

Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier

**Rôle de Dok-1 dans l'activation et le développement
des lymphocytes T**

Par
Ingrid Saba

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

Jury d'évaluation

Président du jury et

Examineur interne

Examineur externe

Directeur de recherche

Alain Lamarre

Nathalie Labrecque

Pascale Duplay

© droits réservés de Ingrid Saba, 2005


RÉSUMÉ

Dok-1 est un des deux membres de la famille Dok (Downstream of kinase) exprimés dans les lymphocytes T. Cette protéine est phosphorylée sur tyrosine lorsque la cellule est stimulée par les récepteurs de co-stimulation CD28 ou CD2 mais non par le complexe TCR/CD3. Il a été démontré que Dok-1 est un régulateur négatif spécifique des voies de signalisation initiées par CD2. Son association avec RasGAP est un des mécanismes proposés pour expliquer son activité inhibitrice sur la voie des MAP kinases ERK1/2. La fonction de Dok-1 dans la régulation de la voie CD28 est encore inconnue. Nous avons tout d'abord caractérisé l'expression et la régulation de sa phosphorylation dans les lymphocytes matures et immatures chez la souris. Nous montrons que cette protéine est exprimée dès le stade le plus immature des thymocytes. Son expression demeure constante tout au long du développement des thymocytes.

Afin de mieux caractériser le rôle de Dok-1 dans la régulation de l'activation des lymphocytes T, nous avons généré des souris transgéniques qui surexpriment différents niveaux de Dok-1. L'expression du transgène est contrôlée par le promoteur hCD2, ce qui permet une expression dès le stade DN2 dans les thymocytes et chez les lymphocytes matures. Nous démontrons que la surexpression de Dok-1 affecte le développement des thymocytes, plus spécifiquement la transition du stade DN à DP. Le nombre de thymocytes totaux est diminué de 10 à 15 fois en fonction du niveau de surexpression du transgène. Comme attendu, le nombre de lymphocytes présents dans la rate est aussi diminué. Nous observons également une diminution du rapport $CD4^+/CD8^+$ tant au niveau du thymus que de la rate. Ces résultats suggèrent que Dok-1 pourrait jouer un rôle de régulateur négatif de la signalisation initiée par le pré-TCR mais aussi lors de la sélection et/ou de la survie des lymphocytes T $CD8^+$. Par contre, la signalisation initiée par le TCR des thymocytes au stade DP semble normale. En effet, la régulation à la hausse des marqueurs d'activation CD5 et CD69 suite à une stimulation par le TCR n'est pas affectée. De plus, le niveau d'expression du complexe TCR/CD3 dans les thymocytes DP et SP et chez les lymphocytes périphériques est normal.

Nous avons analysé l'effet fonctionnel de Dok-1 sur la prolifération des lymphocytes T et sur la sécrétion de cytokines induite suite à une stimulation par le TCR. Alors que la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ n'est pas affectée par la surexpression de Dok-1, la sécrétion de cytokines est grandement influencée. En effet, nous montrons que les lymphocytes T CD4⁺, suite à une stimulation par le TCR, produisent moins d'IL-2 mais beaucoup plus d'IFN- γ . La production d'IL-4 ne semble pas affectée sauf lors d'une stimulation des cellules par une combinaison de PMA et d'ionomycine où elle est augmentée. Les cellules T des souris transgéniques ont un phénotype de cellules mémoires puisqu'elles expriment davantage le marqueur CD44 de façon dépendante du niveau de surexpression de Dok-1. Par contre, les marqueurs, CD69 et CD25, qui sont régulés à la hausse précocement suite à la stimulation des cellules, sont exprimés normalement. Enfin, nous montrons que les défauts observés chez nos souris transgéniques, tant au niveau des fonctions que de la maturation des lymphocytes T, ne semblent pas être attribuable à une diminution de l'activation de la voie des MAP kinase ERK1/2.

En conclusion, nos résultats indiquent que Dok-1 pourrait jouer un rôle tant au niveau de la signalisation initiée par le pré-TCR que celle initiée par le TCR dans les lymphocytes immatures et matures. La caractérisation des interactions moléculaires mises en jeu par Dok-1 pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent la maturation et l'activation des lymphocytes T.



Étudiante



Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de recherche Pascale Duplay pour sa supervision, les conseils qu'elle m'a procurés tout au long de mes études, sa patience et sa compréhension... Je tiens surtout à exprimer le plaisir que ce fût de faire partie des duplayiens durant ces deux dernières années. Merci à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin à l'accomplissement de cette étape de mon cheminement tant académique que personnel.


RÉSUMÉ

Dok-1 est un des deux membres de la famille Dok (Downstream of kinase) exprimés dans les lymphocytes T. Cette protéine est phosphorylée sur tyrosine lorsque la cellule est stimulée par les récepteurs de co-stimulation CD28 ou CD2 mais non par le complexe TCR/CD3. Il a été démontré que Dok-1 est un régulateur négatif spécifique des voies de signalisation initiées par CD2. Son association avec RasGAP est un des mécanismes proposés pour expliquer son activité inhibitrice sur la voie des MAP kinases ERK1/2. La fonction de Dok-1 dans la régulation de la voie CD28 est encore inconnue. Nous avons tout d'abord caractérisé l'expression et la régulation de sa phosphorylation dans les lymphocytes matures et immatures chez la souris. Nous montrons que cette protéine est exprimée dès le stade le plus immature des thymocytes. Son expression demeure constante tout au long du développement des thymocytes.


Afin de mieux caractériser le rôle de Dok-1 dans la régulation de l'activation des lymphocytes T, nous avons généré des souris transgéniques qui surexpriment différents niveaux de Dok-1. L'expression du transgène est contrôlée par le promoteur hCD2, ce qui permet une expression dès le stade DN2 dans les thymocytes et chez les lymphocytes matures. Nous démontrons que la surexpression de Dok-1 affecte le développement des thymocytes, plus spécifiquement la transition du stade DN à DP. Le nombre de thymocytes totaux est diminué de 10 à 15 fois en fonction du niveau de surexpression du transgène. Comme attendu, le nombre de lymphocytes présents dans la rate est aussi diminué. Nous observons également une diminution du rapport $CD4^+/CD8^+$ tant au niveau du thymus que de la rate. Ces résultats suggèrent que Dok-1 pourrait jouer un rôle de régulateur négatif de la signalisation initiée par le pré-TCR mais aussi lors de la sélection et/ou de la survie des lymphocytes T $CD8^+$. Par contre, la signalisation initiée par le TCR des thymocytes au stade DP semble normale. En effet, la régulation à la hausse des marqueurs d'activation CD5 et CD69 suite à une stimulation par le TCR n'est pas affectée. De plus, le niveau d'expression du complexe TCR/CD3 dans les thymocytes DP et SP et chez les lymphocytes périphériques est normal.

Nous avons analysé l'effet fonctionnel de Dok-1 sur la prolifération des lymphocytes T et sur la sécrétion de cytokines induite suite à une stimulation par le TCR. Alors que la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ n'est pas affectée par la surexpression de Dok-1, la sécrétion de cytokines est grandement influencée. En effet, nous montrons que les lymphocytes T CD4⁺, suite à une stimulation par le TCR, produisent moins d'IL-2 mais beaucoup plus d'IFN- γ . La production d'IL-4 ne semble pas affectée sauf lors d'une stimulation des cellules par une combinaison de PMA et d'ionomycine où elle est augmentée. Les cellules T des souris transgéniques ont un phénotype de cellules mémoires puisqu'elles expriment davantage le marqueur CD44 de façon dépendante du niveau de surexpression de Dok-1. Par contre, les marqueurs, CD69 et CD25, qui sont régulés à la hausse précocement suite à la stimulation des cellules, sont exprimés normalement. Enfin, nous montrons que les défauts observés chez nos souris transgéniques, tant au niveau des fonctions que de la maturation des lymphocytes T, ne semblent pas être attribuable à une diminution de l'activation de la voie des MAP kinase ERK1/2.

En conclusion, nos résultats indiquent que Dok-1 pourrait jouer un rôle tant au niveau de la signalisation initiée par le pré-TCR que celle initiée par le TCR dans les lymphocytes immatures et matures. La caractérisation des interactions moléculaires mises en jeu par Dok-1 pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent la maturation et l'activation des lymphocytes T.



Étudiante



Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	5
1. LES LYMPHOCYTES T	5
2. ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T	6
2.1 SIGNALISATION POSITIVE	6
2.1.1 Voies d'activation initiées par le complexe TCR/CD3	6
2.1.1.1 Formation du complexe TCR/CD3	6
2.1.1.2 Signalisation via le TCR/CD3	7
2.1.1.2.1 Les PTK: p56 Lck, Syk et Zap-70	7
2.1.1.2.2 Protéines adaptatrices: LAT et SLP-76	8
2.1.1.2.3 Mobilisation du calcium	9
2.1.1.2.4 La voie MAPK Ras/Raf-1/MEK/ERK1/2	11
2.1.2 La molécule de co-stimulation CD28.....	14
2.1.2.1 Fonctions de CD28.....	14
2.1.2.2 Interaction de CD28 avec ses ligands CD80 et CD86.....	14
2.1.2.3 Zone d'interaction cellule T-CPA	16
2.1.2.5 Stimulation par CD28.....	17
2.1.2.5.1 L'activation de PTK : p56Lck et ITK/TEC	17
2.1.2.5.2 L'activation de la PI3K et de AKT.....	18
2.1.2.5.3 Phosphorylation sur tyrosine de protéines adaptatrices.....	19
2.1.3 Le récepteur CD2.....	21
2.1.4 Souris déficientes pour l'expression de CD2 et/ou de CD28.....	21
2.2 SIGNALISATION NÉGATIVE	22
2.2.1 Le récepteur CD152.....	22
3. LA FAMILLE DES PROTÉINES DOK: UN EXEMPLE DE PROTÉINES ADAPTATRICES	23
3.1 ORGANISATION STRUCTURALE DES PROTÉINES DOK.....	24
3.2 DOK-1	25
3.2.1 La protéine Dok-1 dans des systèmes cellulaires autres que les lymphocytes T.....	25
3.2.1.1 Phosphorylation de Dok-1	26
3.2.1.2 L'interaction de Dok-1 avec des régulateurs négatifs	27
3.2.1.3 Souris déficientes pour l'expression de Dok-1 ou Dok-1 et Dok-2	28
3.2.2 Caractérisation de la fonction de Dok-1 dans les lymphocytes T	30
3.3 DOK-2	32
3.4 DOK-3 À DOK-6	33

4. MATURATION DES THYMOCYTES	33
4.1 LES PRÉCURSEURS DES LYMPHOCYTES T.....	33
4.1.1 <i>Stade double négatif (DN)</i>	33
4.1.2 <i>Transition des stades double négatif (DN) / double positif (DP)</i>	34
4.1.3 <i>Transition des stades double positif (DP) / simple positif (SP)</i>	34
5. PROCESSUS DE CONTRÔLE DE LA MATURATION DES THYMOCYTES	36
5.1 LA B SÉLECTION.....	36
5.1.1 <i>RAG-1 et RAG-2</i>	36
5.1.2 <i>Importance de la chaîne TCRβ</i>	37
5.2 PROCESSUS DE CONTRÔLE DE LA SÉLECTION DU RÉPERTOIRE DES LYMPHOCYTES T.....	38
5.2.1 <i>Sélection positive et négative</i>	38
5.3 DÉVELOPPEMENT DES THYMOCYTES DP EN SP CD4 ⁺ VERSUS SP CD8 ⁺	39
5.3.1 <i>Modèles stochastique/sélectif</i>	39
5.3.2 <i>Modèle instructif</i>	40
5.3.2.1 <i>Modèle instructif quantitatif</i>	40
5.3.2.2 <i>Modèle instructif de la durée du signal</i>	41
5.3.3 <i>Modèle cinétique</i>	41
5.4 MOLÉCULES QUI INFLUENCENT LE DÉVELOPPEMENT DES THYMOCYTES.....	42
5.4.1 <i>Rôle des cytokines</i>	42
5.4.2 <i>Notch</i>	44
5.5 VOIES DE SIGNALISATION IMPORTANTES POUR LE DÉVELOPPEMENT DES THYMOCYTES.....	44
ARTICLE	47
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	49
ABSTRACT.....	53
INTRODUCTION.....	55
MATERIALS AND METHODS.....	57
RESULTS.....	61
DISCUSSION.....	65
ACKNOWLEDGMENTS.....	69
FOOTNOTES.....	70
REFERENCES.....	71
FIGURES AND FIGURE LEGENDS.....	77
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	107
DISCUSSION	115
RÉFÉRENCES	127
ANNEXE A	141

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableau I: Principales caractéristiques des différents types de lymphocytes	5
Figure A: Régulation de l'activation de p56 Lck, une PTK de la famille Src, par la PTPase CD45 et la PTK Csk	8
Figure B: Signalisation via le complexe TCR/CD3 qui mène à l'activation de PLC- γ lors de l'activation des lymphocytes T	10
Figure C: Activation de la voie Ras/Raf-1/Mek/ERK1/2 suite à la stimulation du TCR.....	13
Figure D: Signalisation initiée par le récepteur CD28	20
Figure E: Organisation structurale de la protéine Dok-1.	25
Figure F: Représentation schématique des stades de développement des thymocytes.....	35
Figure 1: Dok-1 expression levels in thymocytes and splenocytes.....	77
Figure 2: Levels of transgene expression in the thymus and in the spleen..	79
Figure 3: Dok-1 overexpression inhibits thymocyte development	81
Figure 4: Regulation of surface expression of CD3, CD69 and CD5 in Dok-1 transgenic thymocytes is normal.....	85
Figure 5: Effects of Dok-1 transgenic expression on CD4/CD8 ratios of splenic cells.....	91
Figure 6: Normal TCR-dependent upregulation of CD69 and proliferation of splenic T cells in mice overexpressing Dok-1	93
Figure 7: Dok-1 overexpression interferes with cytokine secretion	97

Figure 8: Levels of expression of Dok-1 influence the memory status of T cells in the spleen..	99
Figure 9: CD28-induced phosphorylation of Dok-1 in splenic T cells	101
Figure 10: Overexpression of Dok-1 in thymocytes and mature T cells does not inhibit CD3- or CD28-induced ERK1/2 phosphorylation	103
Figure 11: La différenciation des thymocytes DP en SP CD8 ⁺ est privilégiée chez les souris Dok-1 transgéniques..	109

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AP-1	Activating Protein-1
ARN	Acide Ribonucléique
BCR	B Cell Receptor
CD	Cluster Of Differentiation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CSK	C-terminal Src Kinase
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DAG	Diacylglycérol
DOK	Downstream Of Tyrosine Kinase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FcXR	Portion Fc X receptor
GADs	Grb2-related Adaptor Downstream of Shc
GEM	Glycolipid-Enriched-Membrane-Micordomains
GM-CSF	Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor
GRB2	Growth Receptor Binding protein 2
IFN	Interféron
IG	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
ITAM	Immuno-Tyrosine based Activation Motif
JNK	c-JUN N-terminal Kinase
LFA	Lymphocyte Function Associated
NCK	Novel Src homology 2/3 Containing adaptor protein
NFAT	Nuclear Factor for Activated T cells
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NK	Natural Killer cell
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase

PKC	Protéine Kinase C
PLC γ -1	Phospholipase C gamma-1
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
PTPase	Protéine Tyrosine Phosphatase
RasGAP	Ras GTPase Activating Protein
SHC	Src Homologus and Collagen
SHIP	Src Homology 2 domain Inositol Phosphatase
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SLP-76	Src homology 2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa
TCR	T Cell Receptor
T _H	T helper cell

INTRODUCTION

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans la régulation de la réponse immunitaire. Les cellules T expriment à leur surface des récepteurs de cellules T (TCR). Ces récepteurs sont générés par le réarrangement des loci $\alpha \beta$ ou $\gamma \delta$. Il s'agit d'un processus aléatoire qui génère des lymphocytes T avec des TCR très diversifiés capables de reconnaître une multitude de peptides antigéniques différents. Les peptides sont présentés au lymphocyte T par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Les co-récepteurs CD4 et CD8, également exprimés à la surface des lymphocytes T, participent à la stabilisation de l'interaction du TCR avec le complexe peptide/CMH (van der Merwe et Davis., 2003). L'éducation des cellules T dans le thymus génère des lymphocytes T matures, fonctionnels, non autoréactifs et avec la bonne restriction aux molécules de CMH (Kappler *et al.*, 1987). Ces cellules sont ensuite capables d'engendrer une réponse immune adéquate à la stimulation reçue.

La spécificité, l'intensité et la durée de la réponse T sont engendrées par une cascade de signaux intracellulaires initiée non seulement par le TCR suite à son interaction avec le complexe peptide/CMH mais aussi par la liaison de molécules de co-stimulation telles que CD28 ou CD2 à leurs ligands (Alberola-Ila *et al.*, 1997). La cellule possède des régulateurs positifs et négatifs qui contrôlent le seuil minimal d'activation ainsi que la durée et l'amplitude de la réponse. Les régulateurs d'activation cellulaire peuvent être des kinases, des phosphatases ou des protéines adaptatrices.

Les molécules adaptatrices jouent un rôle essentiel dans l'intégration des signaux issus du TCR et de ceux issus d'autres récepteurs de co-stimulation comme CD28 ou CD2. Les protéines Dok (Downstream Of Kinase) font partie de cette famille de molécules dites adaptatrices. Elles présentent plusieurs domaines ou motifs qui, par le biais d'interactions de type «protéine-protéine» ou «protéine-lipides», leur permettent de transférer un signal initié par un récepteur vers des mécanismes effecteurs (Veillette, 2004). Deux membres de cette famille, Dok-1 et Dok-2, sont

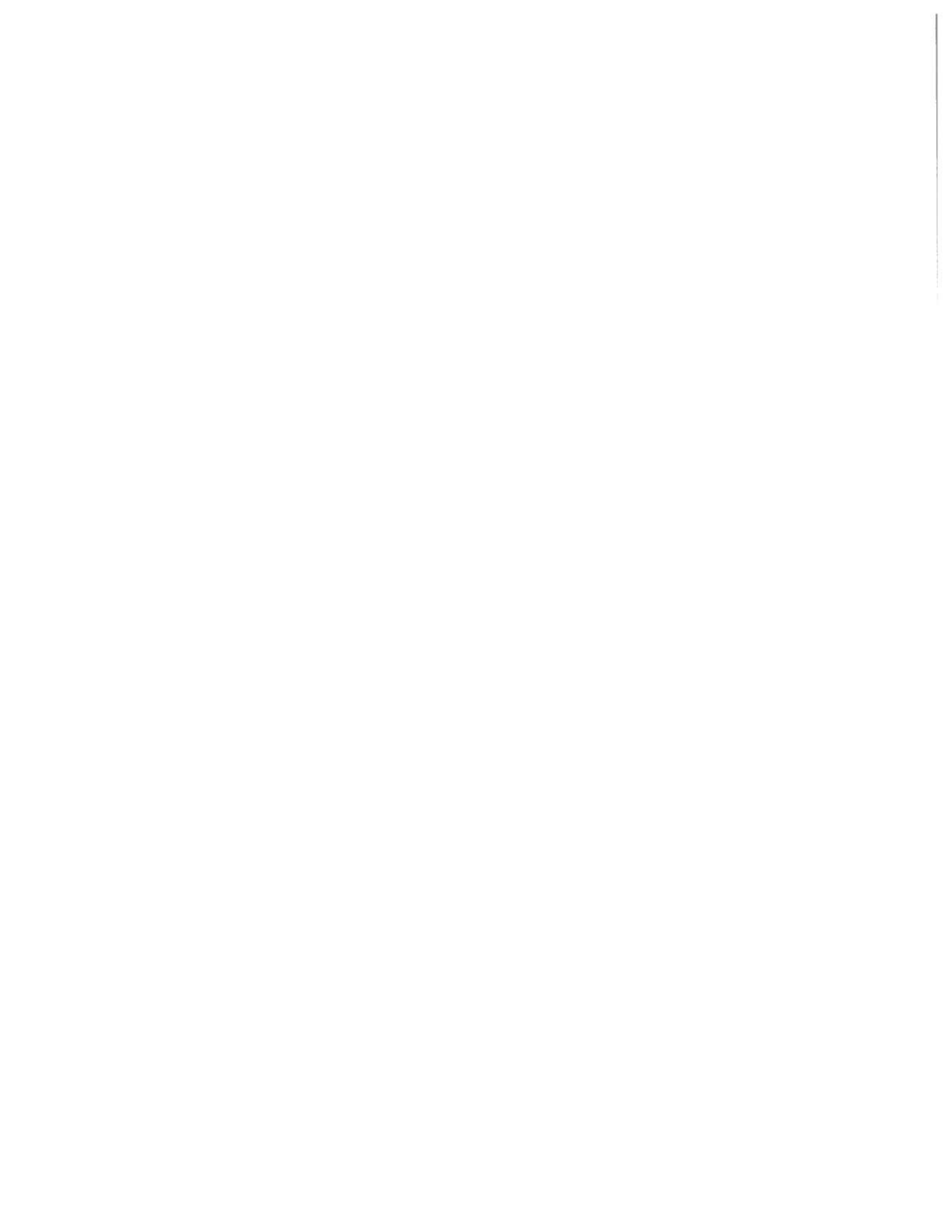
exprimés par les lymphocytes T. La contribution des protéines Dok dans la régulation de la signalisation intracellulaire des cellules T est très peu connue.

Nous savons que Dok-1 est phosphorylé lorsque les lymphocytes T sont stimulés par les récepteurs CD28 ou CD2 et non via le complexe TCR/CD3 (Michel *et al.*, 2001). Dok-1 semble être un régulateur négatif de la voie CD2 chez les lymphomes Jurkat T (Nemorin *et al.*, 2001). Son association avec RasGAP est un des mécanismes proposés pour expliquer son activité inhibitrice sur la voie des MAP kinases ERK1/2. Dok-1 est un substrat spécifique de la voie d'activation CD28. Cependant, son rôle dans la régulation de cette voie d'activation est encore inconnu. L'ensemble des résultats énoncés ci haut et étant donné que les récepteurs CD2 et CD28 sont impliqués dans la maturation et l'activation des lymphocytes T, nous supposons que Dok-1 est un modulateur important de la réponse T. L'effet inhibiteur de Dok-1 pourrait jouer un rôle important en terminant ou en empêchant des signaux d'activation inappropriés initiés suite à l'engagement du TCR. Alternativement, la signalisation engendrée par Dok-1 pourrait intervenir pour empêcher l'activation polyclonale non spécifique via CD2 ou CD28. Pour tester ces hypothèses, nous avons généré des souris transgéniques qui surexpriment différents niveaux de la protéine Dok-1 humaine. L'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur CD2 humain (hCD2) ce qui permet l'expression de la protéine dans les lymphocytes T immatures et matures. Avec cet outil, nous pouvons, d'une part, étudier le rôle *in vivo* de Dok-1 dans le développement et dans les fonctions du lymphocyte T. D'autre part, nous disposons ainsi d'une source de cellules T primaires qui surexpriment la protéine Dok-1 nous permettant de réaliser *in vitro* des études biochimiques et fonctionnelles dans un contexte plus physiologique que celles effectuées sur des lignées cellulaires.

En premier lieu, l'expression de Dok-1 endogène a été évaluée au niveau des différentes sous-populations des cellules T dans le thymus et la rate des souris de type sauvage. Ces différentes sous-populations se distinguent par cytométrie en flux en analysant l'expression de molécules de surface telles que les co-récepteurs CD4 et CD8. La cellularité des organes lymphoïdes (thymus et rate) de souris transgéniques et de type sauvage, a aussi été vérifiée. Chez les souris transgéniques qui surexpriment Dok-1, nous observons une réduction de la cellularité et une inhibition de la maturation des thymocytes. Cela suggère que la protéine Dok-1 joue un rôle dans la

régulation des signaux de survie des thymocytes en développement. Son rôle dans l'étape précise de l'inhibition de la maturation des cellules T a également été caractérisé par cytométrie en flux. Des tests de prolifération cellulaire et de sécrétion de cytokines ont permis d'évaluer l'impact de Dok-1 sur l'activation des lymphocytes T. Par ailleurs, des tests biochimiques nous ont permis de préciser les mécanismes par lesquels la protéine Dok-1 exerce ses fonctions.

La stimulation par CD28 joue un rôle dans la prolifération et l'activation des lymphocytes T, cellules considérées comme le chef d'orchestre de la réponse immunitaire. Nos études tentent donc d'élucider l'impact de la voie de signalisation impliquant Dok-1 et induite par CD28 sur l'expansion/sélection des thymocytes ainsi que sur la fonction des lymphocytes T matures.



REVUE DE LITTÉRATURE

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Les lymphocytes T

Les cellules T immatures, ou thymocytes, se différencient dans le thymus où elles acquièrent l'expression du TCR. Les lymphocytes T peuvent être séparés en deux sous-groupes selon l'expression des chaînes qui forment leur TCR. Environ 95 % des lymphocytes T du sang et des tissus lymphoïdes chez l'humain et chez la souris expriment un TCR composé des chaînes α et/ou β . Une petite partie des lymphocytes T (1 à 5 %) exprime un autre isoforme de TCR constitué des chaînes γ et δ . Les lymphocytes TCR $\gamma\delta$ se trouvent majoritairement (plus de 50 % des cellules T) dans les tissus épithéliaux notamment dans la peau, les intestins et le système reproducteur (Carding et Egan, 2002) (voir tableau I).

Tableau I: Principales caractéristiques des différents types de lymphocytes

CARACTÉRISTIQUES	<i>LYMPHOCYTES T, TCR$\alpha\beta$</i>	<i>LYMPHOCYTES T, TCR $\gamma\delta$</i>	<i>LYMPHOCYTES B</i>
Complexe reconnaissant l'antigène	TCR $\alpha\beta$ + complexe CD3	TCR $\gamma\delta$ + complexe CD3	BCR (Ig)
Antigène reconnu / restriction CMH	Peptide / CMH I ou II selon co-récepteur exprimé	D'origine protéique ou autre / rare	D'origine protéique ou autre / aucune
Phénotype	CD4 ⁺ ou CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD19 ⁺ CD20 ⁺
Fréquence dans le sang	65-75 %	1-5 %	5-10 %
Fonctions effectrices	CD4 ⁺ : T _H CD8 ⁺ : CTL Production de cytokines (T _H 1/T _H 2)	CTL Production de cytokines (T _H 1 > T _H 2)	Production d'Ig
Fonctions immunitaires	Réponse cellulaire	Régulatrices / immuno-surveillance	Réponse humorale

Adapté de Carding, S.R., Egan, P.J, *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 336-345

2. Activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T reçoivent plusieurs signaux lors de leur rencontre avec une CPA. Le premier signal est généré par le complexe TCR/CD3 mais d'autres signaux sont fournis par des récepteurs de co-stimulation comme CD2, CD28 ou par d'autres molécules telles que la molécule d'adhésion CD11a/CD18 (LFA-1) ou la molécule CD5.

Pour activer les gènes responsables de l'induction des réponses effectrices du lymphocyte T, la cellule requiert un second signal émis par les CPA dites professionnels qui renforce le premier signal de reconnaissance TCR-peptide / CMH. CD28, récepteur à la surface des lymphocytes T, agit comme co-stimulateur et aide à l'activation des lymphocytes T naïfs (Bluestone, 1995). Les études réalisées à ce sujet montrent qu'en bloquant l'interaction de CD28 avec ses ligands (CD80 ou CD86), les lymphocytes T ne sont pas activés et la cellule peut entrer en état d'anergie. La stimulation du TCR et des récepteurs de co-stimulation CD2 ou CD28 initie une cascade de signalisation intracellulaire avec des substrats communs et uniques à chacune des voies. En effet, la protéine adaptatrice Dok-1, en est un exemple. Cette protéine est phosphorylée sur résidus tyrosine lorsque les lymphocytes T sont stimulés par CD28 ou CD2 et non via le complexe TCR/CD3 (Michel *et al.*, 2001).

2.1 Signalisation positive

2.1.1 Voies d'activation initiées par le complexe TCR/CD3

2.1.1.1 Formation du complexe TCR/CD3

Les chaînes α et β du TCR à la surface des lymphocytes T reconnaissent un peptide antigénique présenté par une molécule de CMH mais ne transmettent aucun message à l'intérieur de la cellule. Les chaînes α et β du TCR forment un complexe en s'associant avec les chaînes non-polymorphes γ , δ , ϵ de la molécule CD3 et avec l'homodimère $\zeta\zeta$ du TCR chez l'humain et chez la souris ou avec l'hétérodimère $\zeta\eta$

du TCR chez la souris. Selon le modèle de la formation du complexe TCR/CD3, chaque chaîne α et chaque chaîne β du TCR s'associent avec un dimère $\delta\epsilon$, un dimère $\gamma\epsilon$ et un homodimère $\zeta\zeta$ ou un plus rarement avec l'hétérodimère $\zeta\eta$ (de la Hera *et al.*, 1991). La portion cytoplasmique de ces chaînes contient des motifs qui se nomment ITAM pour Immunoreceptor-based Tyrosine Activation Motif renfermant une séquence consensus YxxI/L x₍₆₋₈₎YxxI/L où Y est une tyrosine, I est une isoleucine, L une leucine et x n'importe quel acide aminé (Reth, 1989). En tout chaque TCR contient 10 motifs ITAM qui sont responsables du déclenchement de la cascade de signaux intracellulaires qui mènent à l'activation des lymphocytes T (Ashwell et Klusner, 1990).

2.1.1.2 Signalisation via le TCR/CD3

2.1.1.2.1 Les PTK: p56 Lck, Syk et Zap-70

La cascade intracellulaire initiée par le complexe TCR/CD3 débute lorsque p56Lck, une protéine tyrosine kinase (PTK) de la famille Src, phosphoryle les motifs ITAM des chaînes cytoplasmiques du complexe TCR/CD3. La kinase p56Lck est associée au domaine cytoplasmique des co-récepteurs CD4 et/ou CD8. Ces co-récepteurs contribuent à la stabilisation de l'interaction du TCR avec le complexe peptide/CMH puisqu'ils interagissent directement avec une portion de la molécule CMH. CD4 et CD8 participent également au recrutement de p56Lck à proximité de la zone de contact cellule T-CPA (Veillette, 2004).

L'activation de p56Lck est régulée par CD45 et CSK (figure A). CD45, une protéine tyrosine phosphatase (PTP) exprimée à la surface des lymphocytes T, est responsable de déphosphoryler la tyrosine 505 en C-terminal de p56Lck. La déphosphorylation de cette tyrosine inhibitrice de p56Lck permet à la protéine d'adopter une conformation active. De ce fait, une fois recrutée dans la zone d'interaction cellule T-CPA, la PTK p56Lck peut accomplir ses fonctions effectrices dans la cascade de signalisation intracellulaire lors de l'activation des lymphocytes T (Alexander., 2000). À l'encontre de CD45, la PTK Csk phosphoryle la tyrosine inhibitrice forçant Lck à adopter une conformation inactive (Davidson *et al.*, 2003).

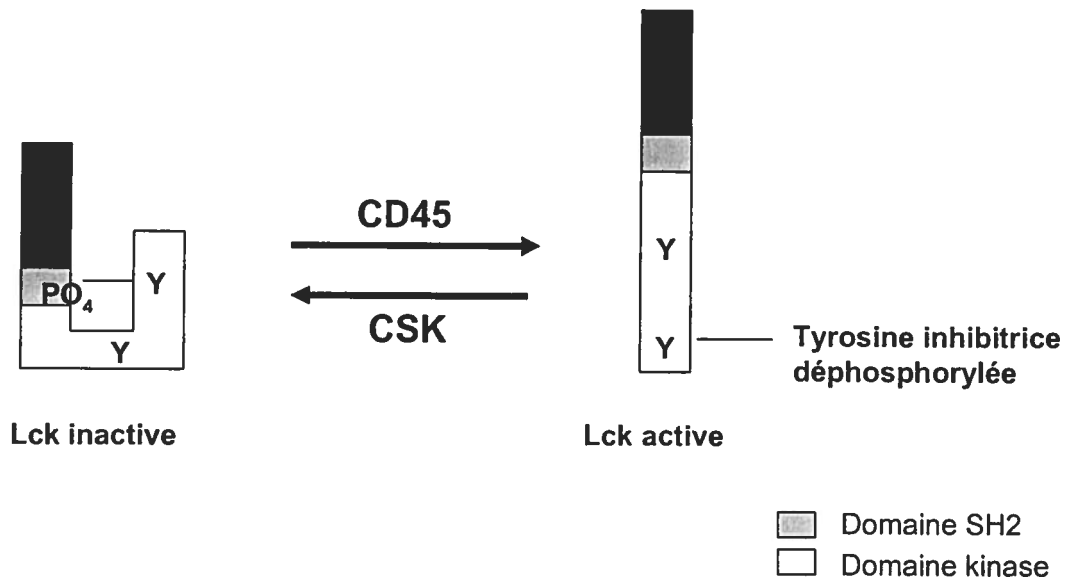


Figure A: Régulation de l'activation de p56 Lck, une PTK de la famille Src, par la PTPase CD45 et la PTK Csk. La tyrosine phosphatase (PTP) CD45 est responsable de déphosphoryler la tyrosine 505 en C-terminal de p56Lck. La déphosphorylation de cette tyrosine inhibitrice de p56Lck permet à la protéine d'adopter une conformation active. À l'encontre de CD45, la PTK Csk phosphoryle la tyrosine inhibitrice forçant Lck à adopter une conformation inactive.

