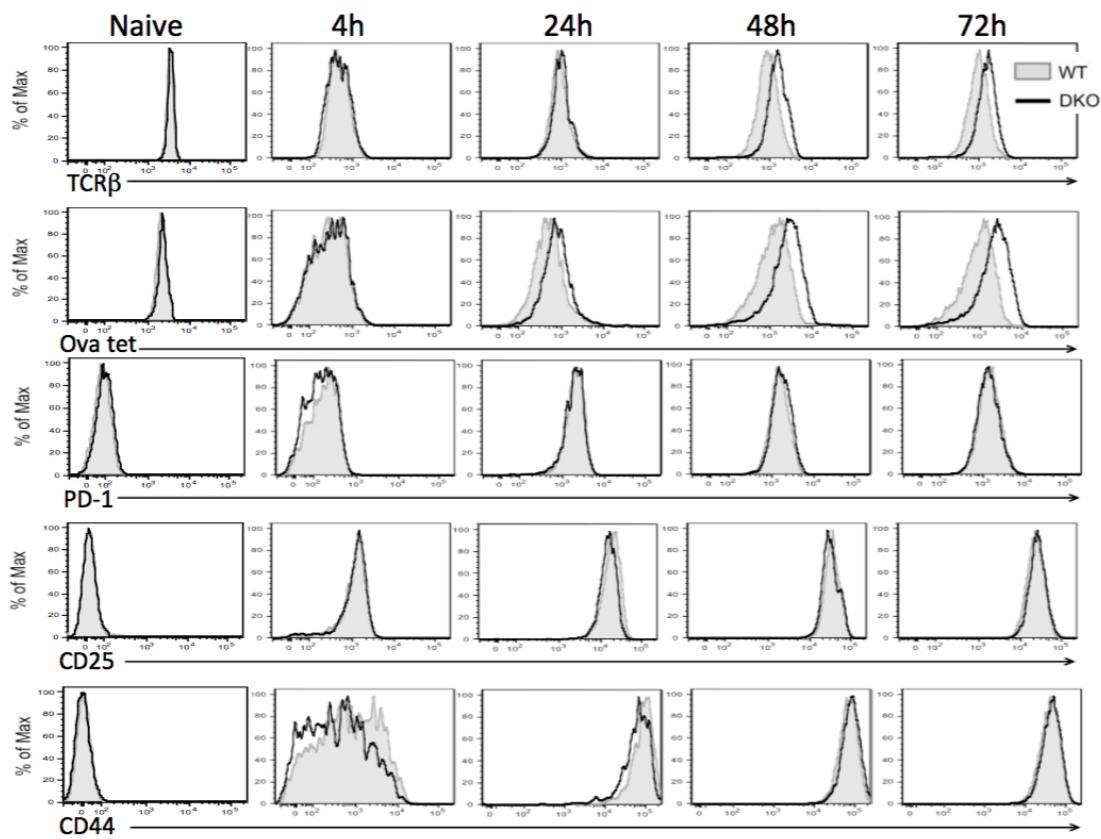
B. Phenotype of naive WT and DKO OT-I after purification.

C. 1 x 10⁴ purified naive WT or DKO OT-I CD8⁺ cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient mice (CD45.1 CD45.2) mice one day prior to infection with 1 x 10⁶ PFU VV-Ova. Graph represent the percentage of OT-I CD45.2⁺ CD8⁺ cells in the blood and the numbers of OT-I CD45.2⁺ CD8⁺ cells in the lung at day 35 after infection with VV-Ova. Data are from two independent experiments with three mice per group.

D. 1 x 10⁶ purified naive WT or DKO OT-I CD8⁺ cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient mice (CD45.1 CD45.2) mice . Representative dot plots of OT-I CD45.2⁺ CD8⁺ cells in the spleen at day 35 after transfer. Data are from one experiment with three mice per group. *, p < 0.05; ***, p < 0.001.