La forme active de la protéine kinase p56Lck, associée aux queues cytoplasmiques de CD4 ou de CD8, phosphoryle les motifs ITAM des chaînes γ , δ , ϵ de la molécule CD3 et des sous-unités ζ du TCR qui, à leur tour, recrutent et activent les tyrosine kinases Syk et Zap-70, la zeta (ζ)-associated protein (Cantrell, 1996). Ces kinases phosphorylent ensuite d'autres protéines comme LAT (Linker for Activation of T cells) qui transmettent le signal jusqu'au point effecteur de la cellule.

2.1.1.2.2 Protéines adaptatrices: LAT et SLP-76

Brièvement, LAT est une molécule adaptatrice transmembranaire qui joue un rôle clé dans la coordination de la signalisation initiée par l'activation des

lymphocytes T (Zhang et Samelson, 2000). La phosphorylation de LAT lui permet de participer à la formation de complexes multiprotéiques, entre autre avec SLP-76 (SH2 domain containing Leukocyte Protein of 76 kDa). Par conséquent, SLP-76 est recruté à la membrane via LAT et s'associe à la protéine GADs (Grb2-related Adaptor Downstream of Shc). Le complexe SLP-76/GADs mène à l'activation de la PLC γ -1 (PhosphoLipase C γ -1) et de p21Ras (Paz *et al.*, 2001). La voie p21Ras constitue une des voies d'activation des MAPK (Mitogen Associated Protein Kinases) et sera détaillée dans la section 2.1.1.2.4. L'activation des protéines ERK (Extracellular signal-Regulated protein Kinase), JNK (c-JUN N-terminal Kinase) et p38 constituent les trois voies d'activation des MAPK. Ces kinases sont activées suite à leur phosphorylation sur des résidus sérine/thréonine et tyrosine contenus dans une séquence d'acides aminés bien particulière (Alberola-Ila *et al.*, 1997).

2.1.1.2.3 Mobilisation du calcium

La mobilisation de calcium engendrée par la phosphorylation de la phospholipase C- γ 1 fait partie des événements biochimiques importants suite à l'activation des lymphocytes T. Cette phospholipase est recrutée à la membrane via son interaction avec la protéine transmembranaire LAT. PLC- γ 1 est responsable de l'hydrolyse des lipides membranaires tels que le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂), ce qui génère du inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG). L'IP₃ se fixe sur des récepteurs à la surface du réticulum endoplasmique et permet le relargage de calcium des réservoirs (Berridge, 1993) (Figure B). Cette augmentation du flux de calcium intracellulaire permet l'activation de la calcineurine, une sérine phosphatase calcium / calmoduline-dépendante qui participe à la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor for Activated T cells) et son entrée dans le noyau (Crabtree et Clipstone, 1994). Une fois dans le noyau, NFAT forme un complexe avec le facteur de transcription AP-1 (Activating Protein-1). Les facteurs NFAT et AP-1 (composé des facteurs Fos/Jun) se lient à leurs sites respectifs sur le promoteur du gène de l'IL-2 et stimulent sa transcription (Woodrow *et al.*, 1993).

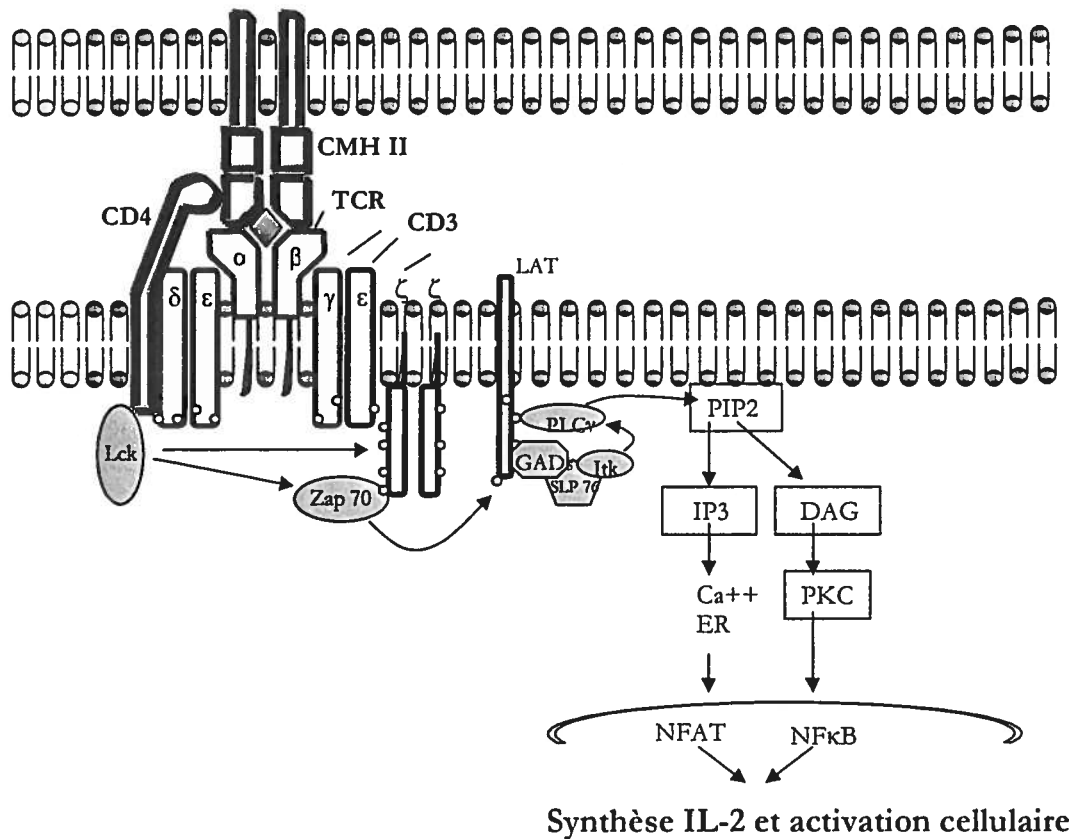


Figure B: Signalisation via le complexe TCR/CD3 qui mène à l'activation de PLC- γ lors de l'activation des lymphocytes T. Lorsqu'un TCR et les co-récepteurs CD4 ou CD8 s'engagent avec une molécule de CMH présentant un peptide étranger, le complexe CD3 transduit trois types de signaux activateurs pour stimuler les lymphocytes : (1) la phosphorylation de protéines membranaires et cytoplasmiques, (2) l'hydrolyse de phospholipides inositol de la membrane plasmique, et (3) l'augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique. Tous ces signaux vont permettre la transcription de gènes qui peuvent induire la prolifération, la différenciation, l'activation, l'apoptose ou l'anergie.

2.1.1.2.4 La voie MAPK Ras/Raf-1/MEK/ERK1/2

L'hydrolyse des PIP₂ génère non seulement de l'IP₃ mais aussi du diacylglycérol. Le DAG active les sérine/thréonine kinases de la famille des protéines kinases C (PKC) (Szamel et Resch, 1995). PKC est impliquée dans plusieurs voies de signalisation dont la voie de NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), mais son rôle dans l'activation de la voie p21Ras demeure controversé (Izquierdo *et al.*, 1994). Le mécanisme d'activation de la voie p21Ras n'est pas entièrement connu. Les petites protéines G comme p21Ras, Rho et Rac semblent initier la cascade de signalisation menant à l'activation des MAPK, soit p21Ras pour la voie ERK1/2 et Rho/Rac pour la voie p38 et JNK (Alberola-Ila *et al.*, 1997). Ces petites protéines G sont activées par divers stimuli ou par une situation de stress. La superfamille Ras est composée d'un groupe de petites protéines G impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et l'organisation du cytosquelette.

Lors de l'activation du TCR, la molécule adaptatrice Shc (Src Homologus and Collagen) est recrutée aux ITAM des sous-unités ζ du TCR et semble former un complexe ζ /Shc/Grb2. La protéine adaptatrice Grb2 serait responsable du recrutement de SOS (Son Of Sevenless) à la membrane (Koretzky, 1997). Par ailleurs, tel que mentionné précédemment, la protéine GADs est également recrutée à la membrane par l'intermédiaire de LAT. GADs et SOS sont des facteurs capables d'échanger les guanines ou GEF (Guanine Exchange Factor). Ces GEF régulent positivement l'activation de p21Ras. En effet, sous l'action du complexe Grb2/SOS, la forme Ras-GDP est changée pour du Ras-GTP, la forme active de p21Ras (Egan *et al.*, 1993). Ras-GTP active la kinase Raf-1 qui active MEK et ERK1/2, une voie de signalisation où ERK1 et ERK2 sont transloqués dans le noyau et phosphorylent directement des facteurs de transcription comme Fos et Jun (Graves *et al.*, 1995). Par ailleurs, RasGRP (Ras Guanyl nucleotide-Releasing Protein) est une autre molécule à activité GEF qui est exprimée par les lymphocytes T et qui régule positivement l'activation de p21Ras. RasGRP possède un domaine de liaison de type DAG C1 qui lui permet d'interagir avec le diacylglycerol (DAG) généré lors de l'hydrolyse des lipides membranaires. De

ce fait RasGRP est localisée à la membrane à proximité de p21Ras sur laquelle elle exerce une régulation positive (Dower *et al.*, 2000; Roose et Weiss, 2000). Enfin, la protéine p120RasGAP à activité GTPase (Ras GTPase Activating protein) agit à l'inverse des GEF et régule à la baisse l'activation de Ras en favorisant l'accumulation de sa forme liée au GDP (Ras-GDP) suite à la stimulation du TCR. L'activation de p120RasGAP représente un des moyens qu'utilise la cellule afin de réguler à la baisse l'activation de la voie p21Ras (Figure C).

La voie d'activation de p21Ras et la mobilisation du calcium sont parmi les événements biochimiques les plus importants à être déclenchés lors de l'activation cellulaire via le complexe TCR/CD3. Ces deux voies de signalisation agissent en synergie afin d'activer les facteurs responsables de l'induction de la réponse T.

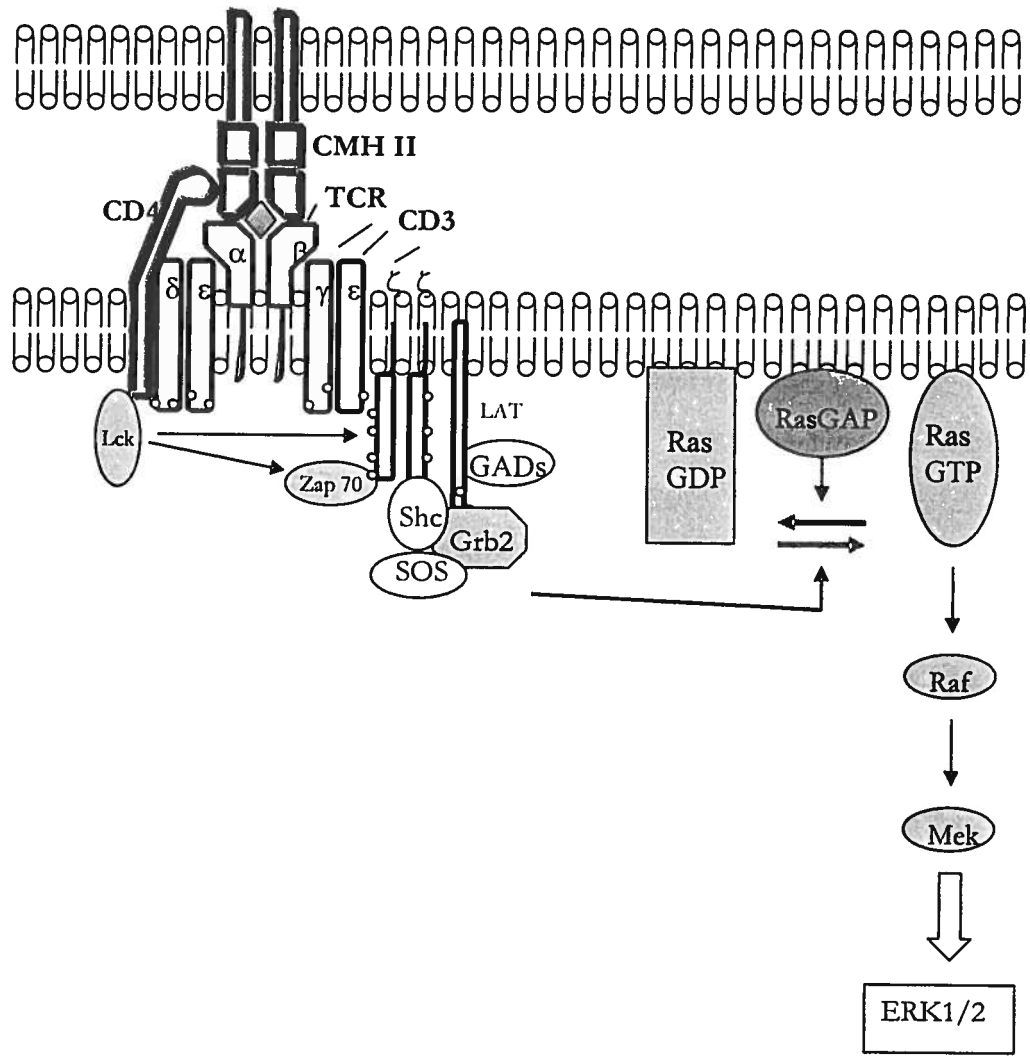


Figure C: Activation de la voie Ras/Raf-1/Mek/ERK1/2 suite à la stimulation du TCR. La protéine LAT coordonne la formation de complexes protéiques permettant d'activer, entre autre, la voie p21Ras. Les petites protéines G telle que p21Ras possède deux formes : la forme active, liée au GTP et la forme inactive, liée au GDP. La dissociation du GDP de la forme inactive et l'association du GTP à la forme active de Ras sont accélérées par les protéines GEF. À l'inverse, Ras-GTP est convertie en Ras-GDP grâce à l'action GTPasique des GAP. Ras-GTP interagit avec son substrat Raf-1 et mène à l'activation des MAPK ERK1/2.

2.1.2 La molécule de co-stimulation CD28

2.1.2.1 Fonctions de CD28

Afin d'activer les gènes responsables de l'induction des réponses effectrices du lymphocyte T, la cellule requiert un second signal émis par CD28 qui renforce le premier signal de reconnaissance TCR-peptide/CMH. En effet, CD28 diminue le seuil minimal requis pour l'activation des lymphocytes T. CD28 agit en synergie avec les signaux initiés par le TCR afin d'activer des facteurs de transcription comme NF- κ B ou NFAT (Kane *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2000). CD28 augmente aussi la durée de la réponse cellulaire par la régulation positive de l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xL (Boise *et al.*, 1995). Ce récepteur joue également un rôle clé dans l'augmentation de la sécrétion de cytokines comme l'IL-2, l'IL-4 et l'IFN- γ (McAdam *et al.*, 1998).

La fonction biologique de la molécule CD28 est bien connue mais la nature des signaux intracellulaires engendrés par une stimulation CD28 demeure inconnue. Les études réalisées à ce sujet montrent qu'en bloquant la stimulation par CD28, les lymphocytes T entrent en état d'anergie. L'anergie se définit comme un état où un lymphocyte T devient réfractaire à une re-stimulation antigénique (Lechler *et al.*, 2001). Lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît un antigène par son TCR en absence de signaux de co-stimulation induits par CD28, ce lymphocyte peut entrer en état d'anergie. Les lymphocytes anergisés deviennent alors incapables de produire de l'IL-2 et sont réfractaires à toute restimulation par le même antigène ; et ce même si le signal engendré par CD28 est présent. Ce phénomène assure la tolérance des lymphocytes T aux antigènes du soi (Schwartz, 2003).

2.1.2.2 Interaction de CD28 avec ses ligands CD80 et CD86

CD28, CD152 ou CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4), ICOS (Inducible T cell Co-Stimulator) et PD-1 (Programmed Death gene-1) font tous partie d'une même famille de protéines et partagent certaines caractéristiques structurales

(Lenschow *et al.*, 1996). CD28 est un récepteur membranaire homodimérique de 44 kDa constitutivement exprimé à la surface des lymphocytes T. Son ligand CD86 (ou B7-2) est constitutivement exprimé en faible quantité à la surface des CPA, tandis que l'expression de son autre ligand CD80 (ou B7-1) est absente. Lorsqu'un lymphocyte T interagit avec une CPA, le rapprochement des membranes cytoplasmiques des deux cellules permet à CD28 de rencontrer son ligand. L'expression de CD28 et de CD86 est alors régulée à la hausse. Après la première activation, l'expression du ligand CD80 est, à son tour, régulée à la hausse. CD28 interagit plus fréquemment avec son ligand CD86 comparativement à CD80 (Acuto et Michel, 2003).

La fonction d'activateur positif de CD28 a été démontrée en étudiant la réponse immunitaire des cellules T provenant de souris déficientes pour l'expression du récepteur CD28 (Lucas *et al.*, 1995) ou en traitant des souris normales avec CTLA4-Ig (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Immunoglobulin). CTLA4-Ig est une protéine recombinante résultant de la fusion entre le domaine extracellulaire du récepteur CD152 ou CTLA-4 et de la partie constante (Fc) d'une IgG. Le blocage de l'interaction CD28-CD80/CD86 peut s'effectuer à l'aide de CTLA4-Ig. Mis à part l'induction de l'état d'anergie des cellules T en absence d'une stimulation par CD28, différentes études ont illustré qu'en absence de co-stimulation, la formation des centres germinatifs (zones formées de cellules en prolifération rapide) est diminuée, la permutation de classe des immunoglobulines est inhibée et la différenciation des cellules T CD4⁺ en lymphocytes T auxiliaires (T helper ou T_H), cellules qui participent à la coordination de la réponse T et de la réponse immune, est affectée. Une des conséquences de l'altération de la réponse T en absence de co-stimulation est la diminution de la sécrétion de cytokines de type T_H2 (Acuto et Michel, 2003). Brièvement, l'activation des lymphocytes T CD4⁺ leur permet de se différencier en 2 sous-groupes distincts de cellules T: les T_H1 ou les T_H2 selon les cytokines qu'ils sécrètent. En effet, les cytokines IL-4, IL-5, IL-6, et IL-10 sont sécrétées par des cellules T auxiliaires de type T_H2; tandis que les cellules qui produisent principalement les cytokines IFN- γ , TNF α et β sont classées T_H1 (Openshaw *et al.*, 1995). Ce sont les lymphocytes T CD4⁺ de type T_H2 qui participent à l'augmentation de l'activation des lymphocytes B afin qu'ils sécrètent des anticorps. Les cellules T_H1 sont plutôt impliquées dans la réponse inflammatoire, plus particulièrement dans le recrutement de diverses cellules aux sites d'inflammation.

Des implications thérapeutiques importantes pourraient découler de l'inhibition du signal co-stimulateur enclenché par CD28. Par exemple, cela pourrait prévenir l'induction de réponses pathogéniques des lymphocytes T dans le cas particulier de maladies auto-immunes et moduler à la baisse la réponse T afin d'augmenter les capacités du système à accepter les allogreffes (Salomon et Bluestone, 2001).

La seule étude qui suggère que CD28 peut être un régulateur négatif a été effectuée par Vacchio et ses collaborateurs. CD28 joue possiblement un rôle de régulateur négatif de la différenciation des thymocytes. En bloquant l'interaction CD28-CD80/CD86, la sélection positive des thymocytes double positifs CD4⁺CD8⁺ en thymocytes simples positifs CD4⁺ ou CD8⁺ est augmentée (Vacchio *et al.*, 2005).

En résumé, CD28 est une molécule de co-stimulation qui, à elle seule, ne peut activer le lymphocyte T. Cependant son apport est indispensable pour l'activation induite par le TCR lors de sa rencontre avec un antigène. CD28 est donc un récepteur qui agit soit en synergie avec l'activation induite par le TCR afin de conduire à une réponse immune. CD28 constitue un mécanisme périphérique de surveillance qui complète la sélection positive et négative des cellules T dans le thymus. En effet, en absence de signalisation adéquatement induite par l'activation de CD28, l'état d'anergie du lymphocyte T l'empêche de s'activer de manière inappropriée.

2.1.2.3 Zone d'interaction cellule T-CPA

Les molécules impliquées dans l'initiation de l'activation des lymphocytes T se retrouvent pour la plupart dans les GEM (Glycolipid Enriched-membrane Micordomains), connus aussi comme des microdomaines d'îlots lipidiques ou RAFT. L'interaction CD28-CD80/CD86 ou du TCR-peptide/CMH permet aux récepteurs CD28 et TCR d'être relocalisés dans les GEM. Par ailleurs, lors de l'interaction cellule T-CPA, la réorganisation macromoléculaire de plusieurs récepteurs donne lieu à la formation de la synapse immunologique. La relocalisation du complexe TCR/CD3 et de CD28 dans la région centrale cSMAC (central SupraMolecular Activation Cluster) de la synapse permettrait d'amplifier les signaux émis par ces deux récepteurs

d'activation et ainsi générer une meilleure réponse cellulaire (Grakoui *et al.*, 1999; Viola *et al.*, 1999).

La formation de la synapse est en grande partie régulée par la réorganisation du cytosquelette (Machesky et Insall, 1999). CD28 participe à ce processus en induisant le réarrangement d'actine dans la zone de contact cellule T-CPA. En effet, CD28 active Vav-1 (un facteur échangeur de guanine) qui s'associe à SLP-76. Les conditions de co-stimulation augmentent la formation du complexe Vav-1/SLP-76. Ce complexe active les petites protéines G Rac et Cdc42 qui jouent directement un rôle de régulateur positif de la polymérisation d'actine. Les souris déficientes pour l'expression de Vav-1 ont des problèmes majeurs au niveau du développement des thymocytes. Les quelques thymocytes qui mûrissent chez ces souris ont des capacités réduites à réarranger leur cytosquelette ainsi qu'à former la zone de contact cellule T-CPA (Penninger et Crabtree, 1999).

2.1.2.5 Stimulation par CD28

2.1.2.5.1 L'activation de PTK : p56Lck et ITK/TEC

La portion cytoplasmique du récepteur CD28 ne possède aucune activité enzymatique intrinsèque et nécessite le recrutement de protéines à la membrane pour acheminer le signal jusqu'au point effecteur de la cellule. L'interaction CD28-CD80/CD86 induit la phosphorylation sur tyrosine du résidu compris dans un motif bien particulier, YMNM, dans la portion cytoplasmique de CD28 (Prasad *et al.*, 1994). Cette phosphorylation favorise l'interaction de la queue cytoplasmique de CD28 avec des PTK comme TEC, ITK (IL-2 inducible T cell kinase), p56Lck et Fyn ainsi que la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) (Appleman et Boussiotis, 2003).

Les kinases qui se chargent de phosphoryler la portion cytoplasmique de CD28 ne sont pas encore identifiées. Cependant, Raab et Cai (Raab *et al.*, 1995) ont démontré que les deux PTK de la famille Src, p56Lck et Fyn, et non les PTK ITK ou

Zap-70 induisent la phosphorylation de la tyrosine contenue dans le motif YMNM. Plus récemment, Holdorf et ses collègues ont montré que l'interaction de p56Lck avec la queue cytoplasmique de CD28 permet d'augmenter l'activité de cette kinase. À son tour, l'activation de p56Lck est responsable de la régulation à la hausse la phosphorylation sur tyrosine du résidu Y du motif YMNM de CD28 (Holdorf *et al.*, 2002).

La stimulation par CD28 régule aussi à la hausse l'activation des kinases TEC et ITK. Une fois activées, TEC et ITK contribuent à augmenter l'activation de PLC- γ 1 initiée par la stimulation du TCR. La régulation à la hausse de l'activité de PLC- γ 1 via TEC ou ITK aide à accroître la concentration du calcium intracellulaire en plus de participer à la régulation positive de l'activité de la RAS-GRP (Ras Guanosine-Releasing Protein) qui active la voie Ras/Raf/ERK (Acuto et Michel, 2003). TEC et ITK pourraient également jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette via leur action sur la protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) favorisant la polymérisation d'actine (Takesono *et al.*, 2002).

2.1.2.5.2 L'activation de la PI3K et de AKT

Un des premiers événements biochimiques à survenir suite à la stimulation de CD28 est le recrutement à la membrane et l'activation de la protéine phospholipide 3-kinase (Harada *et al.*, 2001). La PI3K est un hétérodimère composé d'une sous-unité adaptatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Le domaine SH2 de la sous-unité adaptatrice p85 de PI3K interagit avec la tyrosine phosphorylée du motif YMNM compris dans la queue cytoplasmique de CD28. La p110 se charge de phosphoryler les anneaux inositols en position D-3 des phospholipides membranaires pour générer du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate et phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. La production de ces phosphoinositides contribue au recrutement à la membrane de protéines avec un domaine de liaison aux phosphoinositides, à l'occurrence le domaine PH (pleckstrin homology). Ce recrutement à la membrane, des protéines possédant un domaine PH, permet l'activation de plusieurs molécules-clés dont PLC-

$\gamma 1$, TEC/ITK (Miller et Berg, 2002) et la sérine/thréonine kinase AKT, connue aussi comme PKB (Acuto et Michel, 2003).

AKT peut jouer un rôle important dans la régulation de l'activation et de la survie des lymphocytes T. L'activation de AKT via CD28 régule à la hausse le métabolisme du glucose. Cela permet au lymphocyte T d'augmenter sa synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines suite à son activation (Frauwirth *et al.*, 2002). Dans des conditions de co-stimulation, l'activation de PI3K et de AKT contrôle la progression du cycle cellulaire du lymphocyte T (Appleman *et al.*, 2002). Par ailleurs, AKT amplifie l'activation de la kinase PKC θ . PKC θ est un isoforme de la protéine kinase PKC et sa phosphorylation est induite par la voie d'activation du TCR.

L'activation de PKC θ , dans des conditions de co-stimulation, peut mener à la régulation à la hausse de la voie NF- κ B (Coudronniere *et al.*, 2000). De plus, AKT peut phosphoryler les kinases GSK3 α /GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 α/β) qui inhibent l'exportation à partir du noyau du facteur NFAT (Beals *et al.*, 1997). De ce fait, par son action sur les kinases PKC θ et GSK3 α /GSK3 β , AKT contribue à augmenter la synthèse d'IL-2. Enfin, la stimulation par CD28 induit la formation de complexes de facteurs de transcription capables de reconnaître des régions appelées CD28 RE (CD28 Responsive Element). Ces régions se retrouvent dans le promoteur de nombreux gènes, notamment dans celui qui contrôle la transcription de l'IL-2 (Zhou *et al.*, 2002).

2.1.2.5.3 Phosphorylation sur tyrosine de protéines adaptatrices

L'activation de CD28 induit la phosphorylation sur tyrosine du facteur d'échange de guanine Vav et permet le recrutement des protéines Grb2 et Gads. (Appleman et Boussiotis, 2003) (Figure C). La molécule LAT, activée via le TCR, est également phosphorylée sur tyrosine suite à une stimulation CD28, et ce indépendamment de Syk et Zap-70. La phosphorylation de LAT permet le recrutement de SLP-76. Tel que mentionné précédemment, la formation du complexe protéique LAT/SLP-76 contribue à l'activation de PLC γ -1 et de p21Ras. La concentration du

complexe LAT/SLP-76 est généralement limitée par le nombre de TCR engagés à la surface des lymphocytes T. Suite à une co-stimulation par TCR/CD3 + CD28, la concentration de LAT/SLP-76 est augmentée, favorisant une meilleure activation cellulaire. Il existe donc des protéines phosphorylées sur tyrosine qui sont communes aux voies d'activation TCR/CD3 et CD28 (comme LAT ou Vav), mais d'autres sont spécifiques à la voie CD28 comme la protéine adaptatrice Dok-1 qui est uniquement phosphorylée par la stimulation de CD28 (Michel *et al.*, 2001).

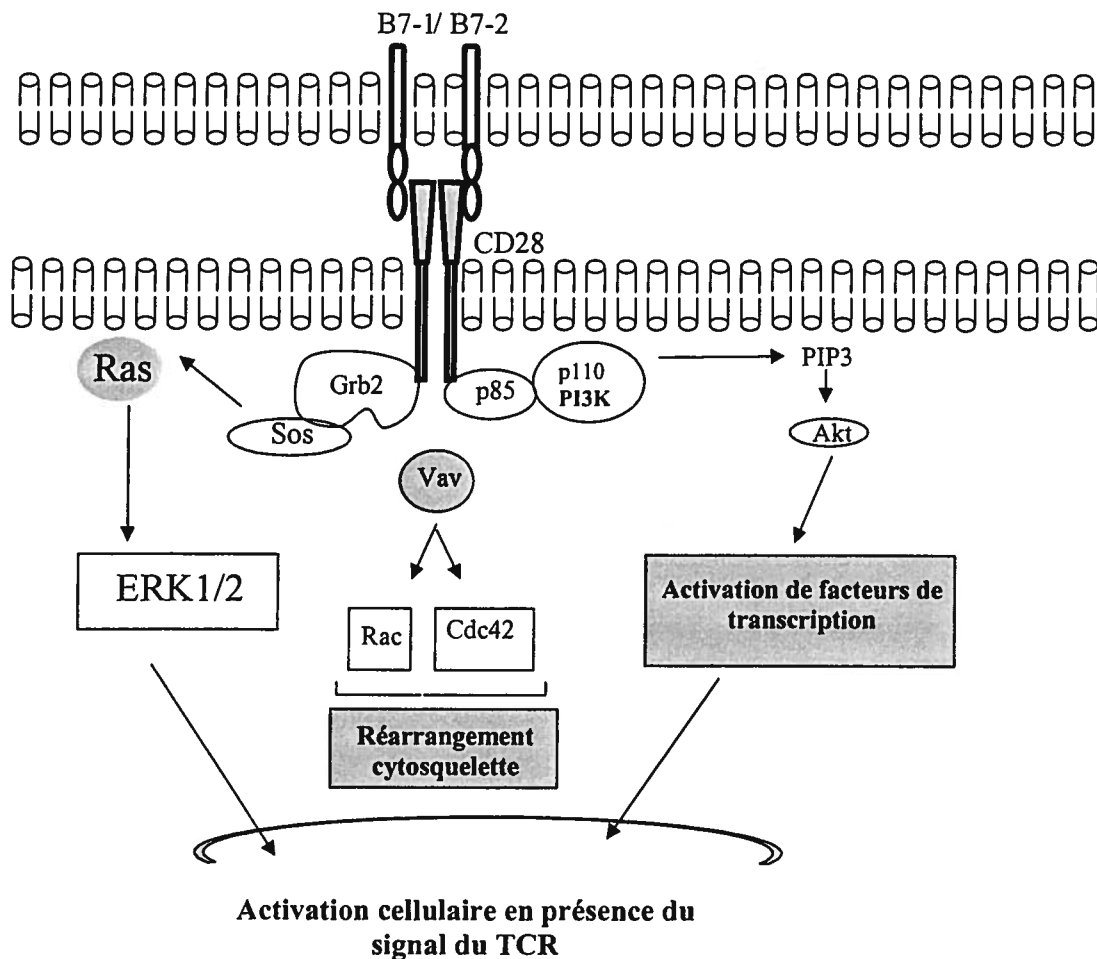


Figure D: Signalisation initiée par le récepteur CD28. La stimulation par CD28 induit des signaux activateurs qui synergisent avec ceux générés par le TCR afin d'augmenter la synthèse de facteurs de transcription nécessaires à l'activation cellulaire. Les signaux activateurs induits par CD28 sont également impliqués dans le réarrangement du cytosquelette aidant le lymphocyte T à atteindre son seuil d'activation.