Supplemental Figure 2: Dok1/2 regulate the cytokine production and Eomes expression of effector CD8⁺ T cells following LM-Ova infection (A-C) 5×10^3 purified naive WT or DKO OT-I CD8⁺ cells (CD45.2) were adoptively transferred into WT recipient mice (CD45.1) mice one day prior to infection with 2×10^3 CFUs LM-Ova. i.v. Analysis were performed at day 7 p.i. (A) numbers of gated OT-I CD45.2⁺ CD8⁺ in the spleen. (B) Representative plots show KLRG-1 and CD127 on gated OT-I CD45.2⁺ CD8⁺ cells in the spleen and graph show the percentage of SLECs (KLRG1^{High} CD127^{low} and MPEC (KLRG1^{low} CD127^{high}) (C). Representative histograms show the expression of Eomes and T-bet. Numbers indicate the MFI of OT-I CD45.2⁺ CD8⁺ T cells in the spleen. Data are representative of one experiment with three mice per time point. *, p < 0.05 and ns, non-significant.



Supplemental Figure 3: Dok1/2 regulate the cell surface TCR expression of CD8⁺ T cells stimulated *in vitro*

Purified naive CD8⁺ cells from WT and DKO OT-I mice were stimulated with 0.1 μ M Ova peptide presented by CD45.1 splenocytes for the indicated time. Representative histograms on gated OT-I CD45.2⁺ CD8⁺ T cells show expression of TCR β , Ova/tet, PD-1, CD25 and CD44. Data are representative of two independent experiments.

DISCUSSION

La réponse immunitaire adaptative cellulaire spécifique est essentielle à l'élimination du pathogène suite à une infection virale. Les trois signaux comprenant la nature et la force du signal TCR, les signaux de co-stimulation et la présence de cytokines inflammatoires dictent le destin des cellules activées (Butler *et al.*, 2011). Chaque étape de la signalisation est contrôlée à différents niveaux par des molécules régulatrices. Parmi celles-ci, on retrouve les protéines Dok. Ces molécules adaptatrices sont connues pour être impliquées dans la voie de signalisation du TCR, CD28, SLAM, CD2 et CXCR4 (Nemorin *et al.*, 2000; Latour *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2001; Latour *et al.*, 2003; Gerard *et al.*, 2004; Boulay *et al.*, 2005; Okabe *et al.*, 2005; Yasuda *et al.*, 2007; Mashima *et al.*, 2009).

Il a clairement été démontré que les protéines Dok sont des régulateurs négatifs de la voie du TCR (Mashima *et al.*, 2009). En effet, les protéines Dok-1 et Dok-2 agissent selon deux mécanismes connus dans les cellules T. D'abord, elles compétitionnent avec la tyrosine kinase ZAP-70 et empêche sa liaison aux molécules ITAMs phosphorylées du complexe TCR/CD3. De plus, lorsque les protéines Dok sont activées par phosphorylation, elles ont la capacité de recruter la molécule inhibitrice RasGAP à proximité de la membrane et de sa molécule cible Ras. La voie Ras mène normalement à l'activation des facteurs de transcription ERK1/2, celle-ci est inhibée en présence de l'inhibiteur RasGAP (Mashima *et al.*, 2009). Par contre, tous ces résultats proviennent d'études *in vitro* uniquement. Nous nous sommes donc intéressés au rôle des protéines Dok-1 et Dok-2 dans le développement de la réponse mémoire dans un modèle murin *in vivo* d'infection virale.

L'ensemble de nos résultats suggère que les protéines Dok-1/2 sont des régulateurs négatifs qui contrôlent à deux niveaux le développement de la réponse T CD8⁺ spécifique. D'abord l'absence des protéines Dok-1/2 semble diminuer le seuil d'activation des cellules T. De plus, Dok-1/2 semble participer à une boucle de rétro-inhibition de la voie de signalisation du TCR qui empêche normalement l'hyper-activation des lymphocytes T suite à la rencontre de l'antigène.

Nous avons démontré que l'expression des protéines Dok-1 et Dok-2 est modulée au cours de la réponse T *in vitro*. Effectivement, suite à une stimulation du récepteur TCR, on observe une diminution de l'expression de l'ARNm des protéines Dok-1 et Dok-2, ainsi qu'une diminution de l'expression de la protéine Dok-2. De plus, des travaux antérieurs ont montré que les protéines Dok sont également régulées au niveau de leur phosphorylation. La protéine Dok-2 retrouve un niveau basal lorsque le signal TCR diminue.

Nous proposons que l'expression de Dok-2 diminue afin de permettre l'activation des cellules T naïves. L'expression de Dok-2 revient à un niveau basal ensuite pour arrêter le signal d'activation et promouvoir la survie cellulaire. Davantage d'expériences seront nécessaires pour caractériser les niveaux d'expression des protéines Dok et les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de l'expression et la phosphorylation des protéines Dok lors de la réponse antivirale. En accord avec une sensibilité accrue des cellules naïves à une stimulation par le TCR, les cellules OT-I DKO avant infection présentent un plus grand pourcentage de cellules CD44^{hi}. Une lignée de souris TCR transgénique OT-I est légèrement lymphopénique. Par conséquent, chez les souris DKO, la prolifération homéostatique induite par la reconnaissance de peptide du soi par le CMH est probablement plus importante que chez les souris WT. À noter que pour éliminer des différences dues aux cellules OT-I CD44^{hi} lors des expériences de transfert adoptif et d'infection, nous avons purifié les cellules naïves CD62L^{hi}CD44^{low} avant injection.

Nos résultats montrent que les protéines Dok pourraient jouer un rôle à deux étapes au cours de la réponse des cellules T CD8 lors d'une infection virale : l'initiation et la terminaison de la réponse effectrice.

Initiation de la réponse : activation des cellules T naïves

Suite à l'infection virale par VV-Ova, les cellules DKO spécifiques au virus présentent une activation supérieure à celle des cellules WT. Effectivement, au jour 4 pi, les cellules DKO présentent une augmentation du pourcentage de cellules KLRG-1⁺, en plus d'avoir un niveau de prolifération légèrement supérieur aux cellules WT. Ce résultat corrèle avec l'hypothèse que

l'absence des protéines Dok-1/2 dans les cellules T diminuerait leur seuil d'activation ou permettrait une réponse plus rapide des cellules T.

Une autre caractéristique des cellules DKO, qui va dans ce sens, est l'augmentation précoce de l'expression d'Eomes, ainsi que l'augmentation de leur capacité à sécréter des molécules effectrices, telles que granzyme B et TNF, suite à l'infection. L'augmentation du facteur de transcription Eomes est complexe à analyser puisqu'il dépend beaucoup de l'expression d'autres facteurs tel que T-bet (Intlekofer *et al.*, 2005). Par contre, la forte expression d'Eomes si tôt dans la réponse permettrait une augmentation de la fonction des cellules effectrices, puisqu'Eomes régule l'expression d'IFN-g et granzyme B, malgré que ce soit un facteur essentiel à la persistance des cellules mémoires (Kaech *et al.*, 2012).

On observe également une augmentation transitoire de l'expression de l'inhibiteur PD-1 dans les cellules DKO lors de la phase d'expansion suite à l'infection virale. L'augmentation de PD-1 pourrait être une conséquence de l'augmentation de l'expression d'Eomes puisqu'Eomes régule l'expression de PD-1 et/ou pourrait refléter une augmentation du signal provenant du TCR.

Ainsi, l'absence des protéines Dok-1 et Dok-2 semble favoriser la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices au détriment des cellules mémoires.

Terminaison de la réponse : boucle de rétro-inhibition

L'ensemble de nos résultats suggère également que les protéines Dok-1/2 dans les cellules T participent à une boucle de rétro-inhibition suite à la stimulation du TCR.

Lors de la comparaison des réponses T durant une infection par VV-Ova, on observe que l'expression des protéines Dok est essentielle à une expansion optimale des cellules T CD8 spécifiques au virus. Effectivement, autant dans un modèle de souris C57BL/6 que dans un modèle de transfert adoptif de cellules T CD8 OT-I WT vs DKO, on observe, au cours de la phase d'expansion (jour 7), une diminution significative de la population des cellules T CD8 DKO spécifiques au virus suite à l'infection, par rapport à la population des cellules T CD8 WT. De

plus, on observe, dans un modèle de transfert adoptif, un défaut encore plus important pour la survie des cellules DKO lors du développement de la mémoire immunologique (jour 35 pi). Nous pensons qu'en plus de favoriser la différenciation des cellules effectrices, l'absence des protéines Dok dans les cellules T semble compromettre la durée de vie des cellules en promouvant l'apoptose des cellules. Par contre, pour le moment nos résultats obtenus, à l'aide des marqueurs de caspase-3 active et d'Annexin V/7AAD, ne montrent pas de différence dans les niveaux d'apoptose entre les cellules WT et DKO. *In vivo*, les cellules apoptotiques sont rapidement éliminées et donc difficilement détectables. Davantage d'expériences seront nécessaires afin de confirmer ou infirmer une augmentation de la mort des cellules T CD8 DKO par apoptose.