2.1.3 Le récepteur CD2

Des récepteurs de co-stimulation comme CD2 et CD28 participent à l'amplification du signal généré par le complexe TCR/CD3, favorisant ainsi l'activation des lymphocytes T. CD2 est une glycoprotéine transmembranaire de 50 kDa qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Cette molécule est exprimée à la surface des lymphocytes T, des thymocytes et des cellules NK. Ses ligands, exprimés à la surface des CPA, sont CD58 (ou LFA-3) chez l'humain (Moingeon *et al.*, 1989) et CD48 chez la souris (van der Merwe et Davis, 2003). CD2 interagit avec 6 fois plus d'affinité avec son ligand CD58 comparativement à CD48 (Davis *et al.*, 2003).

La signalisation via CD2 induit la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines, également phosphorylées suite à l'activation via le complexe TCR/CD3; à l'exception de Dok-1 qui est uniquement phosphorylé via CD2 (Nemorin et Duplay, 2000; Martelli *et al.*, 2001). La phosphorylation de Dok-1 par cette voie de signalisation est indépendante des kinases Syk/Zap-70, mais dépendant des kinases p56Lck et Fyn (Martelli *et al.*, 2001). Une fois de plus, ceci met en évidence que les lymphocytes T empruntent des voies de signalisation différentes ou entrecroisées qui mènent à leur activation et que chacune des voies possède des substrats communs ou spécifiques à sa cascade de signalisation.

2.1.4 Souris déficientes pour l'expression de CD2 et/ou de CD28

Bien que CD2 soit considérée comme une molécule d'adhésion chez l'humain et chez la souris, des propriétés de molécule de co-stimulation lui sont conférées seulement chez l'humain. Le développement et l'activation des lymphocytes T de souris déficientes pour l'expression de CD2 ne sont pas affectés par l'absence de ce récepteur (Killeen *et al.*, 1992). Les cellules T provenant de souris déficientes pour l'expression de CD28 ont un développement normal mais ont des défauts prolifératifs en réponse à certains stimuli comme la lectine concanavaleine A (Shahinian *et al.*,

1993). D'autres réponses comme la réponse T cytotoxique suite à une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire sont similaires à celles observées chez les souris de type sauvage indiquant que CD28 n'est pas indispensable à l'activation lymphocytaire. Il agit surtout en augmentant la sensibilité et la durée du signal issu du TCR. D'autre part, les cellules T de souris déficientes pour CD28 évitent l'état d'anergie s'elles sont continuellement stimulées avec un peptide antigénique qui prolonge en quelque sorte le signal issu du TCR. Ces cellules sont donc capables de monter une réponse T *in vivo* (Kundig *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'activation des lymphocytes T par un anticorps anti-CD3 sous forme soluble ou par un antigène est altérée chez les cellules provenant de souris déficientes pour l'expression de CD2 et de CD28 (CD2^{-/-}CD28^{-/-}). Les cellules T CD2^{-/-}CD28^{-/-} répondent normalement à une activation par des anticorps anti-CD3 immobilisés sur du plastique. Ces subtilités dans la réponse T des souris doublement déficientes pour l'expression de CD2 et de CD28 indiquent que ces deux récepteurs semblent agir en synergie afin de faciliter l'interaction cellule T-APC amplifiant ainsi la signalisation induite par le TCR et contribuant à une meilleure activation lymphocytaire (Green *et al.*, 2000).

2.2 Signalisation négative

Une fois le signal activateur acheminé au point effecteur, la cellule stimulée a besoin de retrouver son niveau basal d'activation et de retourner au stade repos. L'atténuation de la réponse est également importante afin d'éviter une activation cellulaire inappropriée. Certains récepteurs exprimés à la surface de la cellule T tels que CD152 initient un signal négatif pour contrôler la réponse cellulaire. Les protéines adaptatrices dites inhibitrices participent également dans la régulation à la baisse de l'activation cellulaire en intervenant à plusieurs niveaux dans la signalisation intracellulaire.

2.2.1 Le récepteur CD152

CD152 est un récepteur homodimérique exprimé en faible quantité à la surface des lymphocytes T. L'activation des lymphocytes T est régulée à la baisse lorsque

CD152 interagit avec ses ligands CD80 et CD86. Ce récepteur intervient à plusieurs niveaux de l'activation pour réguler à la baisse la réponse cellulaire notamment en diminuant la production d'IL-2 ainsi qu'en inhibant la progression du cycle cellulaire des lymphocytes T (Brunner *et al.*, 1999). La signalisation négative induite par la stimulation de CD152 contribue ainsi au maintien d'un état d'homéostasie en empêchant une activation démesurée ou non essentielle des lymphocytes T. Ce rôle de récepteur inhibiteur est très bien démontré dans les lymphocytes T provenant de souris déficientes pour l'expression de CD152. Ces souris développent des lymphoadénopathies principalement causées par une hyperprolifération des cellules T (Waterhouse *et al.*, 1995).

CD152 régule également la réponse T par une compétition d'interaction avec les ligands CD80 et CD86 du récepteur de co-stimulation CD28. En effet, CD152, protéine transmembranaire, interagit aussi avec les ligands CD80 et CD86. Cependant, ce récepteur possède une plus grande affinité pour CD80 (Linsley *et al.*, 1991). Cette plus grande affinité d'interaction entre CD80 et CD152 lui permet d'initier des signaux antagonistes à ceux générés par le récepteur CD28 inhibant ainsi l'activation cellulaire des lymphocytes T (Linsley *et al.*, 1994).

3. La famille des protéines Dok: un exemple de protéines adaptatrices

Les protéines adaptatrices sont des protéines dépourvues de propriétés enzymatiques propres à elles mais qui possèdent des motifs de liaisons leur permettant d'agir comme des plateformes de signalisation, c'est-à-dire de recruter des protéines essentielles à certaines voies de signalisation afin de transmettre le signal jusqu'au point effecteur de la cellule. Les protéines adaptatrices sont plutôt considérées comme des régulateurs positifs de l'activation cellulaire, cependant plusieurs exemples prouvent le contraire. Dans les lymphocytes T, plusieurs régulateurs négatifs ont été décrits tels que PAG, Gab2, SLAP, SIT, Dok-1 et Dok-2 (Veillette *et al.*, 2002). Seules les propriétés des protéines Dok seront détaillées dans cette section.

Jusqu'à ce jour, six membres de la famille des protéines Downstream of Kinases (Dok) ont été caractérisés (Carpino *et al.*, 1997; Di Cristofano *et al.*, 1998; Lemay *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2001; Crowder *et al.*, 2004). Les protéines Dok-1 (ou p62Dok), Dok-2 (ou p56Dok, Dok-R ou FRIP) et Dok-3 (Dok-L) sont exprimées dans les cellules d'origine hématopoïétique: les cellules myéloïdes, les mastocytes, les lymphocytes T, les lymphocytes B et les macrophages (Lemay *et al.*, 2000). Dok-1 se retrouve dans la plupart des cellules d'origine hématopoïétique. Par contre, l'expression de la protéine Dok-2 est absente chez les lymphocytes B et la protéine Dok-3 ne se retrouve pas dans les lymphocytes T. Les molécules Dok-4, Dok-5 et Dok-6 sont surtout exprimées au niveau des tissus nerveux (Grimm *et al.*, 2001; Crowder *et al.*, 2004); quoi que chez l'humain l'ARNm codant pour Dok-4 et Dok-5 a été détecté dans certains types cellulaires comme les cellules T et les mégacaryocytes (Favre *et al.*, 2003).

3.1 Organisation structurale des protéines Dok

Les différents membres de la famille des protéines Dok possèdent une organisation structurale très similaire. Pour des raisons de clarté, uniquement la schématisation de la protéine Dok-1 sera exposée. L'organisation structurale de la protéine Dok-1 s'apparente à celle du substrat du récepteur d'insuline-1 (IRS-1). Cette homologie est retrouvée chez tous les autres membres de la famille Dok. Dok-1 possède en N-terminal un domaine d'homologie à la pleckstrine, suivie d'un domaine central de liaison aux phosphotyrosines (PTB) ainsi qu'une portion C-terminale qui contient plusieurs résidus tyrosine et proline (Figure E) (Carpino *et al.*, 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997).



Figure E: Organisation structurale de la protéine Dok-1. Représentation schématique de la protéine Dok-1. PH : pleckstrin homology, PTB : phospho tyrosine binding, C-term. : domaine c-terminal, Y : résidu tyrosine, P : résidu proline.

Le domaine PH de Dok-1 semble être impliqué dans la liaison de la protéine aux phosphoinositides de la membrane plasmique (interaction protéine-lipide). Pour sa part, le domaine PTB reconnaît des résidus tyrosine phosphorylés dans un contexte bien particulier, soit NPXpY et joue un rôle important dans l'interaction de type protéine-protéine. Dans la portion C-terminale de Dok-1 les dix résidus tyrosine, une fois phosphorylés, peuvent être reconnus par des domaines de liaison de type SH2. Enfin, les résidus prolines dans un contexte PxxP en C-terminal de Dok-1 pourraient servir de motif de liaison aux domaines SH3 (Carpino *et al.*, 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997). Les membres de la famille des protéines Dok possèdent le moins d'homologie structurale au niveau de cette portion C-terminale, suggérant que différentes protéines cytosoliques sont recrutées par les différentes molécules de la famille Dok.

3.2 Dok-1

3.2.1 La protéine Dok-1 dans des systèmes cellulaires autres que les lymphocytes T

Le gène humain codant pour la protéine Dok-1 a été cloné à partir de cellules myéloïdes exprimant la protéine kinase chimérique p210BcrAbl. Il s'agit d'une protéine chimérique, résultant d'une translocation entre deux portions de gènes sur deux chromosomes soit le gène *Bcr* et le gène *Abl*. Cette translocation confère

désormais à la kinase des pouvoirs oncogéniques. Les cellules myéloïdes, à partir desquelles a été cloné Dok-1, proviennent de patients atteints de la leucémie chronique myéloïde (CML) (Carpino *et al.*, 1997). Dok-1 est, en fait, constitutivement phosphorylé dans les cellules en phase chronique de transformation des patients atteints de CML suggérant que Dok-1 est un substrat direct de la kinase p210BcrAbl. Le gène *Dok-1* murin a été cloné à partir de précurseurs de cellules B murines transformées par l'oncogène v-Abl (Yamanashi et Baltimore, 1997). La molécule Dok-1 représente le premier membre identifié de la famille Dok. Dok-1 phosphorylé a été identifié comme étant la protéine à 62 kDa (d'où l'appellation p62Dok) qui co-immunoprécipite avec p120RasGAP, un régulateur négatif de la voie d'activation p21Ras (Ellis *et al.*, 1990).

3.2.1.1 Phosphorylation de Dok-1

La phosphorylation de Dok-1 a été observée en réponse à des stimuli comme des facteurs de croissances: PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulated Factor), du SCF (Stem Cell Factor ou kit Ligand) et de l'IL-3 (Zhao *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2004). Ces facteurs de croissances se lient à leur récepteur à la surface de la cellule et induisent la signalisation qui régule la prolifération cellulaire. Les régulateurs de la signalisation comme Dok-1 contribuent au maintien d'un équilibre entre les signaux positifs et négatifs de prolifération cellulaire assurant ainsi un état d'homéostasie en réponse aux divers stimuli.

La protéine Dok-1 est également phosphorylée dans des cellules transfectées avec des facteurs à pouvoir oncogénique comme les kinases v-Src, v-FPS, v-Abl, et p210BcrAbl (Ellis *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 2001). Dok-1 peut ainsi jouer un rôle dans la régulation de la transformation cellulaire. La phosphorylation de Dok-1 est aussi détectée suite à la ligation du BCR et du récepteur inhibiteur FcγRIIB à la surface des lymphocytes B et du récepteur CSF-R (Colony Stimulated Factor-Receptor) à la surface des macrophages (Ott *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 1999).

Outre les résidus tyrosine et proline en C-terminal de Dok-1, les domaines PH et PTB en N-terminal jouent des rôles importants au niveau de sa phosphorylation et son activation. Ces deux domaines sont responsables du recrutement des protéines à la membrane plasmique (Lemmon et Ferguson, 2000). Tel que mentionné auparavant, il a été proposé qu'en réponse à divers stimuli, Dok-1 est phosphorylé sur tyrosine. Cette phosphorylation permet à Dok-1 d'être localisée près de la membrane plasmique via l'interaction de ses domaines PH et PTB. Une fois recrutée à la membrane, la protéine devient encore plus phosphorylée et peut participer à des interactions de type protéine-protéine ou protéine-lipide. Plusieurs études semblent confirmer ce mécanisme d'activation de Dok-1. Pour ne citer qu'un exemple, l'étude de Noguchi et ses collègues sur le domaine PH a montré que la présence de ce domaine est absolument requise pour induire la phosphorylation de Dok-1 en réponse à l'insuline (Noguchi *et al.*, 1999). Songyang et ses collaborateurs ont montré que le domaine PTB de Dok-1 ainsi que la tyrosine Y146 situé entre le domaine PH et le domaine PTB de la protéine lui permettent de réguler négativement la transformation cellulaire initiée par l'activation de la tyrosine kinase Src (Songyang *et al.*, 2001).

3.2.1.2 L'interaction de Dok-1 avec des régulateurs négatifs

La phosphorylation de Dok-1 permet son association avec plusieurs protéines à activité inhibitrice. Les domaines de liaison de type SH2 de Crk-L (Martelli *et al.*, 2001), de Csk (Neet et Hunter, 1995) et de RasGAP (Songyang *et al.*, 2001) interagissent avec les résidus tyrosine phosphorylés de Dok-1. Ces interactions permettent à Dok-1 de jouer le rôle de régulateur négatif dans plusieurs systèmes cellulaires. Parmi les effets observés, Dok-1 inhibe la prolifération cellulaire, régule à la baisse l'activation des MAPK et diminue la transformation des cellules cancéreuses et la leucémie dans plusieurs systèmes (Yamanashi *et al.*, 2000; Di Cristofano *et al.*, 2001; Songyang *et al.*, 2001; Wick *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001).

Tamir *et al.* ont montré que Dok-1 joue un rôle dans l'inhibition de l'activation de la cellule B stimulée par le BCR via son association avec SHIP. Dok-1 est activé par le récepteur d'inhibition FcγRIIB et va ainsi réguler la cascade de signalisation initiée par le BCR. La ligation du récepteur FcγRIIB contribue à la formation d'un complexe FcγRIIB avec les protéines phosphorylées SHIP et Dok-1 où SHIP est une

protéine inositol phosphatase (Tamir *et al.*, 2000). À la membrane, le complexe SHIP-Dok-1 contribue à réguler à la baisse l'activation des MAPK et la prolifération cellulaire des lymphocytes B.

Shah et ses collègues ont montré que les résidus tyrosines 295 et 361 en C-terminal de Dok-1 ainsi qu'un domaine PTB intact sont essentiels pour que la protéine inhibe la transformation cellulaire causée par le pouvoir oncogénique de v-Src. Cette régulation semble se produire via l'interaction de Dok-1 avec les protéines à action inhibitrice p120RasGAP et Csk (Shah et Shokat, 2002). Dans le même ordre d'idées, Lee et ses collaborateurs ont montré qu'une mutation dans le gène *Dok-1* peut être responsable de certaines tumeurs chez des patients atteints de leucémie de type B-CLL (B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia) (Lee *et al.*, 2004). Contrairement à l'étude par N. Carpino *et al.* effectuée sur les cellules myéloïdes exprimant la protéine kinase chimérique p210BcrAbl, les dernières études attribuent à la protéine Dok-1 un rôle dans la prévention de la transformation cellulaire plutôt que dans l'augmentation de celle-ci.

3.2.1.3 Souris déficientes pour l'expression de Dok-1 ou Dok-1 et Dok-2

Les souris déficientes pour l'expression de la protéine Dok-1 (*Dok-1*^{-/-}) ont été générées par deux groupes (Yamanashi *et al.*, 2000; Di Cristofano *et al.*, 2001). L'absence de Dok-1 dans les lymphocytes B de souris *Dok-1*^{-/-} démontre son rôle-clé dans la régulation de l'activation et la prolifération des cellules, de par son action sur la voie des MAPK et sur la signalisation induite par FcγRIIB (Yamanashi *et al.*, 2000). L'inactivation du gène codant pour Dok-1 n'altère pas le développement des cellules T chez ces souris. En effet, les souris *Dok-1*^{-/-} mènent une vie normale et possèdent une population de cellules hématopoïétiques comparable aux souris de type sauvage. Il est possible que la présence du deuxième membre de la famille Dok, Dok-2, dans les lymphocytes T, contrebalance pour l'absence de Dok-1. Cependant, Dok-2 ne compense pas à part entière pour l'absence de Dok-1. En effet, les thymocytes des souris déficientes pour Dok-1 prolifèrent mieux comparativement aux thymocytes de souris de type sauvage suite à leur stimulation par la lectine Con A plus IL-2, mais non via l'activation de CD3 (Di Cristofano *et al.*, 2001).

Les souris doublement déficientes pour l'expression de Dok-1 et Dok-2 (Dok-1^{-/-}/2^{-/-}) révèlent l'importance de ces deux protéines dans la régulation des fonctions des cellules hématopoïétiques ainsi que dans la pathogenèse de la leucémie chronique myéloïde (CML) (Niki *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004). En effet, l'absence de Dok-1 et de Dok-2 provoque une hématopoïèse aberrante chez ces souris: une infiltration de cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et dans la rate, une leucocytose des cellules du sang périphérique provoquée par l'accumulation de neutrophiles et de monocytes ainsi qu'une activation démesurée de la voie Ras/MAPK. Dok-1 et Dok-2 sont également des régulateurs négatifs de la réponse des cellules myéloïdes aux cytokines. Les cellules des souris Dok-1^{-/-}/2^{-/-} sont hyperprolifératives en réponse à leur stimulation par des cytokines, sont moins sujettes à l'apoptose et développent des maladies myéloprolifératives du type CML. De ce fait, Dok-1 et Dok-2 jouent des rôles importants dans le contrôle du développement de tumeurs et dans le maintien d'un état d'homéostasie des cellules d'origine hématopoïétique.

La chémokine SDF-1 α /CXCL12 est une molécule à effet chemoattractant. Elle joue un rôle important dans l'intégration des signaux qui culminent en l'attraction des cellules T aux sites appropriées de la réponse immunitaire. Dok-1 est un substrat d'une de ces voies d'activation. La chemotaxie des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ des souris déficientes pour l'expression de Dok-1 est augmentée en réponse à la SDF-1 α /CXCL12. Dok-1 semble, une fois de plus, jouer un rôle de régulateur négatif (Okabe *et al.*, 2005).

La seule étude qui montre que Dok-1 peut jouer un rôle de régulateur positif a été effectuée par Noguchi et ses collègues. La surexpression de Dok-1 dans des cellules CHO exprimant le récepteur à l'insuline (IR) montre que ces cellules ont une plus grande motilité, suggérant un rôle positif de Dok-1 dans la réorganisation du cytosquelette en réponse à l'insuline via son association avec la protéine Nck (Noguchi *et al.*, 1999).

3.2.2 Caractérisation de la fonction de Dok-1 dans les lymphocytes T

Peu d'études ont été effectuées afin de comprendre le rôle de Dok-1 dans l'activation des lymphocytes T. Il a été rapporté que Dok-1 est un substrat des deux kinases de la famille Src, p56Lck et Fyn (Fukai *et al.*, 2000; Nemorin et Duplay, 2000; Martelli *et al.*, 2001). Dok-1 serait phosphorylé suite à une stimulation par SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule) (Latour *et al.*, 2001), par CD28 (Nunes *et al.*, 1996) ou CD2 (Nemorin et Duplay, 2000), mais non par le complexe TCR/CD3 (Nemorin et Duplay, 2000; Martelli *et al.*, 2001). Une activation par le complexe TCR/CD3 ou par le TCR en conditions de co-stimulation (TCR/CD3 + CD28 par exemple) n'induit pas la phosphorylation de Dok-1 (Michel *et al.*, 2001). Physiologiquement, l'état différentiel de phosphorylation de Dok-1 selon le récepteur engagé n'est pas connu. Tel que mentionné précédemment, CD2 et CD28 sont tous deux des récepteurs qui induisent des signaux activateurs lors de leur stimulation; tandis que Dok-1 semble être un régulateur négatif de l'activation cellulaire du moins lorsque CD2 est engagé à la surface du lymphocyte T. Nous pouvons supposer que Dok-1 puisse agir à différents niveaux dans la cascade des signaux intracellulaires engendrés lors du contact cellule T-APC. Les molécules CD2 et CD28 sont constitutivement exprimées à la surface des lymphocytes T. Un contrôle strict est nécessaire afin que ces voies d'activation ne soient pas activées de manière non spécifique. La phosphorylation de Dok-1 par CD2 ou CD28 peut agir sur ces récepteurs de co-stimulation lors du contact cellule T-APC afin de prévenir le déclenchement d'une réponse cellulaire due à des agonistes partiels. Par ailleurs, nous pouvons envisager la possibilité que le signal émis lors du coengagement de CD28 empêcherait l'activation de la cellule T tant que le signal généré par le complexe TCR-peptide/CMH n'est pas suffisamment puissant pour interrompre la phosphorylation de Dok-1. Lors du coengagement TCR-CD28, Dok-1 n'est plus phosphorylé. Cette déphosphorylation peut être causé, par exemple, par une inhibition du recrutement de Dok-1 à la membrane lors que le TCR à rencontrer le complexe peptide/CMH de bonne affinité pour activer la cellule. D'autres facteurs peuvent être responsables de la déphosphorylation de Dok-1 comme l'activation d'une phosphatase

spécifique ou à l'inverse, l'inactivation d'une kinase. Ainsi la déphosphorylation de Dok-1 serait nécessaire à l'activation lymphocytaire.

Une étude menée par Némorin *et al.* montre que p56Lck peut s'associer via son domaine de liaison SH2 à Dok-1 phosphorylé sur tyrosine (Némorin et Duplay, 2000). De plus, il a été démontré que la translocation de Dok-1 et Dok-2 à la membrane serait responsable de leur association avec la p120RasGAP. L'interaction des protéines Dok avec la protéine inhibitrice p120RasGAP permet à p120RasGAP d'être recrutée à proximité de son substrat p21Ras et de réguler négativement la voie d'activation p21Ras. Dans ce système, la surexpression de Dok-1 dans les lymphomes Jurkat T inhibe la phosphorylation de PLC γ -1, l'activation de ERK1/2 ainsi que la mobilisation de calcium. Ces effets inhibiteurs de l'activation des lymphocytes T sont observés lorsque la cellule est stimulée par la voie de signalisation CD2 (Némorin *et al.*, 2001). Dok-1 et Dok-2 phosphorylés s'associent à la protéine Tec, une PTK exprimée par les lymphocytes T (Gerard *et al.*, 2004). L'interaction des protéines Dok avec Tec peut inhiber l'activation de la kinase via la régulation à la baisse de sa phosphorylation et des voies de signalisation qui mènent à son activation (exemple : via son association à p120RasGAP qui inhibe la voie Ras).

Enfin, tel que mentionné précédemment, le rôle de Dok-1 dans le développement des cellules T n'a fait l'objet que d'une seule étude. L'analyse du profil d'expression des marqueurs CD4 et CD8 à la surface des cellules de la rate et du thymus des souris Dok-1^{-/-} semble indiquer que cette protéine ne joue pas de rôle important dans la régulation du développement des lymphocytes T (Di Cristofano *et al.*, 2001). Cependant, la présence de l'autre membre de la famille des protéines Dok, soit Dok-2 chez les cellules T pourrait masquer le phénotype subtile causé par l'absence de Dok-1. La disponibilité récente des souris doublement déficientes pour l'expression de Dok-1 et Dok-2 devrait permettre une analyse plus approfondie de la contribution de l'expression de chacun des deux membres de la famille Dok sur le développement lymphocytaire.

3.3 Dok-2

Dok-2 est phosphorylé sur tyrosine suite à l'activation des récepteurs tyrosine kinases comme Tek/Tie2 (Jones et Dumont, 1998), l'EGFR (Endothelial Growth Factor Receptor) (Jones et Dumont, 1999), le récepteur à l'insuline et les récepteurs de l'IL-2 et l'IL-4 (Nelms *et al.*, 1998). Dok-2 est également phosphorylé par le récepteur d'activation CD2 à la surface des lymphocytes T. Son association avec RasGAP a également été démontrée (Nemorin et Duplay, 2000).

Tout comme pour Dok-1, les différentes études effectuées sur Dok-2 lui attribuent un rôle de régulateur négatif de l'activation cellulaire. Par exemple, la surexpression de Dok-2 inhibe l'activation des MAPK et du facteur de transcription AP-1 suite à une stimulation par l'IL-2 (Nelms *et al.*, 1998). Par contre, Dok-2 semble jouer un rôle de régulateur positif de la motilité cellulaire via ses interactions avec Nck et Pak (p21-Activating Kinase) (Master *et al.*, 2001).

Par ailleurs, un rôle de Dok-2 dans la maturation des thymocytes a été observé. Gugasyan et ses collaborateurs ont utilisé une infection par rétrovirus pour exprimer Dok-2 dans les cellules de la moelle osseuse. Une fois introduites dans des souris irradiées, ces cellules progénitrices ont des capacités réduites à former des colonies *in vitro* en réponse aux facteurs M-CSF et SCF, tandis que leur réponse aux GM-CSF et à l'IL-3 n'est pas affectée. Le phénotype le plus marquant de ces précurseurs est leur incapacité à repeupler les organes lymphoïdes, plus particulièrement le thymus. L'expression de Dok-2 inhibe la transition des stades de développement double négatif (DN) / double positif (DP) des thymocytes. Conséquemment, le nombre de lymphocytes T matures en périphérie est diminué (Gugasyan *et al.*, 2002).

Enfin, tout comme Dok-1, le rôle de Dok-2 dans l'activation des lymphocytes T n'est pas bien documenté. Une étude par Némorin *et al.* a montré que Dok-2 est phosphorylé par la stimulation du récepteur chimérique EFGR/Lck à la surface des cellules Jurkat T, indiquant que Dok-2 est un substrat de la kinase p56Lck. De plus, Dok-2 est un substrat unique à la voie d'activation CD2 (Nemorin et Duplay, 2000).

3.4 Dok-3 à Dok-6

Dok-3 est impliqué dans la régulation négative de la signalisation initiée par le BCR dans les cellules B et par le FcγRI dans les macrophages (Lemay *et al.*, 2000). Dok-4 et Dok-5 semble être des régulateurs positifs de la signalisation menant à la croissance des neurones (Grimm *et al.*, 2001), tout comme Dok-6, le dernier membre découvert (Crowder *et al.*, 2004). Les trois membres, Dok-4, Dok-5 et Dok-6, semblent augmenter la croissance des extrémités neuronales via leur association avec Ret, un récepteur tyrosine kinase exprimé à la surface des cellules gliales.

4. Maturation des thymocytes

4.1 Les précurseurs des lymphocytes T

Plusieurs étapes de différenciation sont franchies lors du développement des thymocytes. Ces étapes se caractérisent par l'expression des molécules CD4 et CD8 à la surface des cellules. Ces stades se désignent par les appellations double négatif (DN: CD4⁻CD8⁻), double positif (DP: CD4⁺CD8⁺) et simple positif (SP: CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺) (Figure F).

4.1.1 Stade double négatif (DN)

Les thymocytes les plus immatures sont des thymocytes DN. Ils n'ont subi aucun réarrangement des loci α , β , γ ou δ du TCR et n'expriment pas les co-récepteurs CD4 et CD8. Ces thymocytes DN traversent quatre stades de développement nommés DN1 à DN4 (Figure F). Les stades DN1 à DN4 se distinguent par l'expression des marqueurs CD25 (chaîne α de l'IL-2R), CD44 (Pgp-1) et *c-kit* ou le récepteur SCF (Stem Cell Factor Receptor) à la surface des thymocytes (Godfrey *et al.*, 1993). Ces derniers suivent une séquence de maturation singulière qui commence par le stade DN1 soit CD44⁺ CD25⁻ *c-kit*⁺ puis devient DN2 CD44⁺ CD25⁺ *c-kit*⁺ suivie de DN3 CD44⁻ CD25⁺ *c-kit*^{low} et qui se termine par le stade DN4 CD44⁻ CD25⁻ *c-kit*^{very low}.

Les thymocytes DN réarrangent leur chaîne TCR β à la transition des stades DN2 à DN3. C'est également à ce stade que sont réarrangés les gènes *TCR δ* et *TCR γ* qui mènent à la génération de l'isoforme TCR $\gamma\delta$ des cellules T matures (Burtrum *et al.*, 1996).

4.1.2 Transition des stades double négatif (DN) / double positif (DP)

La chaîne TCR β s'associe avec une chaîne invariable pT α , le substitut de la chaîne α du TCR. La chaîne β et la chaîne pT α du TCR sont associées à la molécule CD3 et forment le complexe pré-TCR/CD3. L'expression d'un complexe pré-TCR/CD3 fonctionnel, processus nommé la β sélection, génère des signaux de maturation aux thymocytes DN. Conséquemment, les thymocytes immatures cessent de réarranger leur chaîne TCR β , réarrangent leur chaîne TCR α et expriment les co-récepteurs CD4 et CD8. Les thymocytes DN mûrent en thymocytes DP à cause du signal initié par l'activation du complexe pré-TCR/CD3 (Guidos *et al.*, 1989).

4.1.3 Transition des stades double positif (DP) / simple positif (SP)

Les thymocytes DP non autoréactifs sont sélectionnés (sélection positive et négative) et se différencient en thymocytes simple positifs matures. La différenciation des DP en SP mène à deux scénarios selon leur restriction à la molécule de CMH: la génération de thymocytes SP CD4⁺CD8⁻ ou SP CD4⁻CD8⁺ (Teh *et al.*, 1988).

Les CD4⁻CD8⁺ sont dits cytotoxiques à cause de leur action cytolytique et sont communément appelés CTL (Cytotoxic T Lymphocyte). Les CTL sont restreints à la reconnaissance des antigènes présentés par le complexe CMH de classe I. Les CD4⁺CD8⁻ sont qualifiés de cellules CD4⁺ auxiliaires (Helper CD4⁺ T Cell). Ces cellules sont activées par le complexe peptide/CMH II. Tel que mentionné, les T_H CD4⁺ sont impliquées dans la régulation de la réponse des cellules CD8⁺, dans la

production d'anticorps par les lymphocytes B ou dans le recrutement de diverses cellules aux sites d'inflammation lors d'une réponse immunitaire.

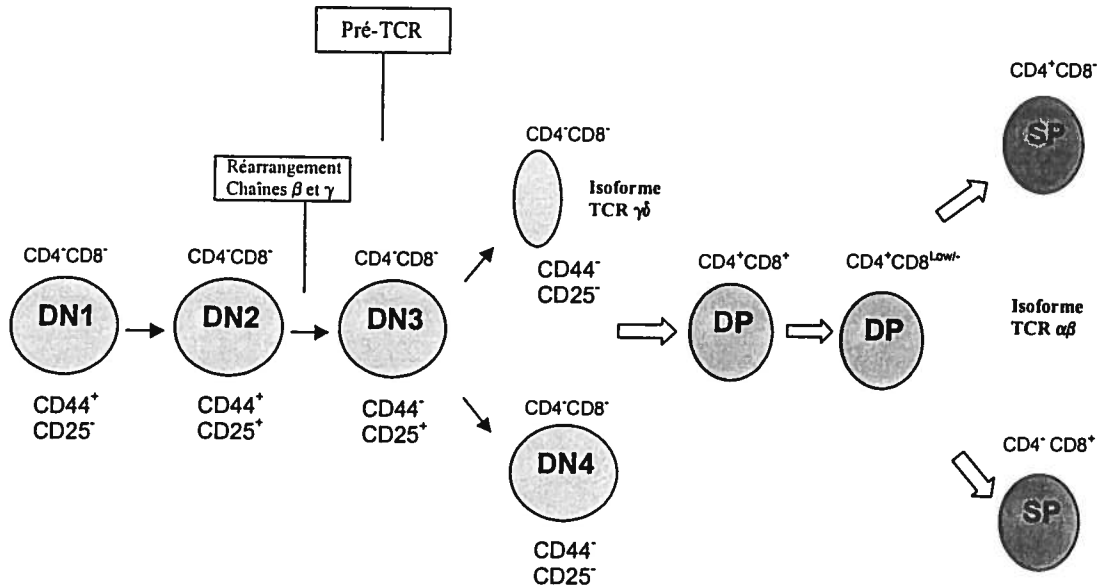


Figure F: Représentation schématique des stades de développement des thymocytes. Les différents stades de maturation des thymocytes se distinguent par l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8. DN : double négatif, DP : double positif, SP : simple positif.