Une observation importante qui a été effectuée lors de l'étude concerne l'expression à la surface cellulaire des molécules du TCR. Nos résultats supportent un modèle dans lequel les protéines Dok contrôleraient la durée du signal TCR en régulant la réexpression des molécules TCR suite à leur internalisation. Effectivement, nos résultats démontrent que les récepteurs TCR sont internalisés à la même vitesse, mais le retour progressif au niveau d'expression basal normalement observé se fait beaucoup plus rapidement dans les cellules T CD8 DKO. Suite à la rencontre de son antigène, les molécules du TCR sont internalisées afin de réguler l'activation de la signalisation intracellulaire via la voie du TCR. Les récepteurs internalisés peuvent, entre autres, être réexprimés à la surface cellulaire ou dégradés par la voie ubiquitine/protéasome (Wiedemann *et al.*, 2005). La vitesse à laquelle le niveau d'expression des molécules TCR revient à un niveau basal dépend de l'activité de dégradation de ces récepteurs suite à leur internalisation. Cbl-b est une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation des molécules par le protéasome (Qiao *et al.*, 2013). Les protéines Dok-1 et/ou Dok-2 pourraient, de manière directe ou indirecte, stimuler l'activation de Cbl-b. Une telle hypothèse permettrait de rendre compte de l'effet des protéines Dok sur l'expression du TCR à la surface des cellules T suite à une stimulation antigénique. Nous proposons que la régulation de l'expression du TCR par les protéines Dok représente un mécanisme de contrôle de l'activation des cellules T. Des études ultérieures seront nécessaires afin de déterminer si oui ou non, et si oui par quel mécanisme, Dok-1/2 réguleraient les niveaux de réexpression, suite à leur internalisation, des récepteurs TCR à la surface des cellules T suite à l'infection virale.

CONCLUSION

Pour conclure, la génération de cellules T CD8⁺ mémoires suite à une stimulation antigénique dépend de plusieurs facteurs qui semblent être influencés par le niveau d'expression des protéines inhibitrices Dok-1 et Dok-2. Les étapes clés incluent d'abord la différenciation des cellules T CD8⁺ naïves en cellules effectrices. Cette étape, régulée, entre autres, par les trois signaux (TCR, molécules de co-stimulation et cytokines inflammatoires) est cruciale au développement d'une réponse cellulaire efficace. Lors de cette étape, nous avons observé un impact important au niveau de la régulation du signal 1 (TCR) par les protéines Dok-1 et Dok-2. Effectivement, l'absence des protéines Dok semble affecter la durée de ce signal lors d'une infection virale aigüe. Ainsi, les protéines Dok pourraient limiter la durée du signal TCR et par conséquent empêcher une réponse excessive à la stimulation antigénique. En plus d'avoir un effet important au niveau de la différenciation des cellules effectrices en empêchant l'hyper-activation qui mènerait à l'apoptose d'une grande portion des cellules activées, l'impact des protéines Dok se traduit également au niveau de la génération des cellules T CD8⁺ mémoires. Normalement, lors de la phase de contraction, une petite quantité de cellules (5-10%) diminue la vitesse de leur cycle de division cellulaire (Kinjyo *et al.*, 2015), ce qui permet à ces cellules d'éviter la mort cellulaire et d'entrer en phase de différenciation en LLMC. Par contre, les cellules DKO présentent un défaut pour retourner en phase G0 du cycle cellulaire puisque l'expression de Ki-67 reste plus élevée que chez les cellules WT au jour 4 post-infection. Ainsi, les protéines Dok pourrait agir lors d'une étape cruciale lors de la transition des effectrices en cellules mémoires en inhibant le cycle cellulaire permettant aux cellules de survivre à la phase de contraction. Les protéines Dok jouerait donc un rôle de régulateur essentiel en promouvant le développement des cellules T CD8⁺ mémoires dans un contexte d'infection virale aigüe.

RÉFÉRENCES

Abraham RT & Weiss A (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. Nat. Rev. Immunol. 4: 301-308

Acuto O & Michel F (2003) CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. Nat Rev Immunol. 3(12):939-51.

Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, Larsen CP & Ahmed R (2009) mTOR regulates memory CD8 T cell differentiation. Nature. 460(7251):108-12.

Banerjee A, Gordon SM, Intlekofer AM, Paley MA, Mooney EC, Lindsten T, Wherry EJ & Reiner SL (2010) Cutting edge : The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. J Immunol. 185(9):4988-92.

Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Furie B, Gallatin M, Gimbrine M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, Paulson J, Rosen S, Seed B, Siegeman M, Springer T, Stoolman L, Tedder T, Varki A, Wagner D, Weissman I & Zimmerman G (1991) Selectins : A family of adhesion receptors. Cell. 67(2):233.

Boulay I, Némorin JG & Duplay P (2005) Phosphotyrosine binding-mediated oligomerization of downstream of tyrosine kinase (Dok)-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation. J Immunol. 175(7):4483-9.

Brown KE, Freeman GJ, Wherry EJ, Sharpe AH (2010) Role of PD-1 in regulating acute infections. Curr Opin Immunol. 22(3):397-401.

Brownlie RJ & Zamoyska R (2013) T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. Nat Rev Immunol. 13(4):257-69.

Butler NS, Nolz JC & Harty JT (2011) Immunologic considerations for generating memory CD8 T cells through vaccination. Cell Microbiol. 13(7):925-33.

Cannons JL, Lau P, Ghuman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K & Watts TH (2001) 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. J Immunol. 167(3):1313-24.

Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, Stillman B & Clarkson B (1997) p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. Cell. 88(2):197-204.

Chahroudi A, Chavan R, Kozyr N, Waller EK, Silvestri G & Feinberg MB (2005) Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. J Virol. 79(16):10397-407.

Chang JT, Wherry EJ & Goldrath AW (2014) Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. Nat Immunol. 15(12):1104-15.

Costa PA, Leoratti FM, Figueiredo MM, Tada MS, Pereira DB, Junqueira C, Soares IS, Barber DL, Gazzinelli RT & Antonelli LR (2015) Induction of inhibitory receptors on T cells during plasmodium vivax malaria impairs cytokine production. J Infect Dis. 2012:1999-2010.

De Smedt T, Smith J, Baum P, Fanslow W, Butz E & Maliszawski C (2002) Ox40 costimulation enhances the development of T cell responses induced by dendritic cells in vivo. J Immunol. 168(2):661-70.

Dong S, Corre B, Foulon E, Dufour E, Veillette A, Acuto O & Michel F (2006) T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. J Exp Med. 203(11):2509-18.

Dustin ML (2004) Stop and go traffic to tune T cell responses. Immunity. 21(3):305-14.

Duttagupta PA, Boesteanu AC & Katsikis PD (2009) Costimulation signals for memory CD8+ T cells during viral infections. Crit Rev Immunol. 29(6):469-86.

Elsaesser H, Sauer K & Brooks DG (2009) IL-21 is required to control chronic viral infection. Science. 324(5934):1569-72

Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA & Schreiber SL (1994) Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. Science. 266(5188):1241-7.

Fernandez-Ramos AA, Poindessous V, Marchetti-Laurent C, Pallet N & Loriot MA (2016) The effect of immunosuppressive molecules on T-cell metabolic reprogramming. Biochimie. 127:23-36

Flynn DC (2001) Adaptor proteins. Oncogene. 20(44):6270-2.

Forman-Kay JD & Pawson T (1999) Diversity in protein recognition by PTB domains. Curr Opin Struct Biol. 9(6):690-5.

Fröhlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, Weber J, Marsland BJ, Oxenius A & Kopf M (2009) IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. Science. 324(5934):1576-80

Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ & Steinman RM (2004) The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. J Exp Med. 199:1607-1618.