Adaptée de Godfrey, D.I, Kennedy, J., *J. Immunol.*, 1994, 152: 4783-4792

5. Processus de contrôle de la maturation des thymocytes

La transition des stades DN à DP et DP à SP se produit en fonction du signal généré par le TCR et ses différentes composantes. Ce processus de maturation des thymocytes est régulé par plusieurs points de contrôle qui mènent ultimement à la génération des lymphocytes T matures, fonctionnels, non autoréactifs et avec la bonne restriction aux molécules de CMH. Les processus de la β sélection et de la sélection du répertoire de cellules T font partie de ces points de contrôle.

5.1 La β sélection

Le processus de la β sélection se décrit par la formation d'un complexe pré-TCR/CD3 fonctionnel capable d'induire des signaux de survie aux thymocytes en développement. La signalisation du complexe pré-TCR/CD3 de la cellule T immature ressemble à celle initiée par la voie TCR/CD3 du lymphocyte T mature décrite auparavant. La β sélection se produit à la transition des stades de différenciation DN3 à DN4 des thymocytes immatures.

5.1.1 RAG-1 et RAG-2

Le pré-TCR est composé du produit du gène *TCR β* réarrangé et de la chaîne pT α . Pour que le réarrangement de la chaîne β du TCR se produise au stade DN2 / DN3, les thymocytes requièrent l'action de deux enzymes recombinases codées par les gènes *RAG-1* et/ou *RAG-2* (Recombination-Activating Genes). Les gènes α et β du TCR renferment des segments de gènes dont la recombinaison génère des domaines variables et constantes constituant les chaînes du TCR. RAG-1 et/ou RAG-2 sont responsables du réarrangement des gènes *V(D)J* fonctionnels qui codent pour la région variable en N-terminal des chaînes α et β du TCR.

Le développement des thymocytes de souris déficientes pour RAG-1 (RAG-1^{-/-}) et/ou RAG-2 (RAG-2^{-/-}) est arrêté au stade DN3 (CD44⁺CD25⁺) puisque le pré-TCR n'est pas exprimé à la surface des cellules. Le complexe CD3 est, pour sa part, exprimé. Ces souris ne possèdent aucune cellule T $\alpha\beta$ mature (Mombaerts *et al.*,

1992). En traitant les thymus de souris déficientes pour l'expression des gènes *RAG* avec un anticorps anti-CD3, il est possible de mimer les signaux induits par le complexe pré-TCR/CD3. De ce fait, la transition du stade DN à DP des thymocytes peut se produire (Falk *et al.*, 1996).

5.1.2 Importance de la chaîne TCR β

L'incorporation du transgène codant soit pour la chaîne β du TCR ou pour les deux chaînes TCR β et TCR α dans les thymocytes de souris déficientes pour l'expression de RAG-2 a permis de conclure que la présence de la chaîne β est importante pour la maturation des thymocytes DN en thymocytes DP. L'incorporation d'un transgène codant pour la chaîne TCR β permet aux thymocytes des souris RAG-2^{-/-} de se différencier jusqu'au stade DP (Shinkai *et al.*, 1993). La présence d'un transgène codant pour la chaîne α réarrangée à elle seule, ne permet pas aux thymocytes de ces souris de maturer en thymocytes DP.

Le développement des thymocytes de souris incapables de synthétiser la chaîne pT α ressemble à celui des souris RAG-1^{-/-} puisqu'il est également arrêté au stade de développement DN3 (Fehling *et al.*, 1995). Une étude menée chez des souris déficientes pour l'expression de la chaîne TCR β montre que le développement des thymocytes TCR $\alpha\beta$ est arrêté au stade de la β sélection et que les seules cellules T capables de maturer expriment l'isoforme TCR $\gamma\delta$ (Mombaerts *et al.*, 1992).

En résumé, un thymocyte DN incapable de réarranger les chaînes β , de produire la chaîne pT α ou de réarranger ses loci δ , γ du TCR meurt par négligence parce qu'il n'a reçu aucun signal de survie. La β sélection est essentielle à la prolifération et l'expansion des thymocytes TCR $\alpha\beta$ en développement.

5.2 Processus de contrôle de la sélection du répertoire des lymphocytes T

Le réarrangement des loci α et β est un processus aléatoire qui génère des thymocytes avec des TCR très diversifiés capables de reconnaître une multitude d'antigènes différents. Les lymphocytes TCR $\alpha\beta$ sont sujets à plusieurs niveaux de sélection durant leur développement dans le thymus afin d'éliminer les cellules à potentiel autoréactif et conserver les cellules capables de participer à une réponse immune (théorie de la sélection du répertoire des lymphocytes T). Selon cette théorie, les cellules sont sélectionnées de sorte qu'un lymphocyte T doté d'un récepteur qui reconnaît un peptide antigénique étranger présenté par une molécule de CMH du soi survive (sélection positive), tandis qu'un lymphocyte autoréactif est éliminé (sélection négative). En fait, près de 95 % des thymocytes DP en développement sont éliminés par sélection négative (Kappler *et al.*, 1987).

5.2.1 Sélection positive et négative

La sélection du répertoire thymique est constituée de plusieurs étapes de régulation qui mènent à la mort ou à la survie des lymphocytes T en développement. La sélection positive permet la survie des thymocytes qui possèdent une bonne affinité avec les CMH de classe I et II exprimés (présentant un peptide du soi) sur les cellules épithéliales du cortex thymique. Cette sélection est nécessaire pour induire une réponse immunitaire restreinte aux molécules du CMH. Ainsi les thymocytes « doubles positifs » interagissent avec les CMH I et II par leur TCR et les molécules CD8 et CD4 respectivement. Les thymocytes qui ne se lieront pas aux CMH mourront par apoptose dans les jours suivants. La sélection positive permet aussi de différencier les lymphocytes en CD4⁺ ou CD8⁺. Suite à leur sélection, les lymphocytes n'expriment qu'une seule de ces deux molécules. La plupart des lymphocytes (> 95%) ne survivront pas à ce processus de sélection positive. Les thymocytes sélectionnés positivement passent ensuite à la médulla, où ils subiront la sélection négative. Les DP positivement sélectionnés régulent à la hausse l'expression du marqueur d'activation CD69. Phénotypiquement, ces cellules sont CD4⁺CD8⁺, CD69⁺ et TCR^{intermédiaire}, expression modérée du TCR à leur surface (Bendelac *et al.*, 1992).

La régulation à la hausse du marqueur CD5 est également une conséquence directe de la sélection positive des thymocytes.

Les affinités entre les TCR et les CMH peuvent varier de faible à forte. La sélection négative permet la discrimination entre les différentes affinités et ainsi élimine les thymocytes qui réagissent fortement aux interactions entre le CMH présentant un peptide du soi (Ashton-Rickardt *et al.*, 1994). Cette sélection est importante pour développer une tolérance au soi. La médulla est composée de différents types cellulaires dont les plus importants sont les cellules dendritiques et macrophages dérivés de la moelle osseuse. Ces cellules exposent leur CMH de classe I et II qui interagissent avec les thymocytes. Les mécanismes précis de la sélection négative ne sont pas encore connus, mais les cellules meurent par apoptose. Une fois ces deux sélections terminées, les lymphocytes T sont de petite taille et en état de repos. Ils se retrouveront dans le système immunitaire périphérique et migreront dans les organes lymphoïdes secondaires où ils pourront effectuer leur tâche de reconnaissance des antigènes étrangers.

5.3 Développement des thymocytes DP en SP CD4⁺ versus SP CD8⁺

Les thymocytes DP sélectionnés positivement doivent obligatoirement terminer la transcription du gène codant pour l'un des deux co-récepteurs CD4 ou CD8 afin de se différencier en thymocytes SP. Plusieurs modèles de maturation qui tiennent en considération la spécificité de l'interaction avec les molécules de CMH et l'influence de l'expression des co-récepteurs pour aiguiller le choix de la lignée que deviendra un thymocyte DP ont été proposés (von Boehmer, 1996).

5.3.1 Modèles stochastique/sélectif

Les modèles stochastique/sélectif postulent que le co-engagement du TCR + CD4 ou du TCR + CD8 provoque un arrêt aléatoire de la transcription d'un des deux

gènes soit celui qui code pour le co-récepteur CD4 ou CD8 (Davis *et al.*, 1993). Dans ce modèle, seuls les thymocytes qui possèdent la bonne combinaison du TCR + corécepteur survivent. En effet, 50 % des thymocytes meurent à cause de l'absence des signaux de survie dans les cas où le thymocyte DP a fait un mauvais choix de terminaison de la transcription du co-récepteur requis (Singer, 2002).

5.3.2 Modèle instructif

Le modèle instructif propose que la reconnaissance et le co-engagement d'une molécule de CMH I par un TCR et le co-récepteur CD8 induisent l'arrêt d'expression du co-récepteur CD4. De la même façon, la reconnaissance et le co-engagement d'une molécule de CMH II provoquent l'arrêt de la transcription de CD4.

5.3.2.1 Modèle instructif quantitatif

Les études menées jusqu'à ce jour ne discriminent pas si la présence des co-récepteurs à la surface des DP contribue à augmenter l'avidité de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH ou participe activement à la génération de signaux qui indiquent au thymocyte DP le choix de réguler à la baisse l'expression du co-récepteur CD4 ou CD8 pour devenir une cellule SP CD4⁺ ou SP CD8⁺ (Ernst *et al.*, 1995). Bien qu'hypothétique, la théorie de la force différentielle du signal généré par le co-engagement de CD4 versus CD8 est très attrayante. Il a été démontré que les deux molécules CD4 et CD8 lient la protéine kinase p56Lck. Différentes études suggèrent que CD4 lie une plus grande quantité de p56Lck. De ce fait, la force du signal généré par le TCR est plus grande lorsque CD4 est co-engagé pendant l'activation de la cellule T (Itano *et al.*, 1996).

Conséquemment, le TCR d'un thymocyte DP en développement discriminerait une molécule de CMH I ou de CMH II à cause de la force du signal émis par le co-engagement de son co-récepteur, favorisant ainsi la maturation vers la lignée appropriée. Il s'agit d'un modèle quantitatif où les signaux générés par la portion cytoplasmique des co-récepteurs contrôlent la maturation des thymocytes en sélection.

La signalisation via CD4 assure la régulation à la baisse de la transcription du gène qui code pour CD8 et la signalisation via CD8 en fait autant pour le contrôle de la transcription du gène codant pour CD4. Des thymocytes DP avec un TCR spécifique pour une molécule de CMH I peuvent maturer en thymocytes SP CD4⁺ s'ils expriment à leur surface un récepteur chimérique contenant la portion extracellulaire de la molécule CD8 et la queue cytoplasmique de CD4 (Seong *et al.*, 1992). Par contre, il n'a pas encore été démontré qu'un DP avec un TCR qui reconnaît avec très forte affinité un peptide présenté par une molécule de CMH I (donc signal du TCR très fort) puisse se différencier en SP CD4⁺ (Goldrath *et al.*, 1997). En effet, des mutations qui affectent la qualité du signal du TCR, n'ont pas permis une redirection de la différenciation des DP sélectionnés positivement vers des SP CD8⁺.

5.3.2.2 Modèle instructif de la durée du signal

Ce modèle ne tient pas en considération l'intensité du signal généré par le TCR + corécepteur. Il s'agit plutôt de la qualité de la stimulation du TCR. Celle-ci est dictée par la durée de contact du récepteur TCR avec ses ligands intrathymiques. Un contact de longue durée du TCR avec son ligand intrathymique induit la différenciation du thymocyte DP en thymocyte SP CD4⁺, tandis qu'un contact bref génère des thymocytes SP CD8⁺ (Yasutomo *et al.*, 2000). Ce modèle propose ainsi une maturation des thymocytes DP en SP indépendamment de la spécificité du TCR pour une molécule de CMH.

5.3.3 Modèle cinétique

Ce modèle se veut ni instructif ni stochastique. Le modèle cinétique repose essentiellement sur le fait que les thymocytes DP sélectionnés positivement sont préprogrammés pour acquérir un stade où ils sont qualifiés de DP CD4⁺CD8^{Low/-}. Il s'agit d'un type de thymocyte DP intermédiaire qui n'a aucune préférence quant à sa différenciation en thymocytes SP CD4⁺ ou CD8⁺. Ces cellules ont régulé à la baisse l'expression du gène codant pour CD8 peu importe leur restriction pour la molécule de CMH et détiennent toujours la capacité de se développer en thymocytes matures SP CD4⁺ ou CD8⁺ (Brugnera *et al.*, 2000).

La signalisation du TCR viendrait créer cette asymétrie en régulant à la baisse l'expression de CD8 et non de CD4 donc diminuant la force du signal requis pour générer des cellules T restreintes au CMH I. En effet, une signalisation prolongée ou soutenue lors de l'activation du TCR permet au thymocyte DP CD4⁺CD8^{Low/-} d'acquérir le phénotype SP CD4⁺ (Bosselut *et al.*, 2003). *In vitro*, la stimulation des cellules à l'aide d'anticorps anti-TCR ou en conditions de co-stimulation avec des anticorps anti-TCR + anti-CD28 ou anti-CD2 favorise la maturation des DP en SP CD4⁺ (Cibotti *et al.*, 1997). Il s'agit d'une voie que les thymocytes DP en culture empruntent par défaut, tandis que la différenciation de DP en SP CD8⁺ requière des signaux spécifiques à la génération de la lignée CD8. En effet, le phénomène réciproque se produit surtout lorsque la signalisation du TCR est atténuée ou lors de l'induction de la transcription de gènes comme *Runx3* qui favorisent l'arrêt de la transcription de *CD4* (Woolf *et al.*, 2003). L'arrêt de la transcription du gène codant pour le co-récepteur CD4 et la réexpression de CD8 génèrent ainsi des thymocytes SP CD8⁺.

En résumé, durant l'étape de la sélection positive des thymocytes, des signaux persistants promouvoient la différenciation des thymocytes DP en cellules SP CD4⁺ tandis que des signaux transitoires favorisent le développement des thymocytes SP CD8⁺.

5.4 Molécules qui influencent le développement des thymocytes

5.4.1 Rôle des cytokines

Les récepteurs des cytokines IL-2 (IL-2R), IL-4 (IL-4R), IL-7 (IL-7R), IL-9 (IL-9R) et IL-15 (IL-15R) font partie de la famille des utilisateurs de la chaîne γ (gamma commune). Ces récepteurs sont constitués d'une chaîne α , d'une chaîne β ainsi que de la chaîne γ c, exprimée par tous les récepteurs de la famille. L'ablation de la chaîne γ c chez la souris (γ c^{-/-}) affecte le développement des cellules T et des cellules B. La différenciation des thymocytes est arrêtée aux stades DN2/DN3 (stade de la β

sélection). De plus, les souris $\gamma c^{-/-}$ ne possèdent pas de cellules T $\gamma\delta$ ni de cellules NK. L'IL-7 et l'IL-15 sont deux exemples de cytokines qui jouent des rôles particulièrement importants lors de la différenciation cellulaire (Malek *et al.*, 1999).

Les études effectuées sur les souris déficientes pour l'expression de l'IL-7R ou de l'IL-7 illustrent leur importance dans le développement des cellules T et B. Il a été démontré que l'activation du récepteur de l'IL-7 à la surface des thymocytes génère des signaux de survie et que les thymocytes DP sélectionnés positivement augmentent l'expression de l'IL-7R α à leur surface. L'IL-7R participe activement à la régulation à la hausse de Bcl-2 et à la progression du cycle cellulaire des thymocytes en développement (Akashi *et al.*, 1998). La signalisation induite par l'IL-7 semble également jouer un rôle dans l'aiguillage de la différenciation de thymocytes DP. Elle pourrait intervenir dans l'arrêt de la transcription du gène codant pour CD4 favorisant le développement de la lignée de thymocytes SP CD8 $^{+}$ (Yu *et al.*, 2003).

L'IL-2R et l'IL-15R partagent la chaîne γc et la chaîne IL-2R β . Cette organisation structurale pourrait indiquer que les signaux induits par l'activation de l'IL-2 ou l'IL-15 empruntent des voies communes à effets redondants. Cependant, les différentes études effectuées chez les souris déficientes pour l'IL-2 ou l'IL-15 indiquent clairement que ces deux cytokines jouent des rôles uniques *in vivo*. Les souris déficientes pour l'IL-2, l'IL-2R α ou l'IL-2R β développent des maladies autoimmunes. Cependant, uniquement les souris déficientes pour l'expression de l'IL-2R β ont un nombre réduit de lymphocytes T intraépithéliaux et ne possèdent aucune cellule NK fonctionnelle (Suzuki *et al.*, 1997). Il a donc été proposé que l'IL-2 semble coordonner l'état d'homéostasie nécessaire au développement des cellules dans le thymus tandis que l'IL-15 influence le développement extrathymique des cellules T et NK (DiSanto, 1997). D'autres études ont permis d'attribuer un rôle positif à l'IL-15 dans l'expansion et la survie de cellules T CD8 $^{+}$ à phénotype mémoire (Zhang *et al.*, 1998) ainsi que dans l'inhibition de l'apoptose chez les lymphocytes B, les lymphocytes T et les fibroblastes (Bulfone-Paus *et al.*, 1997).

5.4.2 Notch

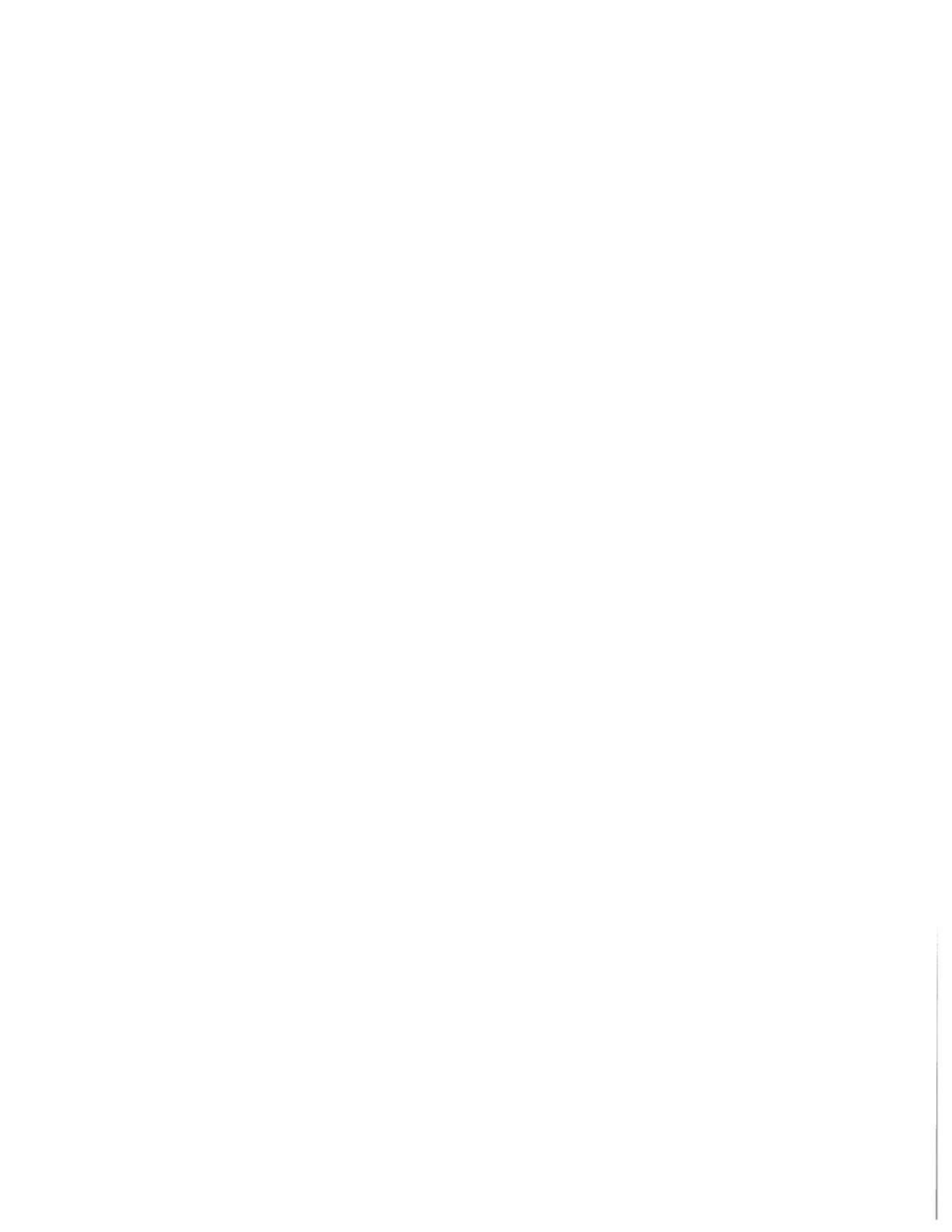
Chez la drosophile, le récepteur Notch est impliqué dans l'aiguillage de la différenciation des cellules précurseurs en cellules neuronales ou épidermales (Simpson, 1995). L'homologue de Notch chez les vertébrés existe et influence également le développement cellulaire. Notch-1 est fortement exprimé chez les thymocytes DN (Washburn *et al.*, 1997). Les signaux induits par l'activation de ce récepteur influencent la maturation des thymocytes immatures en lymphocytes TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$. En effet, une diminution de l'expression de Notch-1 dans les thymocytes DN favorise le développement des cellules TCR $\gamma\delta$ au détriment des cellules TCR $\alpha\beta$. De plus, la molécule Notch-1 semble essentielle au choix de différenciation des thymocytes DP en SP CD4⁺ versus SP CD8⁺. Des souris transgéniques qui expriment une forme constitutivement active de Notch-1 ont été générées par l'équipe de P. Salmon. Les thymocytes DP de ces souris mûrissent préférentiellement en SP CD8⁺ (Robey *et al.*, 1996). Les mécanismes précis, qui influencent le développement préférentiel des thymocytes DP en SP CD8⁺ via la signalisation induite par le récepteur Notch, demeurent objets à spéculations.

5.5 Voies de signalisation importantes pour le développement des thymocytes

L'activation des PTK p56Lck et Zap-70 est une étape importante dans le développement des thymocytes. En effet, l'inactivation de la kinase p56Lck empêche la maturation des thymocytes au stade DN2/DN3, stade précédant la formation du pré-TCR (Anderson et Perlmutter, 1995). L'inactivation de ZAP-70 empêche complètement la sélection positive et négative des thymocytes DP (Negishi *et al.*, 1995). Des études montrent que l'expression d'un transgène codant pour une forme constitutivement active de p56Lck, LckY505F, dans les thymus de souris RAG^{-/-} ou pT α ^{-/-} permet aux cellules de se différencier en thymocytes DP (Mombaerts *et al.*, 1994; Fehling *et al.*, 1997).

Par ailleurs, il a été rapporté que les différentes voies des MAPK soient ERK1/2, JNK et p38 jouent des rôles importants dans la prolifération, la maturation et

la régulation de l'activation de divers types cellulaires. Plus particulièrement, la voie MAP kinase p21 Ras joue un rôle de régulateur du développement des thymocytes. En effet, la voie Ras /Raf-1/MEK-1/ERK1/2 est responsable d'acheminer des signaux nécessaires à la différenciation des thymocytes DN à DP (Crompton *et al.*, 1996), à leur sélection positive (Alberola-Ila *et al.*, 1995) et à la maturation des thymocytes DP en SP CD4⁺ ou CD8⁺ (Sharp *et al.*, 1997). La signalisation impliquant les kinases ERK1/2 ne joue aucun rôle apparent au niveau de la sélection négative des thymocytes (Alberola-Ila *et al.*, 1995). Pour leur part, les voies MAPK JNK et p38 sont constitutivement activées dans les thymocytes DN et DP, activation probablement engendrée par les ligands présentés aux thymocytes par les cellules stromales (Sen *et al.*, 1996). Cependant, l'implication de ces voies de signalisation dans les processus de sélection positive et négative n'est pas entièrement élucidée.



ARTICLE

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Tous les résultats présentés dans l'article intitulé « Transgenic expression of Dok-1 interferes with T cell development and cytokine secretion » ont été générés par Ingrid Saba à l'exception de la figure 1. Les résultats exposés dans la figure 1 ont été obtenus par Anne Bramard.

Anne Bramard, stagiaire dans le laboratoire du Dr Duplay, a purifié l'anticorps anti-Dok-1 reconnaissant la forme murine de la protéine. Elle a également caractérisé l'expression de la protéine Dok-1 dans le thymus des souris de type sauvage (figure 1). De plus, elle a étudié le rôle de Dok-1 dans la signalisation induite par l'activation de CD2 chez les cellules T de la rate et du thymus (résultats non exposés).

Le Dr Pascale Duplay a supervisé le projet et a contribué à le mener à terme.

**Transgenic expression of Dok-1 interferes with T cell development
and cytokine secretion¹**

Ingrid Saba, Anne Bramard and Pascale Duplay²

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

Running title: Dok-1-mediated cytokine and T cell development regulation

Keywords: T cells, cell activation, cytokine, T cell development, signal
transduction

ABSTRACT

In T cells, two members of the Dok family, Dok-1 and Dok-2, are predominantly expressed. Recent evidence suggests that they play a specific role in signal transduction initiated by accessory receptors CD2 and CD28. To characterize the role of Dok-1 in T cell development and T cell functions, we have generated transgenic mice that overexpressed Dok-1 in thymocytes and peripheral T cells. We show that overexpression of Dok-1 retards the transition from the CD4⁻CD8⁻ to CD4⁺CD8⁺ stage. Moreover, there is a marked decrease in the CD4/CD8 ratio in peripheral T cells. Dok-1 overexpression does not seem to affect TCR-signaling of CD4⁺CD8⁺ thymocytes since TCR-induced upregulation of CD69 and CD5 expression is normal. In addition, CD4 and CD8 single-positive cells express normal levels of CD3. Dok-1 transgenic mature T cells show increased TCR-induced IFN- γ and decreased IL-2 production while their proliferation and IL-4 production are normal. Moreover, although we show that CD28 stimulation induces Dok-1 tyrosine phosphorylation, it does not modulate TCR-induced responses. Surprisingly, ERK1/2 activation is not substantially inhibited by Dok-1 overexpression. Taken together, these data provide evidence that Dok-1 is an important modulator of T cell-activation and development.

INTRODUCTION

Dok-1 (also known as p62Dok) is a prototype member of a newly identified family of adaptor molecules characterized by an amino-terminal PH domain, a central PTB domain and a carboxy-terminal domain rich in proline and tyrosine residues (1, 2). Five other members, Dok-2 (also known as Dok-R, FRIP or p56dok, 3-5), Dok-3 (also known as Dok-L, 6, 7), Dok-4, Dok-5 and Dok-6 (8-10) have been characterized. Dok-4, Dok-5 and Dok-6 define a subfamily within Dok proteins that is more related to the IRS family than the other Dok members (11).

In hematopoietic cells, Dok-1, Dok-2 and Dok-3 are preferentially expressed and are implicated in the negative regulation of signaling through growth factor, cytokine, chemokine and immunoreceptors (reviewed in 12, 13). Tyrosine phosphorylation of Dok is required to generate binding site for SH2-domain containing inhibitory molecules such as RasGAP (1). In many examples, phosphorylation of Dok occurs following its recruitment to the plasma membrane and requires the presence of an intact PH domain. The PTB domain contributes also to the recruitment of Dok to the membrane by interacting with receptors such as EGFR, Tie, Ret and IL4-R (3, 14, 15).

In T cells, both Dok-1 and Dok-2 are expressed. CD2 or CD28 stimulation, but not CD3 stimulation, specifically increases Dok-1 phosphorylation and induces membrane translocation of Dok-1 protein (16, 17). Moreover, co-ligation of CD28 or CD2 with the TCR has been shown to induce dephosphorylation of Dok (16, 18). Recent evidence suggests that Dok proteins play a negative role in CD2 and CD28 signaling pathways. In Jurkat cells, overexpression of Dok-1 led to the specific inhibition of CD2-mediated ERK1/2 activation (19). Moreover, in transient assays, overexpression of Dok-1 or Dok-2 inhibits the CD28/TCR induced-IL-2 promoter activity (20). Dok-mediated RasGAP recruitment to the proximity of Ras is likely responsible for the attenuation of ERK1/2 signaling. Analysis of Dok-1 deficient mice supports also the involvement of Dok-1 in the negative regulation of T cell proliferation (21). ConA-induced proliferation of Dok-1^{-/-} thymocytes is increased compared to wild-type (WT) thymocytes. Moreover,

chemotaxis to CXCL12/CXCR4 is significantly enhanced in Dok-1^{-/-} splenic T cells (22). Nevertheless, absence of Dok-1 does not lead to obvious defect in T cell development as judged by cytometry analysis of cells from peripheral blood, spleen and thymus (21). Recently, Dok-1/Dok-2 knockout mice have been generated but the characterization of the T cell development and T cell responses of these mice has not been yet reported (23, 24). Therefore, the possibility that Dok-1 and Dok-2 play some redundant functions remains open.

As a negative regulator of the ERK1/2 activation pathway, Dok-1-mediated signaling may contribute to the mechanism that control T cell proliferation. Moreover, it may play an important role in thymocyte development since ERK signaling is involved in pre-TCR signaling (25), in positive selection (26) and in CD4/CD8 lineage commitment (27-29). In support to this hypothesis, overexpression of Dok-2 in thymocytes inhibited the transition of CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN) to CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) thymocytes (30). To investigate the role of Dok-1 in primary T cells, we generated transgenic mice overexpressing human Dok-1 under the control of the CD2 promoter leading to transgene expression in thymocytes and mature T cells. Our data suggest that Dok-1 might be an important regulator of pre-TCR-mediated thymocyte development and TCR-induced cytokine secretion.

MATERIALS AND METHODS

DNA constructs

The 1.9 kbp Kpn I-Not I fragment containing human Dok-1 cDNA was excised from pUD and inserted into MT073 plasmid harboring a hemagglutinin (HA) tag. The HA-Dok-1 sequence was excised from MT073-HA Dok-1 by Sma I-Hinc II digestion and inserted into the Sma I site of human CD2 VA expressing vector (kindly provided by Dr. D. Kioussis, 31). The resulting construct was named pCD2-HA Dok-1.

Mice

C56BL/6 mice were obtained from the Jackson Laboratories. Transgenic mice overexpressing Dok-1 protein were generated at the McIntyre Transgenic Core Facility (McGill University, Canada). Prokaryotic DNA sequence pBS SK- from pCD2-HADok-1 plasmid was removed by a Sac II-Cla I digestion prior to microinjection. The purified fragment was microinjected into fertilized eggs of (CBA x C57BL/6) F1 mice. Mice were backcrossed to C57BL/6 for at least 6 generations to be on a C57BL/6 genetic background.

Identification of transgenic founders

Transgenic founders were identified by PCR performed on genomic DNA from mice tails using primers specific for a 5' and a 3' sequence of human Dok-1 coding sequence. A set of primers specific for FasL was used as an internal control of the PCR reaction. To assess quantitatively the number of transgene copy incorporated, Southern blots on tail genomic DNA were performed with a 600 pb probe specific for a 5' coding sequence of Dok-1 cDNA and with a 852 pb probe specific for FasL as a control. Transgene expression was also evaluated by immunoblotting total lysates

from thymocytes and splenocytes with anti-human Dok-1 Abs. Transgenic mice were backcrossed to C57BL/6 and transmission rate was analyzed by PCR.