Fuse S, Tsai CY, Molloy MJ, Allie SR, Zhang W, Yagita H & Usherwood EJ (2009) Recall responses by helpless memory CD8+ T cells are restricted by the up-regulation of PD-1. J Immunol. 182:4244-4254.

Gérard A, Favre C, Garçon F, Némorin JG, Duplay P, Pastor S, Collette Y, Olive D & Nunès JA (2004) Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase. *Oncogene*. 23(8):1594-8.

Grayson JM, Murali-Krishna K, Altman JD & Ahmed R (2001) Gene expression in antigen-specific CD8+ T cells during viral infection. *J Immunol*. 166(2):795-9.

Gugasyan R, Quilici C, I ST, Grail D, Verhagen AM, Roberts A, Kitamura T, Dunn AR & Lock P (2002) Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites. *J Cell Biol*. 158(1):115-25.

Hernandez J, Aung S, Marquardt K, Sherman LA (2002) Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8(+) T cells responding to self-antigens. *J Exp Med*. 196:323-333.

Homann D, Teyton L & Oldstone MB (2001) Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med*. 7(8):913-9.

Ilie M, Falk AT, Butori C, Chamorey E, Bonnetaud C, Long E, Lassalle S, Zahaf K, Vénissac N, Mouroux J, Cohen C, Brambilla E, Marquette CH, Hofman V & Hofman P (2016) PD-L1 expression in basaloid squamous cell lung carcinoma : Relationship to PD-1+ and CD8+ tumor-infiltrating cells and outcome. *Mod Pathol*. doi:10.1038.

Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, Mullen AC, Gasink CR, Kaech SM, Miller JD, Gapin L, Ryan K, Russ AP, Lindsten T, Orange JS, Goldrath AW, Ahmed R, Reiner SL (2005) Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol*. 6(12):1236-1244.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K & Honjo T (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 11(11):3887-95.

Jang IK & Gu H (2003) Negative regulation of TCR signalling and T-cell activation by selective protein degradation. *Curr Opin Immunol*. 15(3):315-20.

Kadri N, Blomqvist M & Cardell SL (2008) Type II natural killer T cells : a new target for immunomodulation? *Expert Rev Clin Immunol*. 4(5):615-27.

Kaech SM & Cui W (2012) Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation *Nature Reviews Immunology* 12:749-761.

Kaech SM, Wherry EJ & Ahmed R (2002) Effector and memory T-cell differentiation : implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2(4):251-62.

Kallies A, Xin A, Belz GT & Nutt SL (2009) Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity*. 31(2):283-95.

Keppler SJ, Theil K, Vucikuja S & Aichele P (2009) Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections : Role of direct IL-12 signals for fate decision of CD8(+) T cells. Eur J Immunol. 39(7):1774-83.

Koretzky GA & Myung PS (2001) Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. Nat Rev Immunol. 1(2):95-107.

Laplante M & Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. J Cell Sci. 122(Pt 20):3589-94.

Laplante M & Sabatini DM (2012) mTOR signalling in growth control and disease. Cell. 149(2):274-93.

Latour S, Gish G, Helgason CD, Humphries RK, Pawson T & Veillette A (2001) Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. Nat Immunol. 2(8):681-90.

Latour S, Roncagalli R, Chen R, Bakinowski M, Shi X, Schwartzberg PL, Davidson D & Veillette A (2003) Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. Nat Cell Biol. 5(2):149-54.

Lecoeur H, Ledru E, Prévost MC & Gougeon ML (1997) Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. J Immunol Methods. 209(2):111-23.

Lemmon MA & Ferguson KM (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. Biochem J. 350 Pt 1:1-18.

Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C & Damle NK (1992) Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. J Exp Med. 176:1595-1604.

Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O & Sonenberg N (2006) mTOR translation initiation and cancer. Oncogene. 25(48):6416-22.

Mashima R, Hishida Y, Tezuka T & Yamanashi Y (2009) The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. Immunol Rev. 232(1):273-85.

Masson F, Minnich M, Olshansky M, Bilic I, Mount AM, Kallies A, Speed TP, Busslinger M, Nutt SL & Belz GT (2013) Id2-mediated inhibition of E2A represses memory CD8+ T cell differentiation. J Immunol. 190(9):4585-94.

Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, Popescu F & Xiao Z (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. Immunol Rev. 211:81-92.

Michel F, Attal-Bonnefoy G, Mangino G, Mise-Omata S & Acuto O (2001) CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signalling capabilities. Immunity. 15(6):935-45.

Miller AT & Berg LJ (2002) New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system. Curr Opin Immunol. 14(3):331-40.

Mitchell DM, Ravkov EV & Williams MA (2010) Distinct roles for IL-2 and IL-15 in the differentiation and survival of CD8+ effector and memory T cells. J Immunol. 184(12):6719-30.

Miyazaki M, Rivera RR, Miyazaki K, Lin YC, Agata Y & Murre C (2011) The opposing roles of the transcription factor E2A and its antagonist Id3 that orchestrate and enforce the naïve fate of T cells. Nat Immunol. 12(10):992-1001.

Nemorin JG & Duplay P (2000) Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. J Biol Chem. 275(19):14590-7.

Noguchi T, Matozaki T, Inagaki K, Tsuda M, Fukunaga K, Kitamura Y, Kitamura T, Shii K, Yamanashi Y & Kasuga M (1999) Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. EMBO J. 18(7):1748-60.

Okabe S, Fukuda S, Kim YJ, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, Pandolfi PP & Broxmeyer HE (2005) Stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. Blood. 105(2):474-80.

Omilusik KD, Shaw LA & Goldrath AW (2013) Remembering one's ID/E-ntity : E/ID protein regulation of T cell memory. Curr Opin Immunol. 25(5):660-6.

Parish CR, Gildden MH, Quah BJ & Warren HS (2009) Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. Curr Protoc Immunol. Chapter 4:Unit4.9.

Parish IA & Kaech SM (2009) Diversity in CD8(+) T cell differentiation. Curr Opin Immunol. 21(3):291-7.

Park C & Kupper TS (2015) The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. Nature Medecine. 21(7):688-697.

Pawson T (1995) Protein modules and signalling networks. Nature. 373(6515):573-80.

Pawson T & Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science. 278(5346):2075-80.

Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ & Rao A (2010) Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity*. 32(1):79-90.

Pollizzi KN, Patel CH, Sun IH, Oh MH, Waickman AT, Wen J, Delgoffe GM & Powell JD (2015) mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8(+) T cell differentiation. *J Clin Invest*. 125(5):2090-108.

Qiao G, Zhao Y, Li Z, Tang PQ, Langdon WY, Yang T & Zhang T (2013) T cell activation threshold regulated by E3 ubiquitin ligase Cbl-b determines fate of inducible regulatory T cells. *J Immunol*. 191(2):632-9.

Rao RR, Li Q, Odunsi K & Shrikant PA (2009) The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity*. 32(1):67-78.

Rojo JM, Bello R & Portolés P (2008) T-cell receptor. *Adv Exp Med Biol*. 640:1-11

Rutishauser RL, Martins GA, Kalachikov S, Chandele A, Parish IA, Meffre E, Jacob J Calame K & Kaech SM (2009) Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity*. 31(2):296-308.

Saito T & Yamasaki S (2003) Negative feedback Of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev*. 192:143-60.

Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M & Lanzareccia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 401(6754):708-12

Schaeffer EM, Debmah J, Yap G, McVicar D, Liao XC, Littman DR, Sher A, Varmus HE, Lenardo MJ & Schwartzberg PL (1999) Requirement of Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signalling and immunity. *Science*. 284(5414):638-41.

Schluns KS & Lefrançois L (2003) Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 3(4):269-79.

Shen Y & Nemunaitis J (2005) Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther*. 11(2):180-95.

Songyang Z, Yamanashi Y, Liu D & Baltimore D (2001) Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signalling. *J Biol Chem*. 276(4):2459-65.

Stamper CC, Zhang Y, Tobin JF, Erbe DV, Ikemizu S, Davis SJ, Stahl ML, Seehra J, Somers WS & Mosyak L (2001) Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibit human immune responses. *Nature*. 410(6828):608-11.