Antibodies and reagents

Anti-CD28 mAb (clone 37.51) and anti-TCR β mAb (clone H57-597) were kindly provided by J. Allison (U C Berkeley, CA) and were purified from hybridoma culture on G protein Hi-Trap affinity columns (Pharmacia Amersham). Anti-CD2 (clone RM2-5), PE-anti-CD4 (clone RM4-5), FITC-CD8 α (clone 53-6.7), FITC-CD25 (clone PC61.5), PE-CD44 (clone IM7), biotinylated antibodies against mouse CD3 ϵ (clone 145-2C11), CD8 α (clone 53-6.7), CD5 (clone 53-7.3), CD69 (clone H1.2F3) and CD62L (clone MEL-14) were purchased from eBioscience. Biotin anti-CD4 was obtained from purified hybridoma culture MT4 on G protein column and biotinylated with EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce Biotechnology) according to manufacturer's instructions. Streptavidin-Red 670 is from GibcoBRL Life technology. Anti-phospho ERK1/2 and anti-total ERK1/2 were purchased from Cell Signaling Technology. Anti-human Dok-1 antibodies directed against amino acids 260-482 were raised in our laboratory as previously described (19). 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). Mouse and human anti-Dok-1 Abs were affinity purified on the corresponding GST columns.

Flow cytometry analysis

Cell suspensions from thymus and spleen were prepared as previously described (32). Red blood cells were removed using ACK lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃ and 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2). Cells were incubated with Abs in PBS 1x pH 7.4, FBS 1% on ice for 30 min. Viable cells (determined by propidium iodide

staining) were acquired on a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson) and FACS analysis was performed using CellQuest software.

Proliferation assays

T cells were purified from spleen by negative selection using pan-T cells microbeads from Miltenyi Biotec. CD8⁺ cells are then positively selected with anti-CD8 microbeads. The remaining cells fraction is the CD4⁺ cells. Positive or negative cell populations were separated on a MACS LS column according to the manufacturer's instructions. Cell preparations were over 90 % pure as determined by flow cytometry analysis. Proliferation assays were performed in 200 μ l culture medium containing 10% FBS (Sigma), 50 μ M 2-ME (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10 mM HEPES, pH 7.3, and 0.1 mM nonessential amino acid. At least 2.0×10^5 cells were stimulated for 48 h in 96-well plates precoated overnight at 4 °C with Ab (50 μ l/well of 0.2 to 1 μ g/ml anti-TCR or 5 to 10 μ g/ml anti-CD28). Stimulation with a combination of PMA (10 ng/ml) and ionomycin (250 ng/ml) was also performed. Cells were then pulse chased with 2 μ Ci/ml [³H] thymidine (ICN Biomedicals Inc). Data are expressed as CPM with a mean and standard deviation of triplicate cultures.

Cell stimulation, immunoprecipitations and immunoblot analysis

Purified cells were washed in RPMI 1640 and resuspended at 4×10^7 cells/ml in RPMI-1640. Cells were left unstimulated or stimulated with anti-TCR or anti-CD3 (10 μ g/ml), CD28 (20 μ g/ml) for 30 minutes on ice and then washed and Ig were crosslinked at 37 °C with a goat anti-hamster antibody (30 μ g/ml, Jackson ImmunoResearch Inc). Cells were harvested and lysed in 1% NP-40 containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM MgCl₂ and 1mM EGTA in the presence of protease and phosphatase inhibitors. Immunoprecipitations and immunoblotting were performed as previously described (19).

Cytokine secretion

Purified CD4⁺ T cells were purified by negative selection using pan-T cells and anti-CD8 microbeads from Miltenyi Biotec. CD4⁺ cells were left unstimulated or stimulated with anti-TCR, anti-TCR plus anti-CD28 antibodies or a combination of PMA/Ionomycin in 96-well plastic plates. After 48 h, supernatants were assayed for IL-2, IL-4 and IFN- γ production with an ELISA as specified by the manufacturers (Pharmingen, BD Biosciences).

RESULTS

Expression of Dok-1 in thymocyte subsets and mature T cells

To analyze the pattern of Dok-1 expression during thymocyte development, we separated thymocyte subsets on the basis of their CD4 and CD8 expression using positive and negative magnetic beads separation methods. As shown in Figure 1, Dok-1 was expressed at each stage of thymocyte development at roughly equivalent levels. In addition, mature splenic T cells expressed similar levels of Dok-1 than thymocytes. Expression of Dok-1 in both immature and mature T cells might indicate that Dok-1 regulates both differentiation and activation of T cells.

Generation of transgenic mice

In order to determine the functional effects of increased expression of Dok-1 on T cell development and mature T cell functions, we generated transgenic mice overexpressing human Dok-1 under the control of the human CD2 promoter and locus control region (LCR). The CD2-LCR vector drives expression of the transgene in DN thymocytes and throughout thymocyte development (31). Of 10 transgenic founder lines, 2 lines (Tg82 and Tg104) expressing the highest levels of Dok-1 were chosen for further studies. Transgenic Dok-1 is expressed at higher levels in thymocytes than in mature T cells (Fig. 2).

Overexpression of Dok-1 interferes with thymocyte development

The impact of expression of the Dok-1 transgene on T lineage cell development was first evaluated on the basis of CD4 and CD8 expression both in term of percentage and cellularity (Fig. 3A). There were a 10 to 15-fold increase in the percentage of DNs and a 1.5-fold decrease in the percentage of DPs in Dok-1 transgenic mice compared to littermate controls. The absolute number of cells in SP and DP thymocyte subsets was decreased but remains unchanged in the DN subset (Fig. 3B). These results indicate that overexpression of Dok-1 in thymocytes leads to a development block at the DN to DP transition. The developmental stages of DN thymocytes were analyzed based on the surface expression of CD25 and CD44. There was an increase in the DN3 (CD44⁻CD25⁺) subset with a concomitant decrease in the DN4 (CD44⁻CD25⁻)

subset (Fig. 3C). A block in the DN3 stage to the DN4 stage might indicate that pre-TCR signaling is defective implying that Dok-1 mediates a negative signal through the pre-TCR. Thymic selection seems to occur normally as judged by CD3, CD5 and CD69 expression on SP and DP thymocytes (Fig. 4A).

To analyze in more details signaling through the TCR at the DP stage, enriched DP were stimulated with anti-TCR or anti-TCR plus anti-CD28 antibodies. CD69 and CD5 expression was analyzed after 12 h of cultures (Fig. 4B). In all these conditions, CD69 and CD5 upregulation occurred normally. These results suggest that Dok-1 overexpression does not interfere with TCR-dependent signaling required for selection of DP thymocytes.

Dok-1 overexpression interferes with cytokine secretion of mature T cells

Consistent with a defect in thymic development, there were fewer T cells in the spleen of transgenic mice than in littermate controls (Fig. 5A and 5B). Analysis of T cell subpopulation in the spleen showed that there was a marked decrease in the ratio of CD4⁺/CD8⁺ cells (Fig. 5C). This CD8 skewing is more marked in the spleen than in the thymus (Fig. 3 and 5).

To study the effects of Dok-1 overexpression in mature T cells, we examined several TCR-dependent responses of CD4⁺ or CD8⁺ splenic T cells. Importantly, normal levels of cell surface CD3 were present in splenic T cells overexpressing Dok-1 (data not shown). As we showed for thymocytes, TCR-induced upregulation of CD69 of CD4⁺ splenic cells was similar in mice overexpressing Dok-1 and littermate controls (Fig. 6A). Addition of anti-CD28 antibodies did not interfere with TCR-induced CD69 upregulation of Dok-1 overexpressing T cells (Fig. 6A). Since Dok-1 has been shown to be a negative regulator of proliferation, we also compared the proliferative potential of splenic T cells isolated from Dok-1 transgenic mice and littermate controls. CD4⁺ or CD8⁺ Dok-1 transgenic T cells exhibited no reduction in [³H] thymidine incorporation following TCR, TCR plus CD28 or PMA plus ionomycin stimulation (Fig. 6B).

The influence of Dok-1 overexpression on TCR-induced cytokine secretion was also evaluated (Fig 7). In CD4⁺ T cells, overexpression of Dok-1 induced a significant reduction in IL-2 secretion in response to anti-TCR or anti-TCR plus anti-CD28 (Fig.

7). IL-2 secretion in response to PMA plus ionomycin was comparable to WT cells indicating that Dok-1 overexpression did not cause a global unresponsiveness of the cells. Dok-1 overexpression did not affect significantly IL-4 secretion in response to TCR or TCR plus CD28 stimulation. By contrast, in presence of PMA plus ionomycin, IL-4 secretion was greatly enhanced in cells overexpressing Dok-1. Unexpectedly, IFN- γ secretion was enhanced in CD4⁺ T cells overexpressing Dok-1 (Fig. 7). In CD8⁺ splenic T cells, a similar increase in TCR and TCR plus CD28-induced IFN- γ secretion was observed (data not shown).

To determine whether a functional or a developmental defect was responsible for the increase in TCR-induced IFN- γ secretion in cells overexpressing Dok-1, we analyzed the activation/memory status as reflected by the expression of early activation markers (CD25 and CD69) and memory markers (CD44 and CD62L). In both Dok-1 transgenic lines, most peripheral CD8⁺ expressed high levels of CD44 but normal levels of CD25, CD69 and CD62L (Fig. 5, Fig. 8, and data not shown). For CD4⁺ cells, the percentage of cells expressing high levels of CD44 varied with Dok-1 transgene expression. (Fig. 8). In transgenic line 104, most of the CD4⁺ cells in the spleen expressed high levels of the memory marker CD44. By contrast, in transgenic line 82 that expressed less Dok-1 than line 104 CD44 expression in CD4⁺ cells was similar to those in littermate controls.

These results suggest that the levels of expression of Dok-1 influence the memory status of T cells in the spleen, CD8⁺ cells being more sensitive. Nevertheless, since in CD4⁺ cells of Tg82, there was no difference in the percentage of memory-type T cells between WT and Dok-1 transgenic mice, the cytokine defect observed in Dok-1 transgenic mice is unlikely caused by an increase in the memory-type T cell population.

Dok-1 overexpression does not inhibit CD3- or CD28-induced ERK1/2 activation

Tyrosine phosphorylation is required for Dok-mediated inhibitory effects. In human Jurkat cells, CD2 or CD28 but not CD3 stimulation has been shown to induce Dok-1 phosphorylation (17). To examine whether the same stimuli induced Dok-1

phosphorylation in mouse T cells, purified splenic T cells were activated with CD28. Upon CD28 stimulation, phosphorylation of Dok-1 was increased in T cells from Dok-1 transgenic mice and littermate controls (Fig. 9). It should be noted that in unstimulated T cells, the higher level of Dok-1 phosphorylation in Dok-1 transgenic cells than in control cells likely reflects the basal phosphorylation state and increased amount of Dok-1. As reported previously in cell lines, CD3 stimulation of splenic T cells did not lead to Dok-1 phosphorylation (data not shown and 17). In addition, we were not able to detect Dok-1 phosphorylation following CD2 crosslinking with mAbs (data not shown). This result may reflect the difference in CD2 function between mice and humans. Indeed, while CD2 facilitates cell adhesion in humans and mice, it is a direct promoter of T cell activation only in humans (33). Dok-1 is a negative regulator of ERK1/2 signaling pathway (reviewed in 12, 13). Therefore, to define the molecular basis of the defects in maturation and cytokine production of Dok-1 transgenic T cell, we analyzed the extent of ERK1/2 activation of thymocytes or splenic T cells upon stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs used alone or in combination. Surprisingly, ERK1/2 phosphorylation in unstimulated and stimulated cells was comparable in Dok-1 transgenic and transgene-negative DP thymocytes and purified T cells (Fig. 10). Therefore, overexpression of Dok-1 does not seem to interfere with ERK1/2 activation of thymocytes or mature T cells.

DISCUSSION

Our study demonstrates that overexpression of Dok-1 in thymocytes interferes with T cell development. Indeed, it causes a partial developmental block at the DN to DP transition, likely at DN3 (CD44⁺CD25⁻)/DN4 (CD44⁻CD25⁻) transition stage. The pre-TCR complex is required for the transition from the DN3 to the DN4 stage (reviewed in 34). In addition, at the pre-TCR-dependent stage, the contribution of several molecules such as the src-kinases Lck and Fyn (35, 36) and the adapter proteins LAT (37), SLP-76 (38), GADS (39) and Shc (40) is essential for cells to proceed to the DP stage. The ras/ERK MAPK pathway represents a downstream effector of the pre-TCR signaling cascade (41). DN to DP transition likely implicates other pathways such as cytokine signaling pathways that may either cooperate or function independently of the pre-TCR (reviewed in 42). ERK activation in response to CD3, or CD3 plus CD28 crosslinking was normal in CD4⁺CD8⁺ thymocytes from Dok-1 transgenic mice. Moreover, TCR-induced CD69 expression, a Ras-dependent response (43), is comparable in CD4⁺CD8⁺ thymocyte from Dok-1 transgenic mice or littermate controls. Therefore, the modulation of ERK activity by Dok-1 overexpression is not likely the mechanism involved in Dok-1-mediated inhibition of thymocyte development. The absence of ERK inhibition by Dok-1 overexpression following CD3 stimulation was expected since we have shown in Jurkat cell line that Dok-1 overexpression inhibited CD2-induced ERK activation but not CD3-induced ERK activation (19). Relocalization of RasGAP in the proximity of Ras is likely the mechanism involved in Dok-1 mediated inhibition of ERK1/2 signaling pathway since CD2 but not CD3 stimulation induces a Dok-mediated recruitment of RasGAP to the plasma membrane (19). This event requires phosphorylation of Dok-1 on tyrosine residues that act as SH2 acceptor site for RasGAP (1, 2). Here, we show that CD28 stimulation induces Dok-1 phosphorylation but has no appreciable effect on ERK1/2 kinase activation. These observations raise the possibility that Dok-1 mediated its inhibitory effect by a mechanism distinct from recruitment of RasGAP. It is also conceivable that CD28-induced phosphorylation of Dok-1 occurred at tyrosine residues not involved in the binding of RasGAP. Other negative regulators such as Csk and SHIP are recruited by tyrosine-phosphorylated Dok-1 (7, 44, 45). In

particular, membrane recruitment of Csk by Dok-1 might be involved in Dok-1-mediated negative effect on T cell development. Indeed, Csk at least in part by the negative effect on src-family protein kinase is a key component in the control of T maturation (46). Phosphorylated Dok-1 has been shown to bind to the SH2 domain of Lck (17). Therefore, it is also possible that Dok-1 down-modulates Lck kinase activity by a direct mechanism as it has been recently described for Dok-1/Tec kinase interaction (20). Additional studies will be necessary to identify the mechanisms and the molecular interactions involved in Dok-1 mediated inhibition of T cell maturation.

Overexpression of Dok-1 interferes also with the ratio of CD4/CD8 T cells present in the periphery as reflected by an increased proportion of CD8⁺ cells. This result might indicate that Dok-1 regulates differentially the survival and/or proliferation of the CD4⁺ and the CD8⁺ subsets. Alternatively but not exclusively, Dok-1 might interfere with cell fate decisions associated with positive selection. *In vitro* proliferation of mature CD8 and CD4 T cells is comparable in WT and Dok-1 transgenic mice. Therefore, Dok-1 overexpression does not seem to interfere with proliferation. Differentiation of T cells to the CD4 or CD8 lineage in the thymus is regulated to some degree by the "length and strength" of intracellular signaling, with CD4 lineage commitment associated with stronger or more prolonged signaling than CD8 lineage commitment (reviewed in 42). Therefore, the inhibitory effect of Dok-1 on signaling might favor the development of CD8 lineage cells.

This study provides evidence that Dok-1 regulates differentially IL-2, IL-4 and IFN- γ production by CD4⁺ T cells. The inhibition of CD3-induced IL-2 secretion is in agreement with our previous results in Jurkat cells. Indeed, we have shown that overexpression of Dok-1 inhibited CD3-induced NFAT activation and IL-2 secretion by a mechanism that did not inhibit calcium mobilization or ERK1/2 activation (19). While overexpression of Dok-1 was capable of increasing IFN- γ production, it did not change substantially IL-4 production of CD4⁺ cells stimulated by TCR. This result might indicate that Dok-1 is capable of modulating specifically transcription factors involved in regulation of Th effector cytokine expression. One potential target for such regulation is T-bet since it is a potent inducer of IFN- γ production but a repressor of IL-2 transcription (47). Alternatively, but not exclusively, mature T cells might differ from normal T cells due to developmental difference during thymic maturation.

Although the underlying mechanisms by which Dok-1 has an impact on cytokine secretion remain to be defined, our results reveal a potential role of Dok-1 in the differentiation of Th cells.

Our data indicate that Dok-1 is not only involved in signaling pathways initiated through CD2 and CD28 accessory receptors but also participates in the TCR-induced signaling cascade. Although CD3 stimulation does not increase Dok-1 phosphorylation, other modifications such as serine phosphorylation might be important for Dok-1 to exert its function on downstream events (48). Alternatively, basal levels of Dok phosphorylation in Dok-1 overexpressing cells might be sufficient for Dok-1-mediated negative effects. This interpretation would explain why CD28 costimulation did not potentiate Dok-1-mediated effect initiated through the TCR/CD3 complex in our cytokine release assays.

What is the physiological role of Dok-1? Dok-mediated signaling may contribute to the mechanisms that down-regulate the strength and/or the duration of the signal elicited by the pre-TCR and the TCR during thymocyte maturation and mature T cell responses. In addition accessory receptors such as CD28 likely generate Dok-mediated signals that might participate in the modulation of the TCR-initiated response. Although we were not able to demonstrate CD2-induced Dok-1 phosphorylation in primary murine T cells using anti-CD2 antibodies available, the participation of CD2 in the Dok signaling pathway in mice remains an open question. Consistent with a role of B7/CD28 and CD2/CD48 interaction in thymocyte differentiation, both CD2 and CD28 are expressed on pre-TCR bearing thymocytes and throughout thymocyte development (49, 50). Although lack of CD2 or CD28 does not lead to obvious defect in the development of T cells, CD2 and CD28 receptors play important regulatory roles in the differentiation of thymocytes. For example, CD2 acts as a negative regulator of thymocyte sensitivity to positive selection signals and as a positive regulator in facilitating the transition from DN to DP (51-53). Moreover, high levels of expression of human CD2 in transgenic mice had profound effect on thymocyte differentiation (54). The role of CD28 in thymocyte selection is not well established. There is evidence that CD28 promotes negative selection in certain conditions (55, 56). B7 overexpression in transgenic mice result in a CD28-dependant increase in the proportion of CD8⁺ cells (57). Recently, like CD2, a negative regulatory role for CD28 in inhibiting thymic differentiation of

SP thymocytes has been reported (58). Regarding mature T cells, the critical positive roles for B7/CD28 costimulatory signaling in antigen-specific activation and for CD2 in mediating T cell adhesion has been well demonstrated in mice (59-62). These examples illustrate the capacity of CD28 and CD2 to generate both positive and negative signals in thymocytes that may be distinct from those generated in mature T cells.

The contribution of Dok-1 in the CD2 and CD28-mediated signaling events is still elusive. Mice deficient for Dok-1 have been recently generated (21, 63). Absence of Dok-1 expression in T cells does not lead to obvious defect in T cell development as monitored by flow cytometry analysis of Dok-1^{-/-} thymocytes and splenocytes (21). Dok-1^{-/-} thymocytes stimulated with concanavalin A and IL-2 show enhanced proliferation compared to normal cells. This observation is in agreement with a role of Dok-1 in negative regulation of thymocyte proliferation. The role of Dok-1 in mature T cell functions has not been yet studied in Dok1^{-/-} mice. As mentioned above, T cells express another member of the Dok family, Dok-2. Constitutive expression of Dok-2 in bone marrow cells inhibits the transition from DN to DP of thymocytes in reconstituted mice (30). Therefore, the potential functional redundancy of Dok-1 and Dok-2 at least in thymic maturation suggests that the remaining expression of Dok-2 in Dok1^{-/-} T cells might compensate for the absence of Dok-1. This issue will be resolved by the characterization of thymic development and T cell responses in Dok-1 and Dok-2 deficient mice that were generated very recently (23, 24).

In conclusion, our studies have revealed an important role of Dok-1 in modulating TCR-induced responses. Dok-1 overexpression did not cause a global defect in T cell activation. While it inhibited IL-2 and enhanced IFN- γ secretion, it had not impact on IL-4 secretion or *in vitro* proliferation of T cells. The molecular characterization of specific Dok-mediated signaling events will provide a mean to modulate the strength and potentially the outcome of T cell activation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs E. Reinherz, J. P. Allison, D. Kioussis and J. Nunes for generous gifts of reagents and Dr. M. L. Tremblay for the generation of transgenic mice.

FOOTNOTES

1. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

PD is a recipient of a CIHR New Investigator Award.

2. Address correspondence and reprint request to Dr. Pascale Duplay, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval QC, H7V 1B7, Canada . E-mail : pascale.duplay@iaf.inrs.ca

3. The abbreviations used are: DN, double-negative; DP, double-positive; SP, single-positive; PTB, phosphotyrosine-binding; PH, pleckstrin homology; Dok, downstream of tyrosine kinase; SH, Src homology; RasGAP, Ras GTP-ase-activating protein; WT, wild-type.

REFERENCES

1. 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.
2. Yamanashi, Y. and D. Baltimore. 1997. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell* 88:205.
3. Jones, N. and D. J. Dumont. 1998. The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R. *Oncogene* 17:1097.
4. Nelms, K., A. L. Snow, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 1998. FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation. *Immunity* 9:13.
5. Di Cristofano, A., N. Carpino, N. Dunant, G. Friedland, R. Kobayashi, A. Strife, D. Wisniewski, B. Clarkson, P. P. Pandolfi, and M. D. Resh. 1998. Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 273:4827.
6. Cong, F., B. Yuan, and S. P. Goff. 1999. Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling. *Mol. Cell. Biol.* 19:8314.
7. Lemay, S., D. Davidson, S. Latour, and A. Veillette. 2000. Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 20:2743.
8. Grimm, J., M. Sachs, S. Britsch, S. Di Cesare, T. Schwarz-Romond, K. Alitalo, and W. Birchmeier. 2001. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J. Cell. Biol.* 154:345.
9. Favre, C., A. Gerard, E. Clauzier, P. Pontarotti, D. Olive, and J. A. Nunes. 2003. DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells. *Genes Immun.* 4:40.
10. Crowder, R. J., H. Enomoto, M. Yang, E. M. Johnson, Jr., and J. Milbrandt. 2004. Dok-6, a novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*

11. Cai, D., S. Dhe-Paganon, P. A. Melendez, J. Lee, and S. E. Shoelson. 2003. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J. Biol. Chem.* 278:25323.
12. Janssen, E. and W. Zhang. 2003. Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* 15:269.
13. Veillette, A. 2004. Specialised adaptors in immune cells. *Curr Opin Cell Biol* 16:146.
14. Jones, N. and D. J. Dumont. 1999. Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required for attenuation of Erk MAP kinase activation. *Curr. Biol.* 9:1057.
15. Murakami, H., Y. Yamamura, Y. Shimono, K. Kawai, K. Kurokawa, and M. Takahashi. 2002. Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 277:32781.
16. Michel, F., G. Attal-Bonnefoy, G. Mangino, S. Mise-Omata, and O. Acuto. 2001. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity* 15:935.
17. Nemorin, J. G. and P. Duplay. 2000. Evidence that lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. *J. Biol. Chem.* 275:14590.
18. Martelli, M. P., J. Boomer, M. Bu, and B. E. Bierer. 2001. T cell regulation of p62 (dok) (Dok1) association with Crk-L. *J. Biol. Chem.* 276:45654.
19. Nemorin, J. G., P. Laporte, G. Berube, and P. Duplay. 2001. p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. *J. Immunol.* 166:4408.
20. Gerard, A., C. Favre, F. Garcon, J. G. Nemorin, P. Duplay, S. Pastor, Y. Collette, D. Olive, and J. A. Nunes. 2004. Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase. *Oncogene* 23:1594.
21. Di Cristofano, A., M. Niki, M. Zhao, F. G. Karnell, B. Clarkson, W. S. Pear, L. Van Aelst, and P. P. Pandolfi. 2001. p62 (dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl). *J. Exp. Med.* 194:275.
22. 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.
23. 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.
 24. Yasuda, T., M. Shirakata, A. Iwama, A. Ishii, Y. Ebihara, M. Osawa, K. Honda, H. Shinohara, K. Sudo, K. Tsuji, H. Nakauchi, Y. Iwakura, H. Hirai, H. Oda, T. Yamamoto, and Y. Yamanashi. 2004. Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J. Exp. Med.* 200:1681.
 25. Michie, A. M., S. Trop, D. L. Wiest, and J. C. Zuniga-Pflucker. 1999. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by the pre-T cell receptor in developing thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 190:1647.
 26. Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur. 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286:1374.
 27. Sharp, L. L., D. A. Schwarz, C. M. Bott, C. J. Marshall, and S. M. Hedrick. 1997. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity* 7:609.
 28. Sharp, L. L. and S. M. Hedrick. 1999. Commitment to the CD4 lineage mediated by extracellular signal-related kinase mitogen-activated protein kinase and lck signaling. *J. Immunol.* 163:6598.
 29. Bommhardt, U., M. A. Basson, U. Krummrei, and R. Zamoyska. 1999. Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J. Immunol.* 163:715.
 30. Gugasyan, R., C. Quilici, S. T. I, D. Grail, A. M. Verhagen, A. Roberts, T. Kitamura, A. R. Dunn, and P. Lock. 2002. Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites. *J. Cell. Biol.* 158:115.
 31. Zhumabekov, T., P. Corbella, M. Tolaini, and D. Kioussis. 1995. Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J Immunol Methods* 185:133.
 32. 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.
33. van der Merwe, P. A. 1999. A subtle role for CD2 in T cell antigen recognition [see comments]. *J. Exp. Med.* 190:1371.
 34. von Boehmer, H., I. Aifantis, J. Feinberg, O. Lechner, C. Saint-Ruf, U. Walter, J. Buer, and O. Azogui. 1999. Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 11:135.
 35. Groves, T., P. Smiley, M. P. Cooke, K. Forbush, R. M. Perlmutter, and C. J. Guidos. 1996. Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development. *Immunity* 5:417.
 36. van Oers, N. S., B. Lowin-Kropf, D. Finlay, K. Connolly, and A. Weiss. 1996. alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* 5:429.
 37. Zhang, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. DeJarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, H. C. Tsay, H. M. Jacobs, C. M. Kessler, E. O. Long, P. E. Love, and L. E. Samelson. 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10:323.
 38. Pivniouk, V., E. Tsitsikov, P. Swinton, G. Rathbun, F. W. Alt, and R. S. Geha. 1998. Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell* 94:229.
 39. Yoder, J., C. Pham, Y. M. Iizuka, O. Kanagawa, S. K. Liu, J. McGlade, and A. M. Cheng. 2001. Requirement for the SLP-76 adaptor GADS in T cell development. *Science* 291:1987.
 40. Zhang, L., V. Camerini, T. P. Bender, and K. S. Ravichandran. 2002. A nonredundant role for the adapter protein Shc in thymic T cell development. *Nat Immunol* 3:749.
 41. Crompton, T., K. C. Gilmour, and M. J. Owen. 1996. The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Cell* 86:243.
 42. Berg, L. J. and J. Kang. 2001. Molecular determinants of TCR expression and selection. *Curr. Opin. Immunol.* 13:232.
 43. D'Ambrosio, D., D. A. Cantrell, L. Frati, A. Santoni, and R. Testi. 1994. Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. *Eur. J. Immunol.* 24:616.

44. van Dijk, T. B., E. van Den Akker, M. P. Amelsvoort, H. Mano, B. Lowenberg, and M. von Lindern. 2000. Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. *Blood* 96:3406.
45. Neet, K. and T. Hunter. 1995. The nonreceptor protein-tyrosine kinase CSK complexes directly with the GTPase-activating protein-associated p62 protein in cells expressing v-Src or activated c-Src. *Mol. Cell. Biol.* 15:4908.
46. Schmedt, C., K. Saijo, T. Niidome, R. Kuhn, S. Aizawa, and A. Tarakhovsky. 1998. Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells. *Nature* 394:901.
47. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655.
48. Lee, S., C. Andrieu, F. Saltel, O. Destaing, J. Auclair, V. Pouchkine, J. Michelon, B. Salaun, R. Kobayashi, P. Jurdic, E. D. Kieff, and B. S. Sylla. 2004. IkappaB kinase beta phosphorylates Dok1 serines in response to TNF, IL-1, or gamma radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:17416.
49. Duplay, P., D. Lancki, and J. P. Allison. 1989. Distribution and ontogeny of CD2 expression by murine T cells. *J Immunol* 142:2998.
50. Gross, J. A., E. Callas, and J. P. Allison. 1992. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol* 149:380.
51. Teh, S. J., N. Killeen, A. Tarakhovsky, D. R. Littman, and H. S. Teh. 1997. CD2 regulates the positive selection and function of antigen-specific CD4-CD8+ T cells. *Blood* 89:1308.
52. Sasada, T. and E. L. Reinherz. 2001. A critical role for CD2 in both thymic selection events and mature T cell function. *J. Immunol.* 166:2394.
53. Sasada, T., H. Yang, and E. L. Reinherz. 2002. CD2 facilitates differentiation of CD4 Th cells without affecting Th1/Th2 polarization. *J. Immunol.* 168:1113.
54. Melton, E., N. Sarner, M. Torkar, P. A. van der Merwe, J. Q. Russell, R. C. Budd, C. Mamalaki, M. Tolaini, D. Kioussis, and R. Zamoyska. 1996. Transgene-encoded human CD2 acts in a dominant negative fashion to modify thymocyte selection signals in mice. *Eur. J. Immunol.* 26:2952.

55. Buhlmann, J. E., S. K. Elkin, and A. H. Sharpe. 2003. A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol* 170:5421.
56. Gao, J. X., H. Zhang, X. F. Bai, J. Wen, X. Zheng, J. Liu, P. Zheng, and Y. Liu. 2002. Perinatal blockade of b7-1 and b7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells. *J Exp Med* 195:959.
57. Yu, X., S. Fournier, J. P. Allison, A. H. Sharpe, and R. J. Hodes. 2000. The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis. *J. Immunol.* 164:3543.
58. Vacchio, M. S., J. A. Williams, and R. J. Hodes. 2005. A novel role for CD28 in thymic selection: elimination of CD28/B7 interactions increases positive selection. *Eur. J. Immunol.* 35:418.
59. Shahinian, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kundig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. S. Ohashi, C. B. Thompson, and T. W. Mak. 1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261:609.
60. Green, J. M., P. J. Noel, A. I. Sperling, T. L. Walunas, G. S. Gray, J. A. Bluestone, and C. B. Thompson. 1994. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1:501.
61. Kundig, T. M., A. Shahinian, K. Kawai, H. W. Mittrucker, E. Sebzda, M. F. Bachmann, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. 1996. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 5:41.
62. Bachmann, M. F., M. Barner, and M. Kopf. 1999. CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. *J. Exp. Med.* 190:1383.
63. Yamanashi, Y., T. Tamura, T. Kanamori, H. Yamane, H. Nariuchi, T. Yamamoto, and D. Baltimore. 2000. Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. *Genes Dev.* 14:11.

FIGURES AND FIGURE LEGENDS

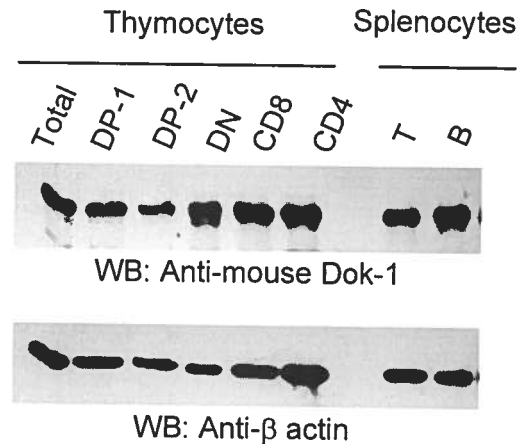


Figure 1: Dok-1 expression levels in thymocytes and splenocytes

DP thymocytes were enriched either by anti-CD4 microbeads (DP-1) or anti-CD8 microbeads (DP-2). Cells that did not bind to the CD4-microbeads were further purified with anti-CD8 microbeads and correspond to the CD8⁺ single-positive (SP) subpopulation (CD8). Cells that did not bind to the CD8-microbeads were further purified with anti-CD4 microbeads and correspond to the CD4⁺ SP subpopulation (CD4). Cells that remained after the CD4 and CD8 positive selection procedures were pooled and correspond to the DN subpopulation (DN). B and T cells from spleen were positively separated with anti-CD19 and anti-CD90 microbeads respectively. Purity of the various populations was determined by flow cytometry analysis and was > 90% for each subset purified. Lysates, from equivalent cell numbers, from thymocytes or splenocytes of WT mice were analyzed by immunoblotting with anti-mouse Dok-1 antibodies. Equal loading was confirmed by probing the membrane with anti-β actin antibodies.

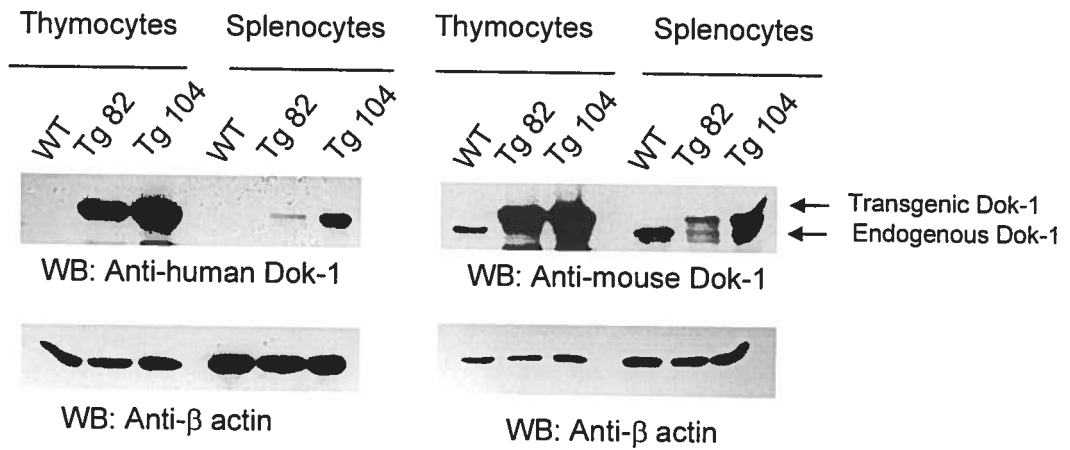


Figure 2: Levels of transgene expression in the thymus and in the spleen

Lysates from wild-type (WT) or Dok-1 transgenic mice (Tg82 and Tg104) thymi or spleen were prepared and equivalent cell numbers were loaded for immunoblot analysis using anti-Dok-1 antibodies raised against mouse or human-Dok-1. Loading was verified by probing the membrane with anti-β actin antibodies.

While our anti-human Dok-1 antiserum does not crossreact with the mouse Dok-1 protein, our anti-mouse Dok-1 antiserum recognizes both human transgenic Dok-1 and mouse endogenous Dok-1. The ratio of expression levels of endogenous versus transgenic Dok-1 cannot be determined since the degree of cross-reactivity of our anti-mouse Dok-1 antiserum is unknown.



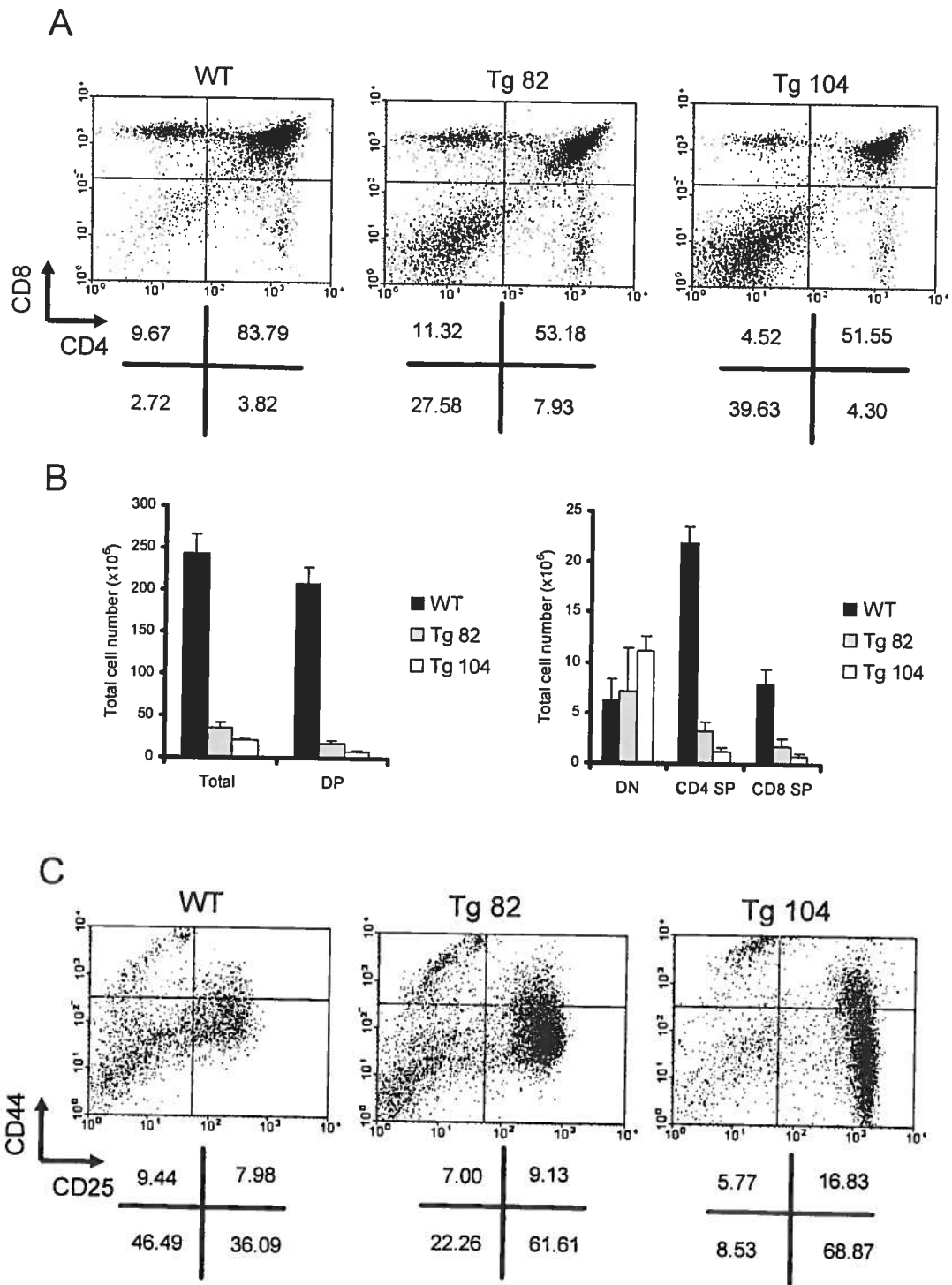


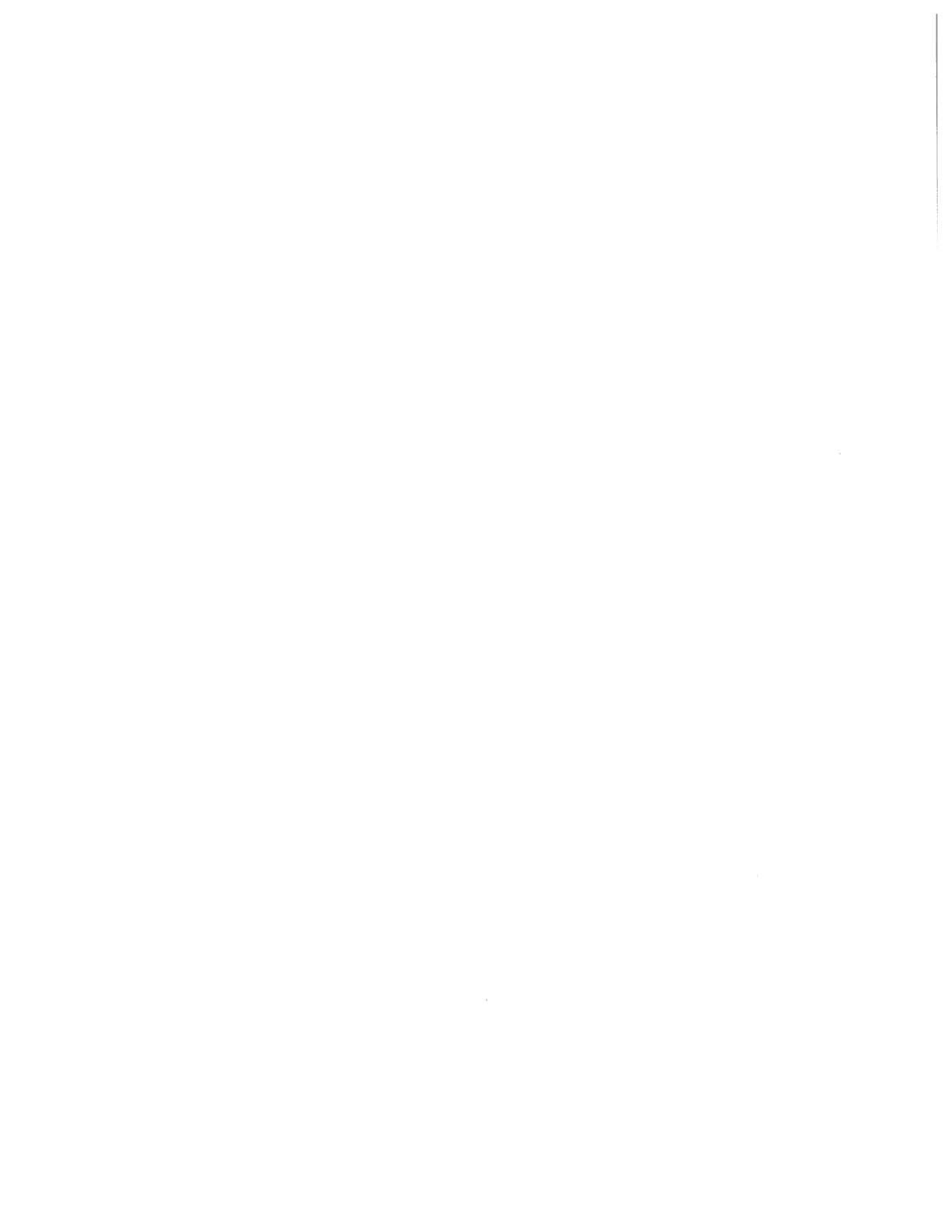
Figure 3: Dok-1 overexpression inhibits thymocyte development

Figure 3

(A) A representative flow cytometry analysis of thymic CD4 and CD8 expression from littermate controls (WT) or Dok-1 transgenic mice (Tg82 and Tg104). Percentages of cells in each quadrant are indicated below the dot plots. Similar results were obtained in at least five different experiments. Mice were 3-7 wk-old.

B) Absolute cell numbers were calculated for total thymocytes and thymocyte subsets based on their CD4 and CD8 expression. The number of total thymocytes is the mean of at least 5 different mice analyzed.

C) Representative profiles of CD44 and CD25 expression on gated CD4⁺CD8⁻ DN thymocytes from littermate controls (WT) or Dok-1 transgenic mice (Tg82 and Tg104). Percentages of cells in each quadrant are indicated below the dot plots.



A

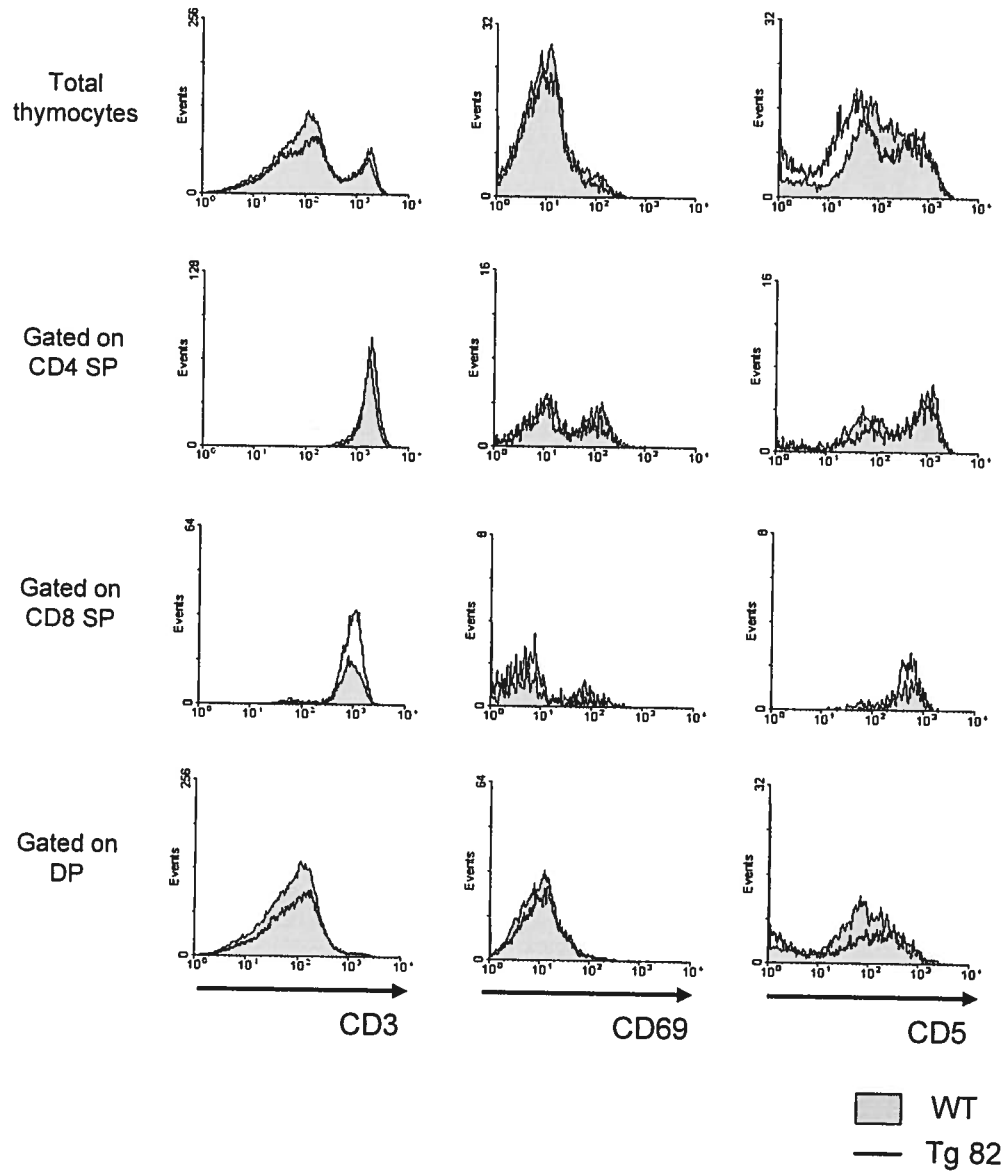


Figure 4: Regulation of surface expression of CD3, CD69 and CD5 in Dok-1 transgenic thymocytes is normal



B

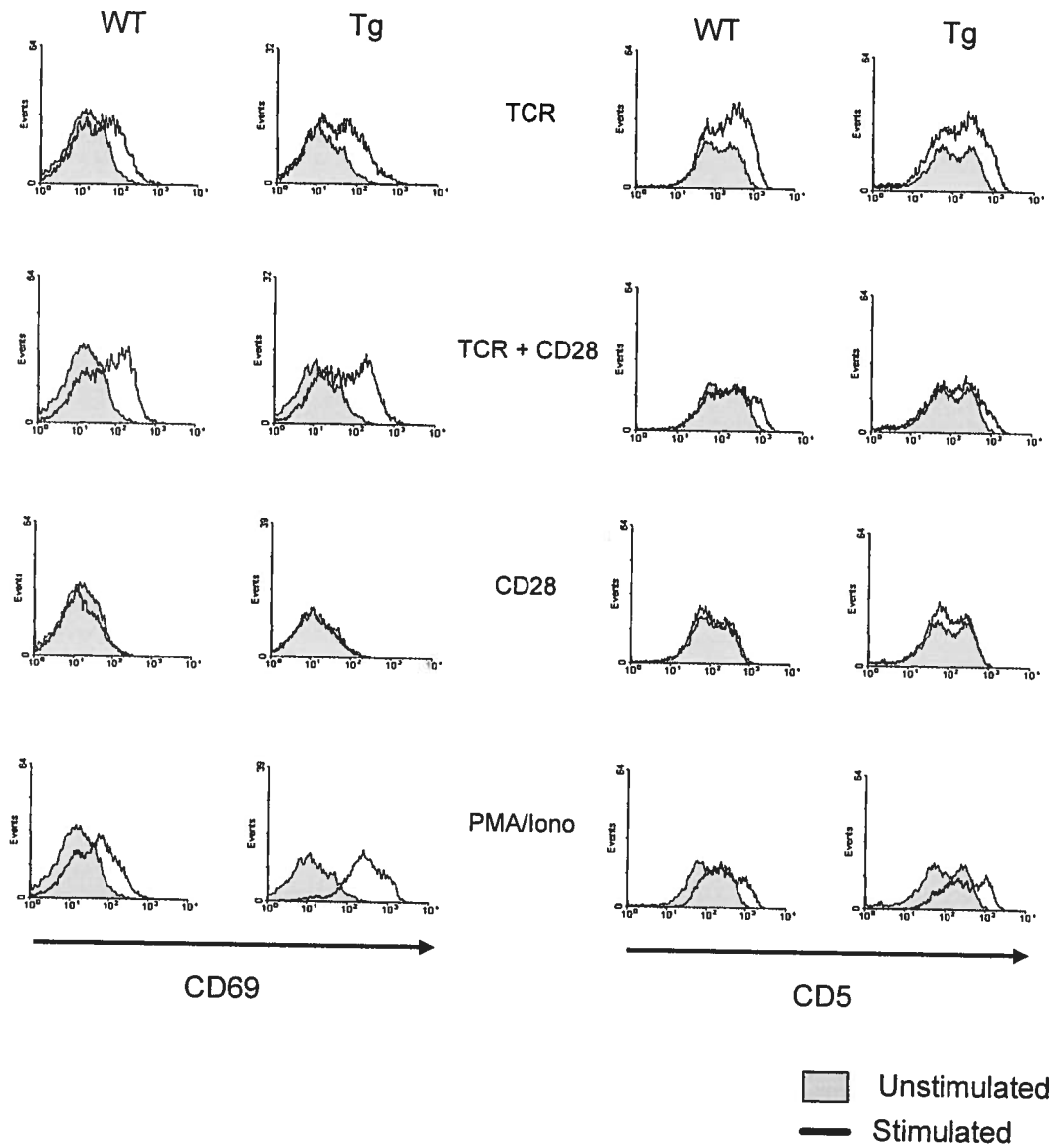


Figure 4: Regulation of surface expression of CD3, CD69 and CD5 in Dok-1 transgenic thymocytes is normal

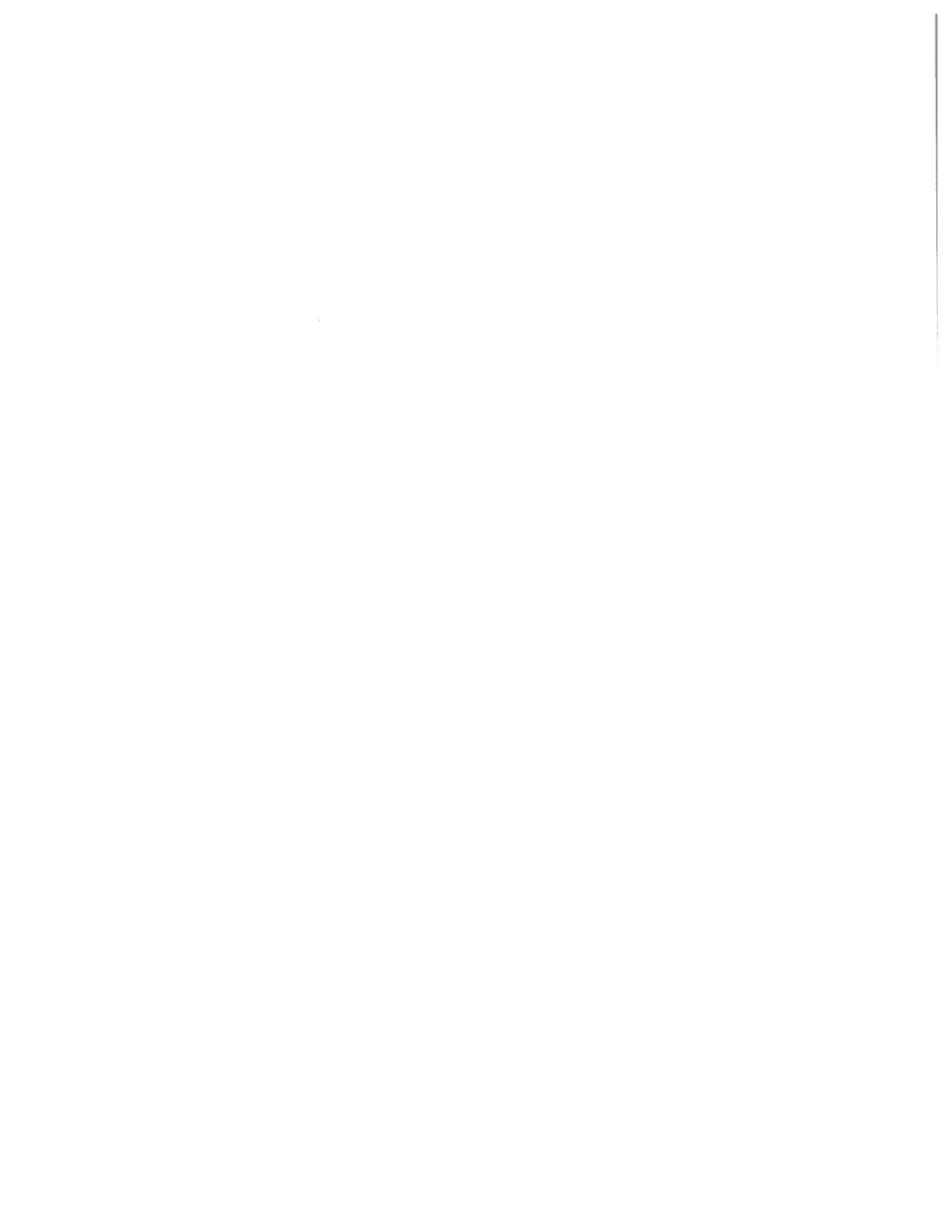


Figure 4

A) Thymocytes from littermate controls (filled histograms) and Dok-1 transgenic Tg82 mice (clear histograms) were stained with anti-CD4-PE, anti-CD8-FITC and as indicated on the top of each panel with anti-CD3-biotin, anti-CD69-biotin or anti-CD5-biotin followed by streptavidin-Red670. Cell surface expression of CD3, CD69 and CD5 is shown for total thymocytes and $CD4^+$ SP (CD4 SP), $CD8^+$ SP (CD8 SP) and $CD4^+CD8^+$ DP (DP).

B) Thymocytes enriched for DP cells by positive selection with CD8-microbeads from littermate controls (WT) and Dok-1 transgenic mice Tg82 (Tg) were left unstimulated (filled histograms) in medium alone or stimulated (clear histograms) with anti-TCR, anti-TCR plus anti-CD28, anti-CD28 or PMA plus ionomycin for 12 h. Flow cytometric analysis of CD69 and CD5 expression is shown.

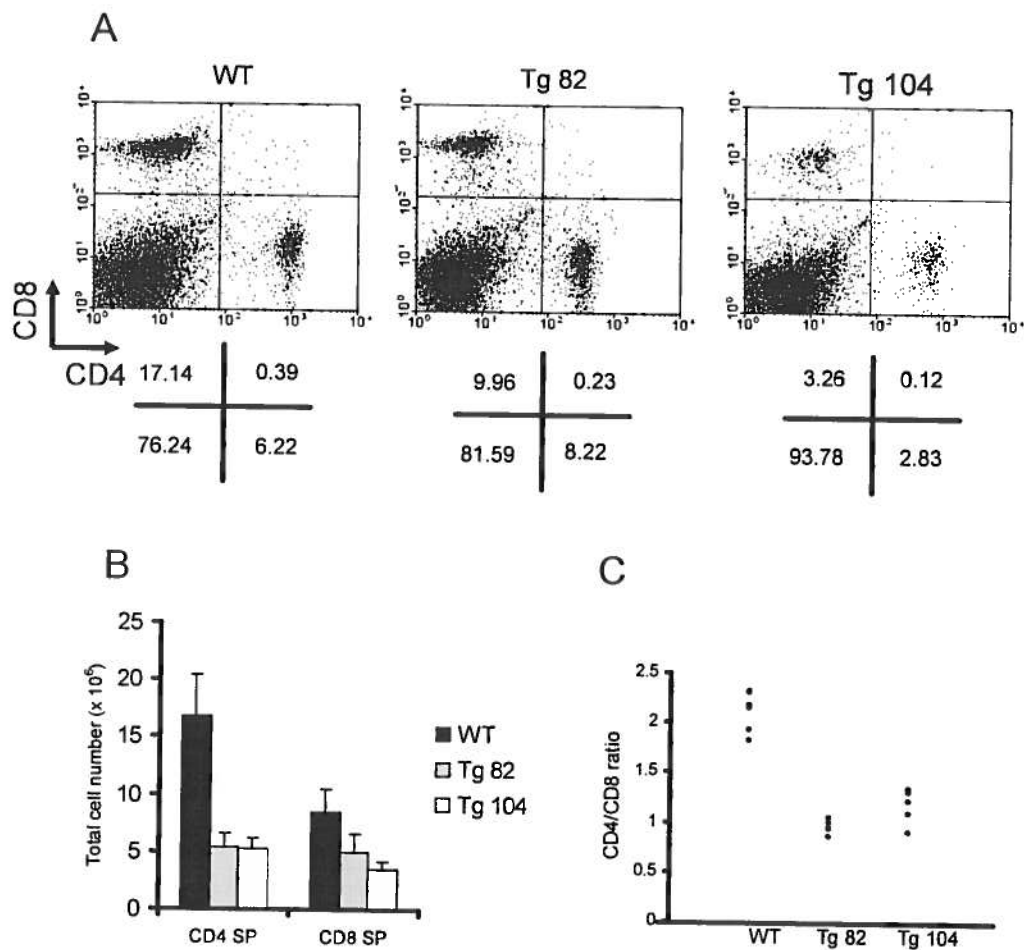
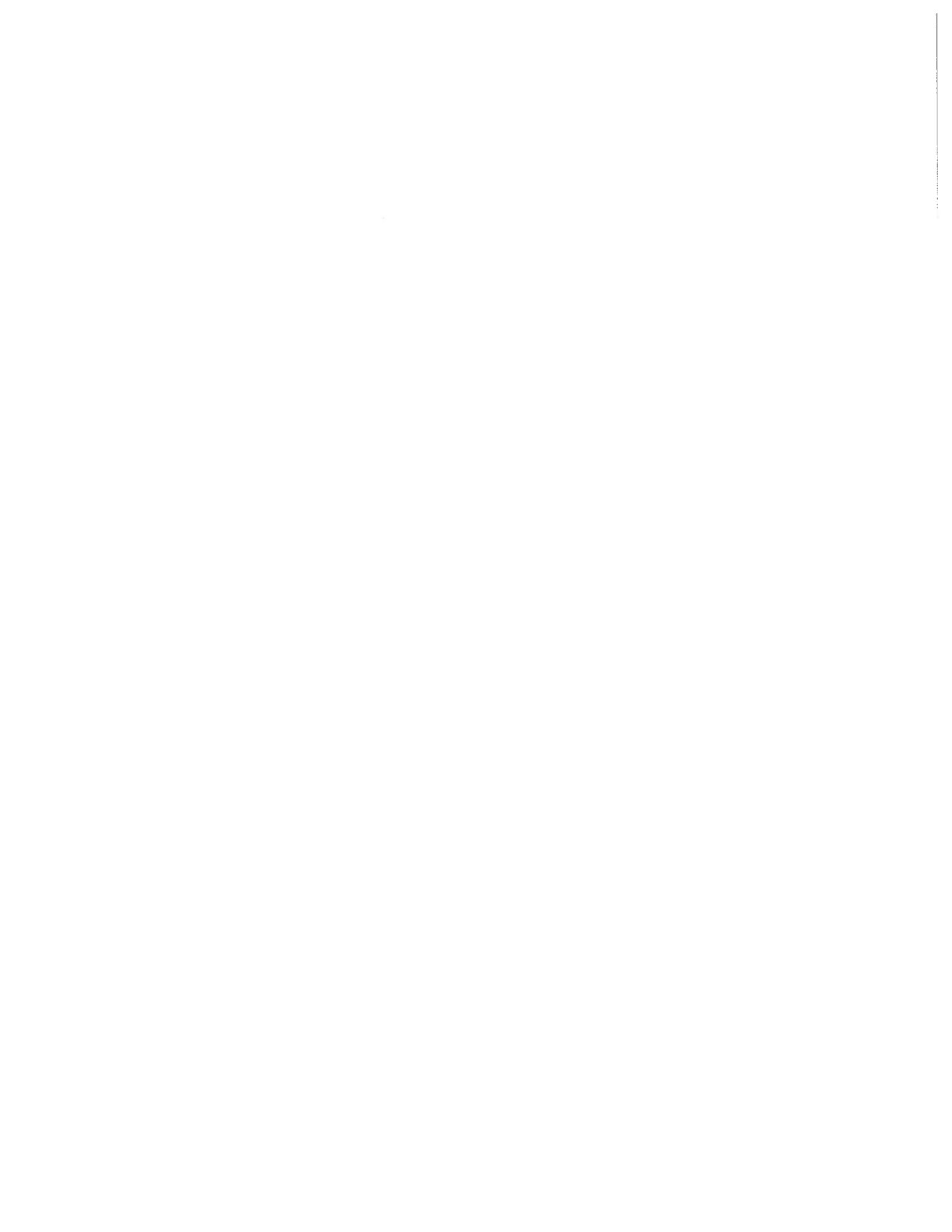


Figure 5: Effects of Dok-1 transgenic expression on CD4/CD8 ratios of splenic cells

A) Splenic cells from 4- to 6-wk-old WT and Dok-1 transgenic mice were analyzed by flow cytometry with anti-CD4 and anti-CD8 Abs.

B) Total cell number for each spleen was determined and the number of CD4⁺ cells (CD4) and CD8⁺ cells (CD8) was calculated according to the percentage shown in A.

C) Ratios of CD4/CD8 cells in the spleen of transgenic mice (Tg82 and Tg104) and wild-type littermate controls (WT) are shown. Data are representative of at least 5 different experiments (n = 5-13).