Stanford SM, Rapini N & Bottini N (2012) Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases : from immune homeostasis to autoimmunity. *Immunology*. 137(1):1-19.

Starr TK, Jameson SC & Hogquist LA (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 21:139-76.

Sutherland AP, Joller N, Michaud M, Liu SM, Kuchroo VK & Grusby MJ (2013) IL-21 promotes CD8+ CTL activity via the transcription factor T-bet. *J Immunol*. 190(8):3977-84.

Veillette A (2006) NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol Rev*. 214:22-34.

Vinay DS & Kwon BS (1998) Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol*. 10(6):481-9.

Wiedemann A, Müller S, Favier B, Penna D, Guiraud M, Delmas C, Champagne E & Valitutti S (2005) T-cell activation is accompanied by an ubiquitination process occurring at the immunological synapse. *Immunol Lett*. 98(1):57-61.

Williams MA & Bevan MJ (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*. 25:171-92.

Willoughby JE, Kerr JP, Rogel A, Taraban VY, Buchan SL, Johnson PW, Al-Shamkhani A (2014) Differential impact of CD27 and 4-1BB costimulation on effector and memory CD8 T cell generation following peptide immunization. *J Immunol*. 193(1):244-51.

Xu R, Johnson AJ, Liggitt D & Bevan MJ (2004) Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *J Immunol*. 172(10):6265-71.

Xu X, Ye L, Araki K & Ahmed R (2013) mTOR, linking metabolism and immunity. *Semin Immunol*. 24(6):429-35.

Yamanashi Y & Baltimore D (1997) Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell*. 88(2):205-11.

Yang CY, Best JA, Knell J, Yang E, Sheridan AD, Jesionek AK, Li HS, Rivera RR, Lind KC, D'Cruz LM, Watowich SS, Murre C & Goldrath AW (2011) The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat Immunol*. 12(12):1221-9.

Yasuda T, Bundo K, Hino A, Honda K, Inoue A, Shirakata M, Osawa M, Tamura T, Nariuchi H, Oda H, Yamamoto T & Yamanashi Y (2007) Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signalling. *Int Immunol*. 19(4):487-95.

Zhao M, Schmitz AA, Qin Y, Di Cristofano A, Pandolfi PP & Van Aelst L (2001) Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. J Exp Med. 194(3):265-74.

Zhao Y, Adams YF & Croft M (2011) Preferential replication of vaccinia virus in the ovaries is independent of immune regulation through IL-10 and TGF- β . Viral Immunol. 24(5):387-396.

Zhou MM, Harlan JE, Wade WS, Crosby S, Ravichandran KS, Burakoff SJ & Fesik SW (1995) Binding affinities of tyrosine-phosphorylated peptides to the COOH-terminal SH2 and NH2-terminal phosphotyrosine binding domains of Shc. J Biol Chem. 270(52):31119-23.

Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W & Hall MN (2011) Activation of mTORC2 by association with the ribosome. Cell. 144(5):757-68.

ANNEXE

Lettre de confirmation
de soumission pour publication

De: Pascale Duplay <duplay@hotmail.com>
Objet: TR : 16-00385-FL Manuscript Passed Initial QC
Date: 6 mai 2016 06:49:09 UTC-4
À: <constance_007@msn.com>

----- Original Message -----

Expéditeur: cdominguez@aai.org
Date: 7 mars 2016 11:28:21 UTC-5
Destinataire: pascale.duplay@iaf.inrs.ca
Cc: duplay@hotmail.com
Objet: 16-00385-FL Manuscript Passed Initial QC
Répondre à: cdominguez@aai.org

Dear Dr. Duplay:

This e-mail is to acknowledge receipt of all appropriate materials for your manuscript, titled "Dok-1 and Dok-2 regulate the formation of memory CD8+ T cells," to be considered for publication in The Journal of Immunology. Your manuscript has been assigned the manuscript identification number 16-00385-FL.

You will receive an e-mail as soon as a decision has been reached concerning the suitability of this manuscript for publication. Please forward all questions to infoji@aai.org. Please refer to the manuscript identification number in all inquiries.

Thank you for your interest in The Journal of Immunology.

Sincerely,

The Journal of Immunology staff

If you are not already an AAI member, please visit www.aai.org and fill out a membership application.