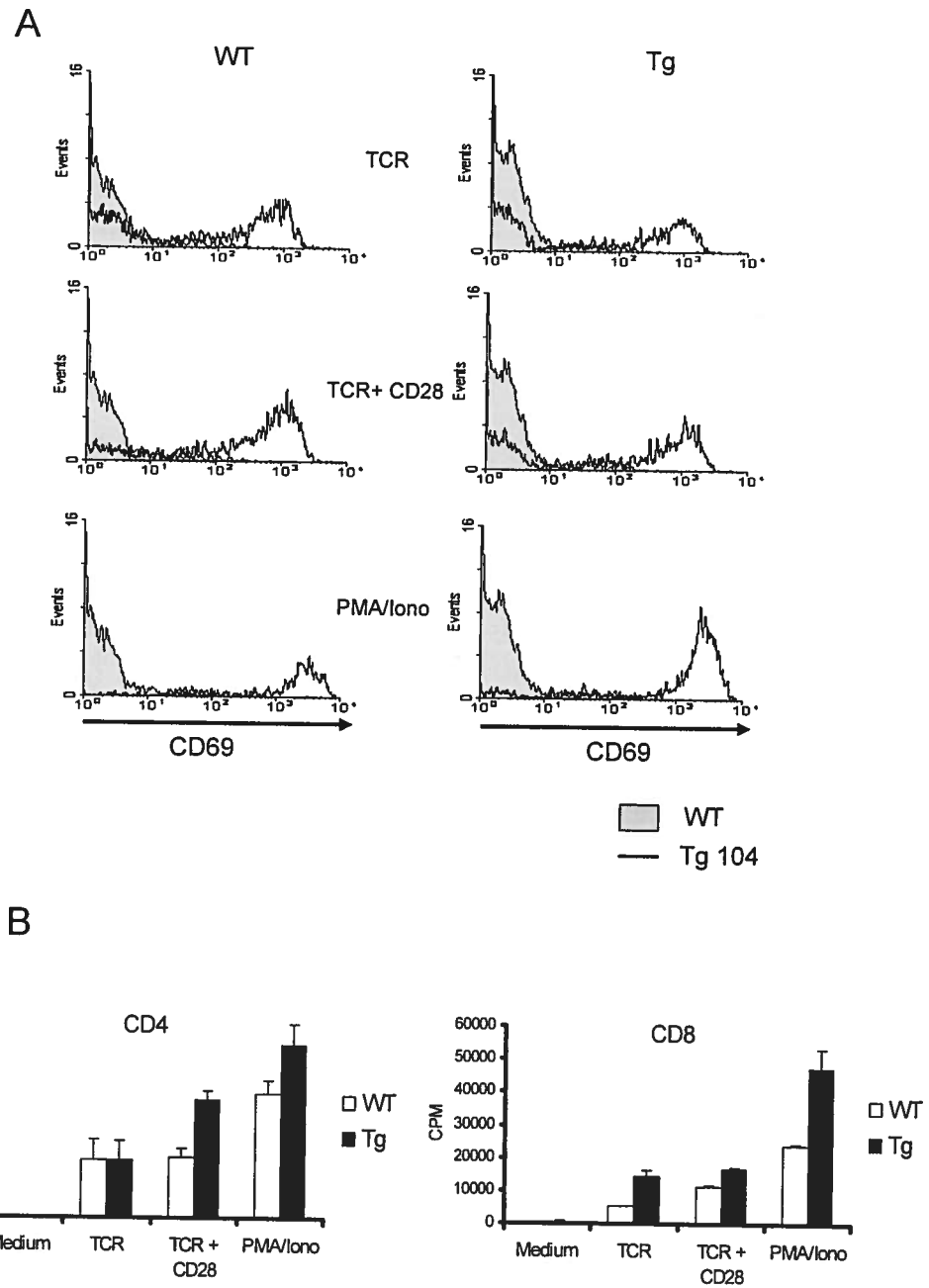


Figure 6: Normal TCR-dependent upregulation of CD69 and proliferation of splenic T cells in mice overexpressing Dok-1

Figure 6

A) CD4⁺ T cells were purified with CD4 microbeads from spleen of littermate controls (WT) or transgenic mice (Tg104) and cells were cultivated in 96-well plate for 24h in medium alone (filled histograms) or in presence of different stimuli as indicated (clear histograms).

B) Purified CD4⁺ or CD8⁺ splenic T cells from littermate controls (WT) or Dok-1 transgenic mice (Tg) were left unstimulated (medium) or stimulated on mAbs-coated plate with anti-TCR, anti-TCR plus anti-CD28 or with a combination of PMA and Ionomycin for 48 h as described in materials and methods. Proliferation was measured by [³H] thymidine incorporation after 18 h of pulse chase. Data represent means ± SD of triplicate cultures of at least 5 independent experiments. The small increase in proliferation of Dok-1 transgenic T cells compared to control cells is not consistently observed.

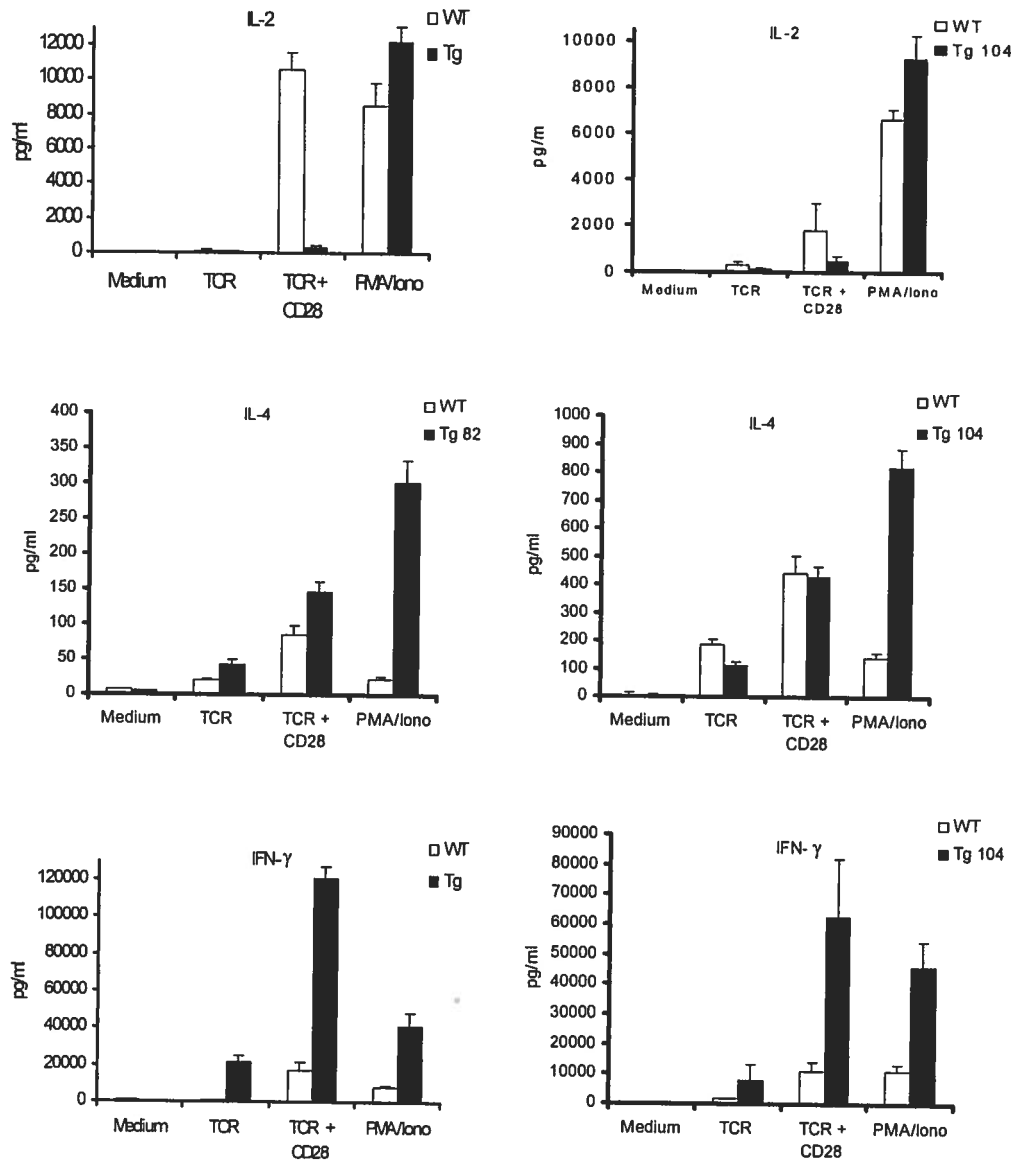


Figure 7: Dok-1 overexpression interferes with cytokine secretion

Purified CD4⁺ cells from littermate controls (WT) and Dok-1 transgenic mice (Tg82 and Tg104) were left unstimulated or stimulated with anti-TCR Abs, anti-TCR plus anti-CD28 Abs or PMA plus ionomycin. After 48 h, IL-2, IL-4 and IFN-γ production was determined by ELISA. Assays were done in triplicate and repeated at least 3 times with similar results.

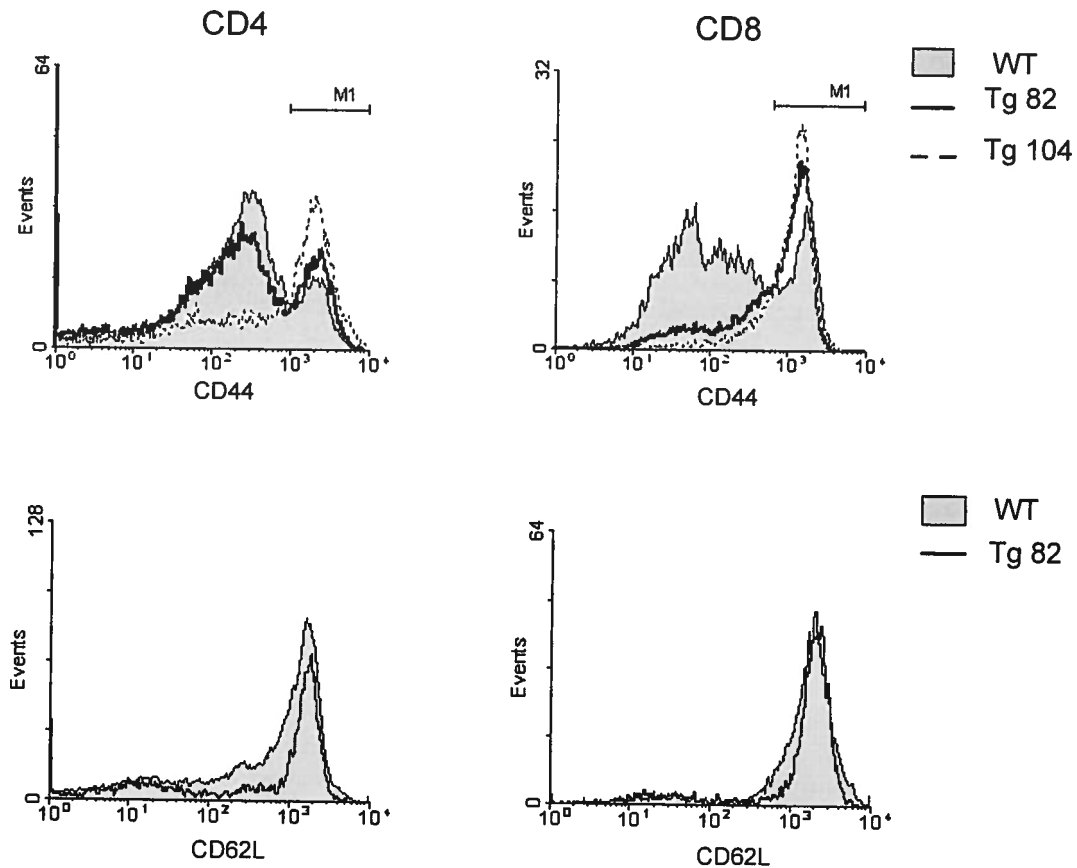


Figure 8: Levels of expression of Dok-1 influence the memory status of T cells in the spleen

T cells from spleen of littermate controls (WT) or transgenic Dok-1 mice (Tg82 and Tg104) were purified with pan-T cells microbeads and stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD44 or anti-CD62L Abs. A representative flow cytometric analysis of CD44 and CD62L expression is shown on gated CD4⁺ or CD8⁺ cells. M1 corresponds to the gate used to determine the percentage of CD44^{high} cells. The percentage of CD44^{high} cells is for CD4⁺ cells: WT=19%, Tg82=25.1% and Tg104=54.6% and for CD8⁺ cells: WT=27.3%, Tg82=61.3% and Tg104=77.3%.

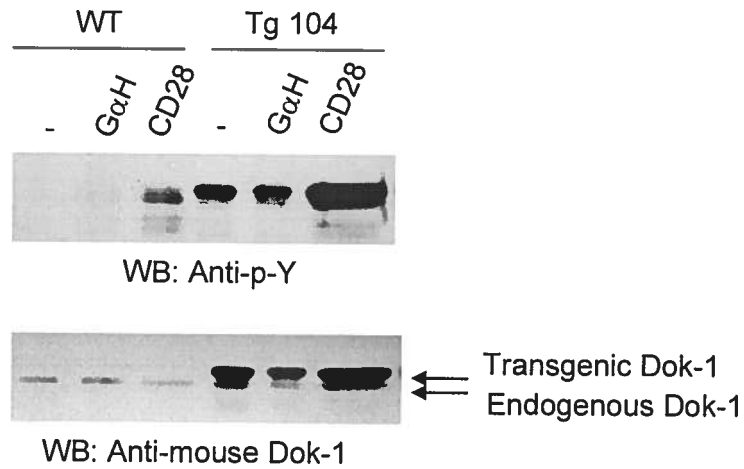
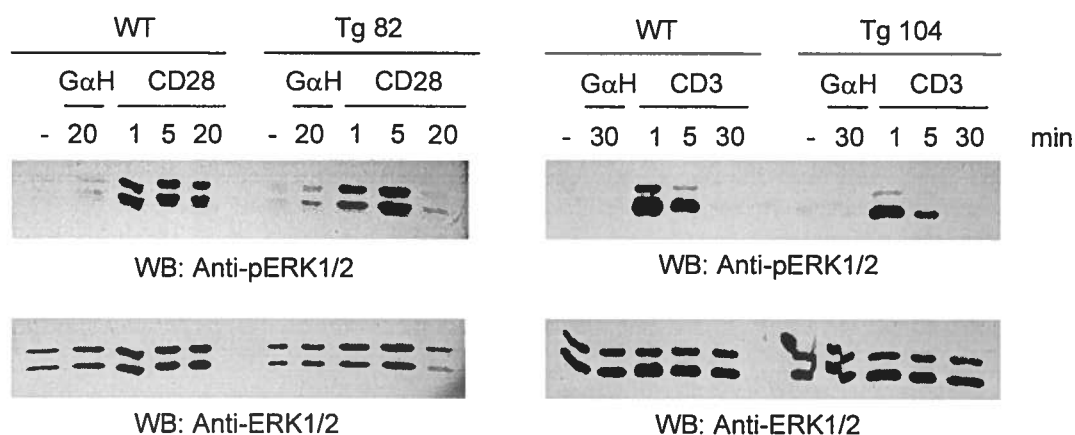


Figure 9: CD28-induced phosphorylation of Dok-1 in splenic T cells

T cells purified with anti-CD90 microbeads from spleen of littermate controls or Dok-1 Tg104 (Tg) were incubated for 1 min in medium alone (-) or in presence of goat anti-hamster Ig (GαH) or stimulated with anti-CD28 Ab plus goat anti-hamster Ig (CD28). Proteins were immunoprecipitated with anti-mouse Dok-1 antibodies and were immunoblotted using anti-phosphotyrosine (anti-p-Y) antibodies. Membranes were stripped and reblotted with anti-biotinylated mouse Dok-1 antibodies (anti-mouse Dok-1).

A Purified T cells



B Enriched DP thymocytes

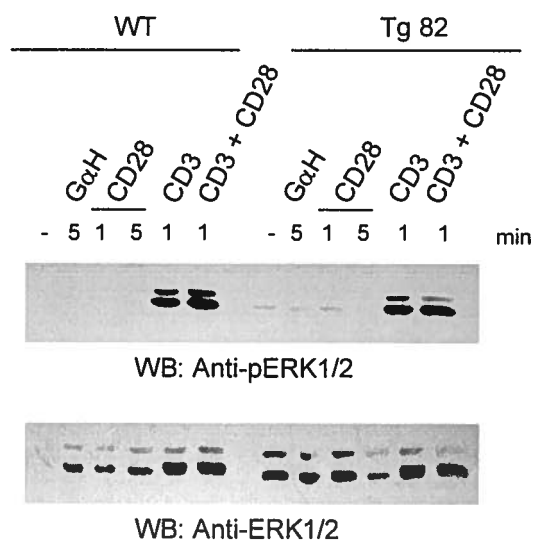


Figure 10: Overexpression of Dok-1 in thymocytes and mature T cells does not inhibit CD3- or CD28-induced ERK1/2 phosphorylation

Cells were incubated in medium alone (-) or in presence of goat anti-hamster Ig (GαH) or stimulated with anti-CD28 Abs or anti-CD3 Abs alone or in combination plus goat anti-hamster Ig (CD28, CD3, CD3 + CD28) for the indicated time.

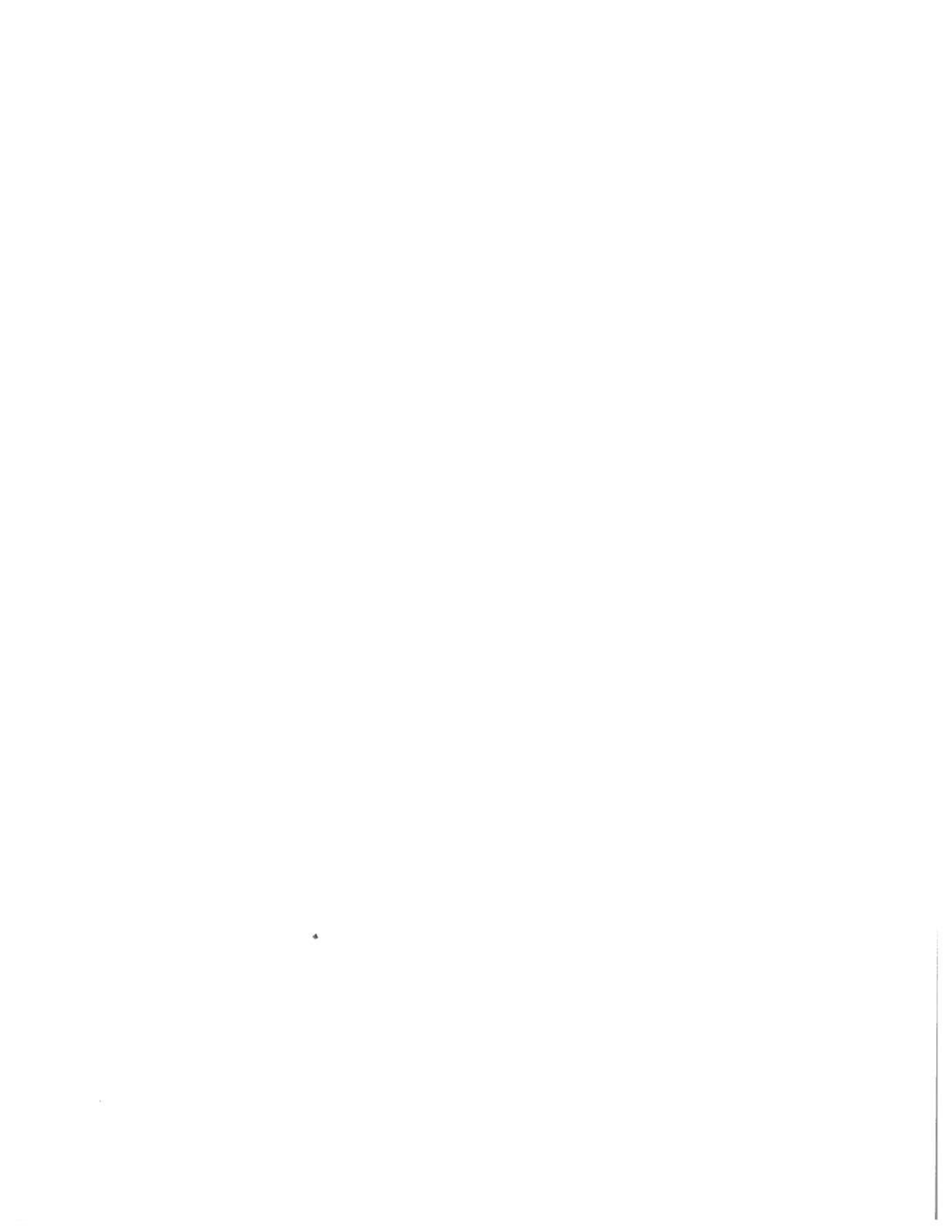
Total cell lysates were immunoblotted with anti-phospho ERK1/2 antibodies. Equivalent levels of ERK1/2 protein in each lane were evaluated by stripping and reprobing the membranes with anti-total ERK1/2 antibodies.



Figure 10

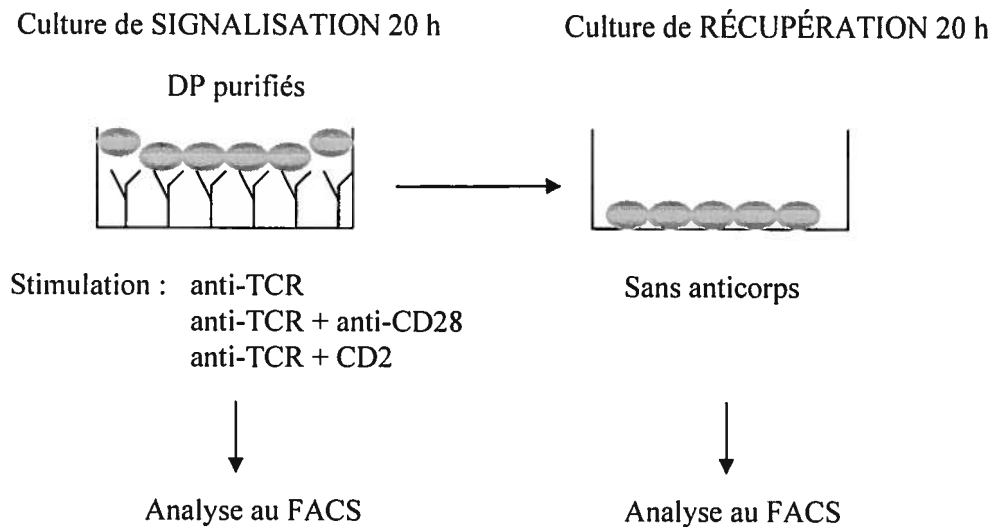
A) Left panel, CD4⁺ cells from spleen of Dok-1 transgenic 82 mice (Tg82) or littermate controls (WT). Right panel, Purified T cells from spleen of Dok-1 transgenic 104 mice (Tg104) or littermate controls.

B) DP thymocytes enriched by positive selection with anti-CD8 microbeads, from littermate controls (WT) or Dok-1 transgenic 82 (Tg82).



RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Figure G: Étude de la maturation des thymocytes *in vitro*



Nous avons utilisé un système expérimental développé par Singer (Cibotti *et al.*, 1997) pour analyser la capacité des thymocytes DP à se différencier en SP CD4⁺ ou CD8⁺. Brièvement, tel qu'illustré à la figure F de la section «revue de littérature», les thymocytes DN traversent quatre stades de développement DN1 à DN4. À la transition DN3/DN4, le processus de la β sélection, ou la formation d'un pré-TCR fonctionnel induit des signaux de survie permettant aux thymocytes DN de maturer en thymocytes DP. Les thymocytes DP non autoréactifs sont sélectionnés (sélection positive et négative) et se différencient en thymocytes SP.

In vitro, lorsque les thymocytes DP sont mis en culture selon le protocole expérimental illustré dans la figure G, leur stimulation par le TCR et par les molécules CD2, CD5, CD24, CD28, CD49d, CD81 ou TSA-1, molécules qui possèdent des capacités d'induction d'un signal de maturation, provoque leur différenciation en thymocytes SP CD4⁺. La maturation préférentielle des DP en culture de

signalisation/récupération vers les SP CD4⁺ se fait indépendamment des signaux spécifiques à la lignée CD4 ou CD8.

Des expériences préliminaires ont été effectuées sur une population de thymocytes DP enrichie par une purification à l'aide de billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-CD8. La culture de signalisation représente les cellules stimulées avec des anticorps ou non-stimulées (milieu de culture) pendant 20 h. Les cellules sont ensuite transférées dans une nouvelle plaque pour une durée additionnelle de 20 h (culture de récupération). Nous avons utilisé différentes combinaisons d'anticorps anti-TCR, anti-CD2, anti-CD28 pour stimuler les thymocytes DP de souris transgéniques surexprimant Dok-1 ou de souris de type sauvage afin de comparer leur maturation *in vitro* (figure 11). Nos résultats montrent que dans la souris de type sauvage, toutes les conditions de stimulation induisent la maturation préférentielle des DP en SP CD4⁺. Cette maturation est augmentée en condition de co-stimulation. Par contre, pour les souris Dok-1 transgéniques, la maturation des DP en SP CD4⁺ est observée suite à la stimulation par le TCR ou le TCR plus CD2. La différenciation des DP en SP CD8⁺ est augmentée dans des conditions de stimulation dépendantes de CD28.

A

DP WT

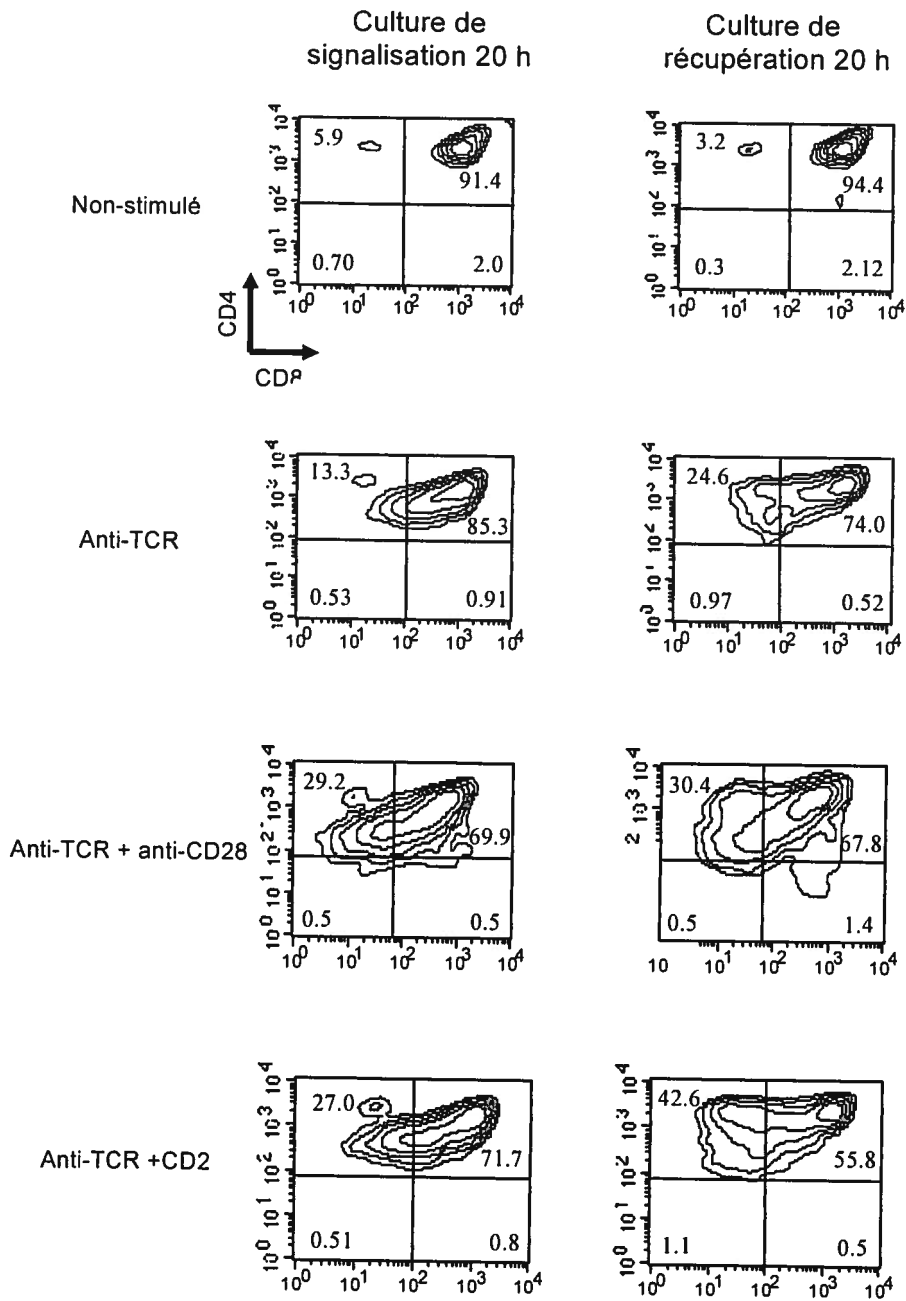


Figure 11: La différenciation des thymocytes DP en SP CD8⁺ est privilégiée chez les souris Dok-1 transgéniques.

B

DP Tg 82

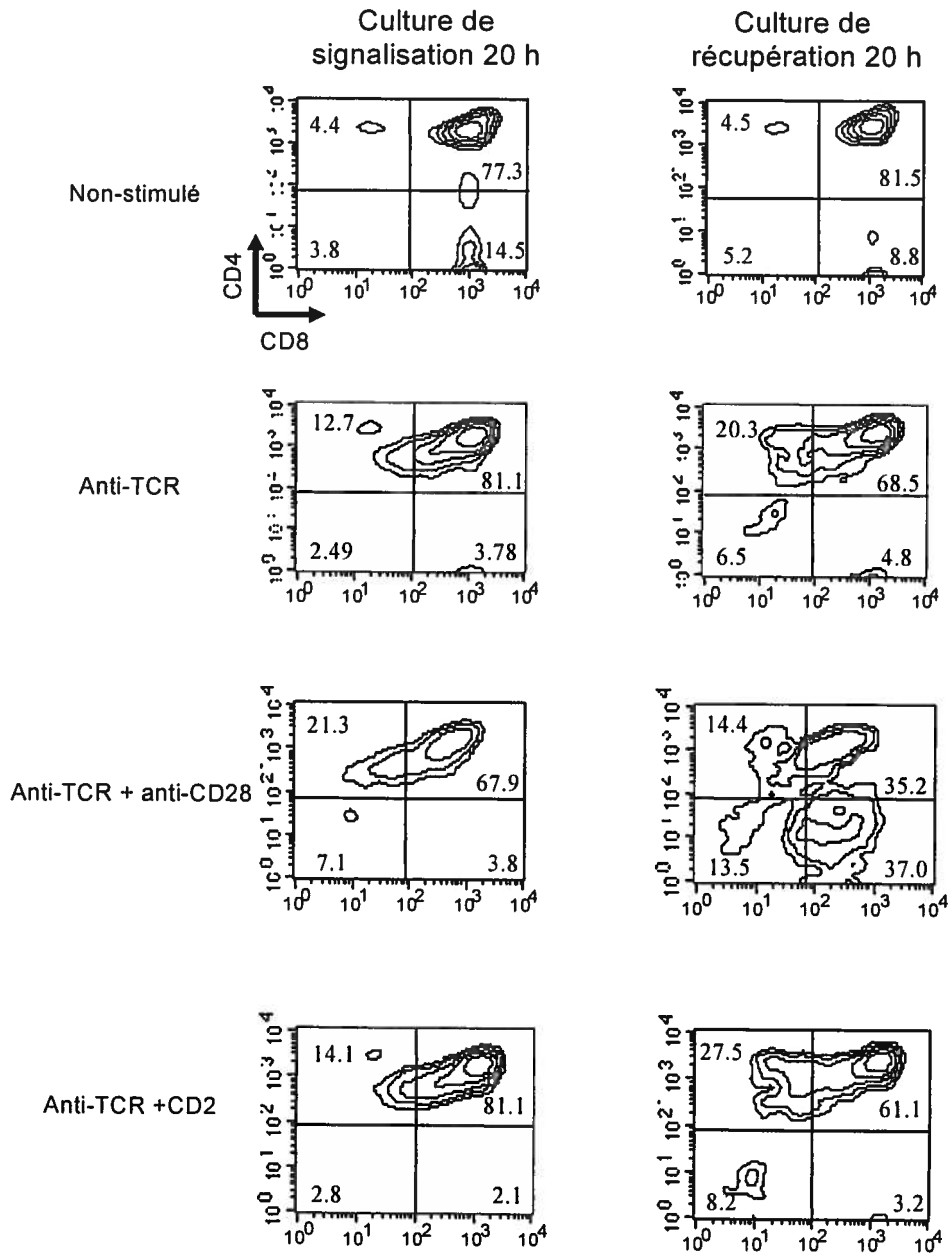


Figure 11: La différenciation des thymocytes DP en SP CD8⁺ est privilégiée chez les souris Dok-1 transgéniques.

Figure 11

La population des thymocytes DP est enrichie par une purification à l'aide de billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-CD8. 2×10^6 cellules sont mises en culture de signalisation dans une plaque de 24 puits (volume final de 1 ml) pour une période de 20 h en présence ou en absence de stimulation (indiquée à gauche des graphiques). Les cellules sont ensuite transférées dans une autre plaque et mises en culture de récupération pour une durée additionnelle de 20 h. La maturation des thymocytes *in vitro* est évaluée par cytométrie en flux en observant le profil d'expression des marqueurs CD4 et CD8 à la surface des cellules. Le pourcentage des différentes sous-populations de cellules mises en culture de signalisation/récupération est indiqué dans chacun des quadrants et est représentatif d'au moins cinq expériences différentes.

A) Thymocytes DP de souris de type sauvage (DP WT) en culture de signalisation/récupération.

B) Thymocytes DP provenant de souris Dok-1 transgéniques de la lignée 82 (Tg 82) en culture de signalisation/récupération.



DISCUSSION

DISCUSSION

Les souris transgéniques surexprimant la forme sauvage ou mutée d'une protéine constituent un modèle d'étude qui permet de mieux caractériser, tant *in vitro* qu'*in vivo*, le rôle de cette protéine exprimée par un type cellulaire spécifique. Nous avons choisi de surexprimer la protéine Dok-1 dans les lymphocytes T de souris afin d'étudier l'impact de la voie de signalisation impliquant cette protéine adaptatrice et plus particulièrement celle induite par CD28 sur l'expansion/sélection des thymocytes ainsi que sur la fonction des lymphocytes T matures. La forme murine de Dok-1 possède 83 % d'homologie globale avec la forme humaine. Le domaine PTB est conservé à 100 % et les résidus tyrosine qui représentent des sites de liaison aux domaines de type SH2 sont tous conservés entre la forme humaine et murine sauf pour une tyrosine (l'équivalent de la tyrosine 341 chez l'homme) (Yamanashi et Baltimore, 1997). Les régions consensus riches en proline et en résidus sérine/thréonine, également des sites de liaison à différents motifs d'interaction protéine-protéine, sont pour la plupart conservées. Toutes les études fonctionnelles réalisées jusqu'à ce jour n'ont pas montré de différences entre la forme murine et humaine de Dok-1. Par ailleurs, de constructions codant pour des formes mutées de Dok-1 humain ont été générées dans notre laboratoire. Pour toutes ces raisons, nous avons utilisé la forme humaine de Dok-1 pour générer les souris transgéniques. La surexpression de la forme humaine de Dok-1 nous permet de différencier facilement la forme endogène de la forme transgénique.

Nous avons premièrement vérifié l'expression de la protéine Dok-1 chez les cellules lymphoïdes de la souris. En isolant les différentes populations thymiques ainsi que les lymphocytes B et les lymphocytes T de la rate, nous montrons que la protéine Dok-1 murine est exprimée chez ces différents types cellulaires à des niveaux équivalents (figure 1). Nos résultats indiquent aussi que l'expression de Dok-1 demeure constante tout au long du développement des thymocytes.

Nous avons ensuite évalué l'expression du transgène dans les cellules T. L'anticorps anti-Dok-1 humain est spécifique à la forme humaine et ne réagit pas avec la forme murine tel qu'illustré à la figure 2. Il permet donc de comparer les niveaux

d'expression du transgène entre les différentes lignées de souris. L'anticorps anti-Dok-1 murin reconnaît la forme humaine et donne une bonne indication du niveau de surexpression du transgène par rapport à l'endogène.

Le transgène codant pour la protéine Dok-1 humaine, sous le contrôle du promoteur CD2, est transcrit à la transition des stades de développement DN2/DN3 des thymocytes et dans les lymphocytes T matures. La surexpression de Dok-1 influence le développement des lymphocytes T, inhibant la maturation des thymocytes à la transition des stades de développement DN/DP (figure 3). Nous avons vérifié la proportion des cellules T TCR $\gamma\delta$ présentes dans le thymus des souris transgéniques et des souris de type sauvage par cytométrie en flux (résultats non exposés). Le pourcentage de cellules TCR $\gamma\delta^+$ de souris transgéniques surexprimant Dok-1, évalué sur une population thymique CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD3 $^+$, est identique à celui des souris de type sauvage. De ce fait, la diminution du nombre absolu des thymocytes DP chez les souris transgéniques n'est pas attribuable à un développement préférentiel des lymphocytes TCR $\gamma\delta$ au détriment des cellules TCR $\alpha\beta$. De plus, le rapport des cellules SP CD4 $^+$ /SP CD8 $^+$ est diminué chez les souris transgéniques comparativement à celui observé dans le thymus (ou la rate) des souris de type sauvage (figure 3 et 5). Il est important de noter que les différentes lignées de souris transgéniques analysées présentent le même phénotype qui est dépendant du niveau de surexpression de la protéine Dok-1. Ceci démontre que les effets observés ne sont pas dus à l'insertion aléatoire du transgène dans une région qui code pour des gènes importants. La surexpression de Dok-2 dans les cellules de la moelle osseuse de souris inhibe la maturation des thymocytes également à la transition des stades de développement DN/DP (Gugasyan *et al.*, 2002). Dok-2 est le deuxième membre de la famille des protéines Dok exprimé dans les lymphocytes T et possède beaucoup d'homologie structurale et fonctionnelle avec Dok-1. La participation de Dok-2 et de Dok-1 dans la maturation des lymphocytes T pourrait indiquer que ces deux membres de la famille des protéines Dok exercent des rôles redondants du moins dans ce processus. Il faut se rappeler que les thymocytes des souris déficientes pour Dok-1 prolifèrent mieux comparativement aux thymocytes de souris de type sauvage suite à leur stimulation par la lectine Con A + IL-2 (Di Cristofano *et al.*, 2001) indiquant que Dok-2 ne compense pas entièrement pour l'absence de Dok-1. La caractérisation des souris

déficientes pour l'expression de Dok-1 et/ou Dok-2 devrait permettre de définir les rôles respectifs exercés par ces deux protéines adaptatrices tant au niveau de la maturation que de l'activation des cellules T.

Nous montrons que l'altération du développement des lymphocytes T chez les souris transgéniques surexprimant Dok-1 se produit précisément à la transition des stades de développement DN2/DN3 à DN4 (figure 3). À cette étape du développement des thymocytes se produit la β sélection ou la formation du pré-TCR. L'activation du complexe pré-TCR/CD3 achemine des signaux de survie aux thymocytes leur permettant de se différencier. Il est donc possible que Dok-1 agisse comme un régulateur négatif de la signalisation induite par le pré-TCR/CD3. Plusieurs molécules sont impliquées dans la cascade des signaux initiés par le pré-TCR/CD3 dont les kinases de la famille Src p56Lck et Fyn (Groves *et al.*, 1996; van Oers *et al.*, 1996) ou les protéines adaptatrices comme SLP-76 (Pivniouk *et al.*, 1998), LAT (Zhang *et al.*, 1999), GADs (Yoder *et al.*, 2001) et Shc (Zhang *et al.*, 2002). L'activation de ces protéines est responsable d'acheminer les signaux qui induisent la maturation des thymocytes DN en thymocytes DP. La voie des MAPK Ras/ERK est également impliquée dans la transition des stades de développement DN/DP (Crompton *et al.*, 1996) et joue un rôle important dans la régulation de la différenciation des thymocytes DP en thymocytes simple positif CD4⁺ ou CD8⁺ (Sharp *et al.*, 1997). Une étude effectuée dans notre laboratoire suggère que Dok-1 peut réguler négativement l'activation de ERK1/2 possiblement via son association avec la p120 RasGAP dans les lymphomes Jurkat T (Nemorin *et al.*, 2001).

Nous avons donc vérifié si la surexpression de Dok-1 chez les cellules T de nos souris transgéniques inhibait la maturation des thymocytes et influençait le rapport SP CD4⁺/SP CD8⁺ via la modulation de l'activation de la voie p21Ras. Nous avons examiné l'activation de ERK1/2 chez les thymocytes totaux (résultats non montrés) et chez la population enrichie de thymocytes DP stimulés par des anticorps anti-CD3, anti-CD28 ou anti-CD3 + anti-CD28 (figure 10). Nous n'avons pas observé une diminution de la phosphorylation des kinases ERK1/2 à la suite des ces différentes stimulations chez les souris transgéniques. Nous n'avons pas examiné l'état de la phosphorylation de ERK1/2 au niveau de la sous-population thymique DN. Étant donné le nombre limité de cellules DN dans un thymus normal et afin de réaliser des

expériences biochimiques, nous privilégierons une approche où les souris Dok-1 transgéniques seront croisées avec des souris déficientes pour l'expression de RAG (thymocytes dont la maturation est bloquée au stade de développement double négatif II). À l'aide d'un anticorps anti-CD3, la signalisation du pré-TCR peut être induite et le rôle de Dok-1 dans cette cascade sera caractérisé par des études biochimiques de l'activation de plusieurs protéines dont ERK1/2 (voie des MAP kinases) par des immunoprécipitations, immunobuvardages, etc.

D'autre part, l'expression du marqueur d'activation CD69 est augmentée à la surface des thymocytes des souris transgéniques suite à la stimulation par des anticorps anti-TCR ou anti-TCR plus anti-CD28 de manière comparable à celle des cellules de souris de type sauvage (figure 6). La régulation à la hausse de CD69 induite par la stimulation du TCR est dépendante de l'activation de la voie p21Ras (D'Ambrosio *et al.*, 1994). L'ensemble de nos résultats indique que l'effet négatif exercé par Dok-1 sur la maturation des thymocytes ne proviendrait pas d'une diminution de l'activation de la voie p21 Ras.

Dans de nombreux systèmes cellulaires, il a été suggéré que Dok-1 doit nécessairement être phosphorylé sur tyrosine aux sites reconnus par les domaines SH2 de p120RasGAP pour réguler négativement la voie d'activation p21Ras. L'absence de l'inhibition de l'activation de p21Ras chez les souris transgéniques pourrait être liée à l'incapacité de Dok-1 à recruter p120 RasGAP dans les conditions analysées. Bien que nous n'ayons pas directement examiné l'interaction de Dok-1 avec p120 RasGAP, nous avons vérifié l'état de la phosphorylation de la protéine Dok-1 suite à une stimulation par CD2, CD3 et/ou CD28 chez les cellules T. Nous montrons que la stimulation par CD28 induit la phosphorylation de Dok-1 dans les cellules T primaires de souris (figure 9). Cependant, l'activation de ERK1/2 n'est pas inhibée suite à la stimulation des cellules T par ce récepteur (figure 10). Il est possible que la stimulation par CD28 induise la phosphorylation de Dok-1 sur des résidus tyrosine autres que ceux reconnus par les domaines SH2 de p120 RasGAP. Notons que l'absence d'inhibition de l'activation de ERK1/2 dans les cellules de souris Dok-1 transgéniques suite à leur stimulation par CD3 était attendue puisque la phosphorylation de ces kinases n'est pas affectée lorsque les cellules Jurkat T surexprimant Dok-1 sont également stimulées par CD3 (Nemorin *et al.*, 2001). Nous

n'avons pas pu détecter la phosphorylation de Dok-1 en stimulant les cellules avec un anticorps anti-CD2 (résultat non montré) tel que démontré dans les lymphomes Jurkat. Étant donné que le récepteur CD2 exerce seulement un rôle dans l'adhésion cellulaire chez la souris mais que chez l'humain, CD2 représente aussi une voie d'activation directe des cellules T, nous supposons que la signalisation initiée par CD2 chez la souris n'implique pas nécessairement la participation de Dok-1. En somme, l'interaction possible entre Dok-1 et RasGAP ne semble pas être le mécanisme par lequel Dok-1 peut exercer ses pouvoirs de régulateur négatif. Deux autres voies des MAP kinases, JNK et p38, sont impliquées dans la maturation des thymocytes. L'activation de p38 MAPK inhibe la progression du cycle cellulaire et la différenciation des thymocytes immatures *in vivo* (Diehl *et al.*, 2000). D'un autre côté, la voie de signalisation JNK régule la délétion des thymocytes autoréactifs *in vivo* (Rincon *et al.*, 1998). Le rôle de Dok-1 dans la régulation de ces deux autres voies des MAPK n'a pas été étudié. Il est donc possible que Dok-1 exerce des pouvoirs inhibiteurs sur ces voies d'activation entraînant ainsi un blocage partiel de la maturation des thymocytes et une altération du rapport CD4/CD8.

Nous pouvons supposer que des protéines inhibitrices autres que p120 RasGAP peuvent être impliquées dans la régulation exercée par Dok-1 sur le développement lymphocytaire. Des protéines à action inhibitrices telles que Csk ou SHIP ont été caractérisées et leur interaction avec Dok-1 a été observée (Shah et Shokat, 2002; van Dijk *et al.*, 2000). Csk est un régulateur négatif de l'activation de la PTK p56Lck et joue un rôle important dans l'intégration des signaux menant à la maturation des thymocytes (Schmedt *et al.*, 1998). Il a été rapporté qu'une fois phosphorylé, Dok-1 s'associe à p56Lck dans le lymphome Jurkat T. De plus, il a été démontré que l'association de Dok-1 et Dok-2 phosphorylés avec la protéine Tec, une PTK exprimée par les lymphocytes T, peut directement inhiber l'activité de cette kinase (Gerard *et al.*, 2004). Il est donc envisageable que Dok-1 régule à la baisse l'activité de p56Lck via un mécanisme indirect potentiellement via son association avec Csk ou directement via son interaction avec la kinase p56Lck elle-même.

La surexpression de Dok-1 dans les cellules T des souris influence le rapport CD4/CD8 favorisant les cellules SP CD8⁺. La différenciation préférentielle des DP en SP CD8⁺ peut être due à une plus grande prolifération et/ou survie des thymocytes SP

CD8⁺ et inversement, mais pas exclusivement, à une diminution de la prolifération et du taux de survie des SP CD4⁺. Nous avons analysé l'effet fonctionnel de Dok-1 sur la prolifération des lymphocytes T. Nos résultats indiquent que la surexpression de Dok-1 n'influence pas la capacité des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ à proliférer *in vitro* en réponse à diverses stimulations (figure 6). La durée de l'interaction et la force du signal généré par le TCR et les molécules accessoires à la surface du thymocyte DP influencent le choix de sa différenciation vers la lignée SP CD4⁺ ou SP CD8⁺. Les deux molécules CD4 et CD8 lient la protéine kinase p56Lck; p56Lck étant préférentiellement associée avec CD4. De ce fait, la force du signal généré par le TCR est plus grande lorsque CD4 est co-engagé (Itano *et al.*, 1996). L'altération du rapport CD4/CD8 observé dans le thymus de nos souris transgéniques peut être causée par l'atténuation de la force du signal du TCR lors de la sélection positive des thymocytes qui surexpriment Dok-1. Dok-1 pourrait réguler à la baisse l'activité de p56Lck lors du co-engagement de CD4 avec le TCR permettant ainsi d'influencer la différenciation des thymocytes DP vers la lignée CD8⁺. La surexpression de Dok-1 pourrait également contribuer à l'augmentation de la proportion des SP CD8⁺ par des mécanismes qui impliquent la régulation de la transcription des gènes qui codent pour CD4 ou CD8 lors de la sélection positive des thymocytes. Par ailleurs, le mécanisme d'activation impliquant Dok-1 lors de la sélection positive pourrait protéger les thymocytes SP CD8⁺ d'un signal pro-apoptotique ou intervenir dans la régulation des voies de signalisation impliquant la sécrétion de cytokines.

Par un système de maturation des thymocytes DP *in vitro* décrit par Singer (Cibotti *et al.*, 1997), nous montrons une apparition marquée des thymocytes SP CD8⁺ chez les souris transgéniques (figure 11). Ce phénotype est dépendant de la molécule de co-stimulation CD28 mais non de CD2. La stimulation par CD2 ou CD28 joue un grand rôle dans la prolifération et l'activation des lymphocytes T. Cependant, les rôles de ces deux molécules dans le développement des cellules T ne sont pas clairs. Certaines études suggèrent que l'interaction de CD28 avec ses ligands joue un rôle important dans la sélection négative des thymocytes en développement et l'élimination de clones autoréactifs (Gao *et al.*, 2002). Par ailleurs, la surexpression des ligands de CD28, CD80/CD86, influence la différenciation des thymocytes DP favorisant la génération de thymocytes SP CD8⁺ (Yu *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été démontré que le blocage de l'interaction CD28-CD80/CD86 augmente la

sélection positive des thymocytes double positifs $CD4^+CD8^+$ en thymocytes simples positifs $CD4^+$ ou $CD8^+$ (Vacchio *et al.*, 2005). Dok-1 est un substrat de la voie d'activation CD28. Il est donc possible que cette protéine adaptatrice soit responsable de la régulation des signaux engendrés par la stimulation du récepteur CD28 lors de la sélection positive des DP favorisant la maturation des SP $CD8^+$. Nos études permettront d'élucider l'implication de la voie de signalisation induite par CD28 sur l'expansion/sélection des thymocytes, en plus de comprendre le rôle de Dok-1 dans cette cascade de signalisation. Les résultats préliminaires observés à l'aide du système de culture de signalisation/récupération *in vitro* montrent une apparition marquée des thymocytes SP $CD8^+$ chez les souris transgéniques dans des conditions de stimulation dépendante de CD28. La population des thymocytes DP mise en culture contient également des thymocytes SP $CD8^+$. Bien que nous ayons vérifié que les cellules $CD8^+$ SP des souris Dok-1 transgéniques et des souris de type sauvage prolifèrent de façon identique *in vitro* (résultat non montré), nous voulons nous assurer que l'apparition des SP $CD8^+$ dérive uniquement de la différenciation des DP. Pour ce faire, les souris transgéniques surexprimant Dok-1 seront croisées avec des souris déficientes pour l'expression de Tap1 (Tg Dok-1 x Tap1^{-/-}). Le thymus et la rate des souris Tap1 déficientes sont dépourvus de cellules T $CD8^+$. Le même type d'expérience sera repris avec les thymocytes des souris Tg Dok-1 x Tap1^{-/-} et la maturation préférentielle des thymocytes en $CD8^+$ dans des conditions dépendantes et indépendantes de CD28 sera vérifiée. D'autres études seront nécessaires afin de préciser la fonction de Dok-1 dans le développement, la prolifération et la survie des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$.

Par ailleurs, nos résultats montrent que la protéine Dok-1 joue un rôle dans la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ stimulés par le TCR ou TCR plus CD28 (figure 7). La production d'IL-2 est diminuée tandis que la sécrétion d'IFN- γ est amplifiée et la production d'IL-4 est inchangée. L'atténuation de la sécrétion de l'IL-2 n'est pas surprenante puisqu'elle a déjà été observée chez les cellules Jurkat T stimulées par CD3. Cette étude a été effectuée dans notre laboratoire et montrait une inhibition de l'activation de NFAT et de la production d'IL-2 via un mécanisme indépendant de l'activation des kinases ERK1/2 ou de la mobilisation du calcium (Nemorin *et al.*, 2001). La diminution de la production d'IL-2 et l'augmentation d'IFN- γ pourraient être la conséquence d'un défaut développemental

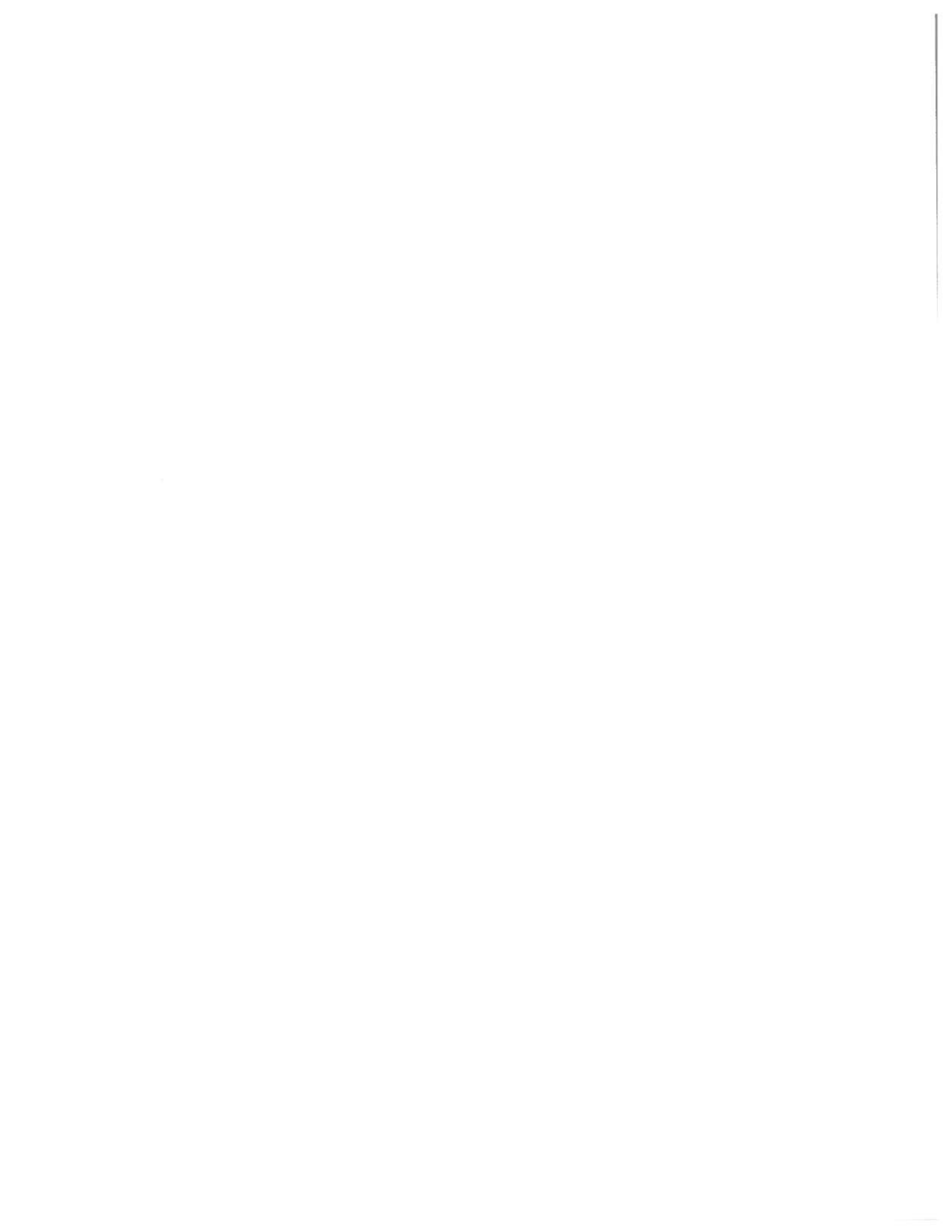
des cellules T. Les souris Dok-1 transgéniques possèdent une plus grande proportion de cellules T à phénotype mémoire, observation jugée par le profil d'expression de CD44. Il semble donc que Dok-1 puisse influencer la réponse des cellules T matures. Cependant, les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ n'ont aucun défaut prolifératif *in vitro*, régulent normalement l'expression des marqueurs d'activation CD5 et CD69 et expriment de façon comparable aux cellules des souris de type sauvage CD62L, un autre marqueur de phénotype mémoire. D'autre part, il est important de souligner que les cellules T de souris transgéniques présentant un profil d'expression de CD44 comparable à celui des cellules T de souris de type sauvage (Tg 82 versus WT, figure 8) ont tout de même une réponse T altérée (figure 8). Une autre possibilité permettant d'expliquer l'augmentation de la sécrétion d'IFN- γ et la diminution d'IL-2 chez nos souris transgéniques serait que Dok-1 soit impliqué dans la régulation différentielle des voies de signalisation menant à la production des cytokines. Nous pouvons supposer que Dok-1 puisse influencer l'activité de facteurs de transcription impliqués dans cette régulation de la production de cytokines. Par exemple, le facteur de transcription T-bet est un bon candidat puisqu'il augmente la synthèse d'IFN- γ et régule à la baisse celle de l'IL-2 (Szabo *et al.*, 2000).

En conclusion, nos résultats indiquent que Dok-1 participe à la régulation de la signalisation induite par le TCR lors de l'activation des cellules T. Cette protéine adaptatrice est impliquée dans le développement des cellules T notamment lors de la transition des stades DN/DP et possiblement lors de la sélection positive des thymocytes favorisant le développement de la lignée CD8⁺ dans des conditions dépendantes de CD28. Par ailleurs, la surexpression de Dok-1 n'altère pas la capacité des lymphocytes T à proliférer *in vitro*. Enfin, la surexpression de Dok-1 influence la capacité des cellules T à sécréter l'IL-2 et l'INF- γ , mais non l'IL-4. La caractérisation des interactions moléculaires mises en jeu par Dok-1 et son implication dans la voie de signalisation initiée par le récepteur de co-stimulation CD28 pourraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent la maturation et l'activation des lymphocytes T.

La cellule T est régulée de manière très stricte afin d'éviter une activation non spécifique. Nous pouvons imaginer que Dok-1 peut agir à différents niveaux dans la

cascade des signaux intracellulaires engendrés lors du contact cellule T-APC. Par ailleurs, nous pouvons envisager la possibilité que le signal émis lors du coengagement de CD28 empêcherait l'activation de la cellule T tant que le signal généré par le complexe TCR-peptide/CMH n'est pas suffisamment puissant pour interrompre la phosphorylation de Dok-1.

Le modèle de souris transgénique généré pour ce travail représente un excellent outil de travail pour étudier *in vitro* et *in vivo* le rôle de Dok-1 dans l'activation lymphocytaire. D'autres études seront nécessaires pour comprendre les fonctions de Dok-1 lors de l'activation de la cellule T. Par exemple, les souris Dok-1 transgéniques pourront être croisées avec des souris TCR transgéniques exprimant un TCR spécifique pour un antigène donné. Les souris double transgéniques ainsi générées pourront nous permettre d'étudier d'une part l'effet de la surexpression de Dok-1 sur la sélection positive et négative des thymocytes en utilisant des modèles de souris exprimant le TCR transgénique adéquat. D'autre part, nous pourrions stimuler de manière plus physiologique nos cellules à l'aide d'antigène spécifique du TCR choisi et ainsi étudier le rôle modulateur de Dok-1 lors d'une stimulation antigénique. La caractérisation des régulateurs négatifs d'activation comme Dok-1 est un atout pour la mise au point de divers traitements notamment dans le cas de maladies autoimmunes causées par des lymphocytes T hyperactivés.



RÉFÉRENCES

- ACUTO, O. et F. Michel. 2003. «CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling». Nat Rev Immunol, vol. 3, p. 939-51.
- AKASHI, K., M. Kondo et I. L. Weissman. 1998. «Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells». Immunological Reviews, vol. 165, p. 13-28.
- ALBEROLA-ILA, J., K. A. Forbush, R. Seger, E. G. Krebs et R. M. Perlmutter. 1995. «Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation». Nature, vol. 373, p. 620-3.
- ALBEROLA-ILA, J., S. Takaki, J. D. Kerner et R. M. Perlmutter. 1997. «Differential signaling by lymphocyte antigen receptors». Annual Review of Immunology, vol. 15, p. 125-54.
- ALEXANDER, D. R. 2000. «The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function». Seminars in Immunology, vol. 12, p. 349-59.
- ANDERSON, S. J. et R. M. Perlmutter. 1995. «A signaling pathway governing early thymocyte maturation». Immunology Today, vol. 16, p. 99-105.
- APPLEMAN, L. J. et V. A. Boussiotis. 2003. «T cell anergy and costimulation». Immunological Reviews, vol. 192, p. 161-80.
- APPLEMAN, L. J., A. A. van Puijenbroek, K. M. Shu, L. M. Nadler et V. A. Boussiotis. 2002. «CD28 costimulation mediates down-regulation of p27kip1 and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells». Journal of Immunology, vol. 168, p. 2729-36.
- ASHTON-RICKARDT, P. G., A. Bandeira, J. R. Delaney, L. Van Kaer, H. P. Pircher, R. M. Zinkernagel et S. Tonegawa. 1994. «Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus». Cell, vol. 76, p. 651-63.
- ASHWELL, J. D. et R. D. Klusner. 1990. «Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor». Annual Review of Immunology, vol. 8, p. 139-67.
- BEALS, C. R., C. M. Sheridan, C. W. Turck, P. Gardner et G. R. Crabtree. 1997. «Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3». Science, vol. 275, p. 1930-4.
- BENDELAC, A., P. Matzinger, R. A. Seder, W. E. Paul et R. H. Schwartz. 1992. «Activation events during thymic selection». Journal of Experimental Medicine, vol. 175, p. 731-42.
- BERG, K. L., K. A. Siminovitch et E. R. Stanley. 1999. «SHP-1 regulation of p62(DOK) tyrosine phosphorylation in macrophages». Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 35855-65.

BERRIDGE, M. J. 1993. «Inositol trisphosphate and calcium signalling». Nature, vol. 361, p. 315-25.

BLUESTONE, J. A. 1995. «New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation». Immunity, vol. 2, p. 555-9.

BOISE, L. H., A. J. Minn, P. J. Noel, C. H. June, M. A. Accavitti, T. Lindsten et C. B. Thompson. 1995. «CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL». Immunity, vol. 3, p. 87-98.

BOSSELUT, R., T. I. Guinter, S. O. Sharrow et A. Singer. 2003. «Unraveling a revealing paradox: Why major histocompatibility complex I-signaled thymocytes "paradoxically" appear as CD4+8lo transitional cells during positive selection of CD8+ T cells». Journal of Experimental Medicine, vol. 197, p. 1709-19.

BRUGNERA, E., A. Bhandoola, R. Cibotti, Q. Yu, T. I. Guinter, Y. Yamashita, S. O. Sharrow et A. Singer. 2000. «Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells». Immunity, vol. 13, p. 59-71.

BRUNNER, M. C., C. A. Chambers, F. K. Chan, J. Hanke, A. Winoto et J. P. Allison. 1999. «CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation». Journal of Immunology, vol. 162, p. 5813-20.

BULFONE-PAUS, S., D. Ungureanu, T. Pohl, G. Lindner, R. Paus, R. Ruckert, H. Krause et U. Kunzendorf. 1997. «Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo». Nature Medicine, vol. 3, p. 1124-8.

BURTRUM, D. B., S. Kim, E. C. Dudley, A. C. Hayday et H. T. Petrie. 1996. «TCR gene recombination and alpha beta-gamma delta lineage divergence: productive TCR-beta rearrangement is neither exclusive nor preclusive of gamma delta cell development». Journal of Immunology, vol. 157, p. 4293-6.

CANTRELL, D. 1996. «T cell antigen receptor signal transduction pathways». Annual Review of Immunology, vol. 14, p. 259-74.

CARDING, S. R. et P. J. Egan. 2002. «Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity». Nat Rev Immunol, vol. 2, p. 336-45.

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

CIBOTTI, R., J. A. Punt, K. S. Dash, S. O. Sharrow et A. Singer. 1997. «Surface molecules that drive T cell development in vitro in the absence of thymic epithelium and in the absence of lineage-specific signals». Immunity, vol. 6, p. 245-55.

COUDRONNIERE, N., M. Villalba, N. Englund et A. Altman. 2000. «NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, p. 3394-9.

- CRABTREE, G. R. et N. A. Clipstone. 1994. «Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes». Annual Review of Biochemistry, vol. 63, p. 1045-83.
- CROMPTON, T., K. C. Gilmour et M. J. Owen. 1996. «The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte». Cell, vol. 86, p. 243-51.
- CROWDER, R. J., H. Enomoto, M. Yang, E. M. Johnson Jr et J. Milbrandt. 2004. «Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth». Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 42072-81.
- D'AMBROSIO, D., D. A. Cantrell, L. Frati, A. Santoni et R. Testi. 1994. «Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression». European Journal of Immunology, vol. 24, p. 616-20.
- DAVIDSON, D., M. Bakinowski, M. L. Thomas, V. Horejsi et A. Veillette. 2003. «Phosphorylation-dependent regulation of T-cell activation by PAG/Cbp, a lipid raft-associated transmembrane adaptor». Molecular and Cellular Biology, vol. 23, p. 2017-28.
- DAVIS, C. B., N. Killeen, M. E. Crooks, D. Raulet et D. R. Littman. 1993. «Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes». Cell, vol. 73, p. 237-47.
- DAVIS, S. J., S. Ikemizu, E. J. Evans, L. Fugger, T. R. Bakker et P. A. van der Merwe. 2003. «The nature of molecular recognition by T cells». Nat Immunol, vol. 4, p. 217-24.
- DE LA HERA, A., U. Muller, C. Olsson, S. Isaaz et A. Tunnacliffe. 1991. «Structure of the T cell antigen receptor (TCR): two CD3 epsilon subunits in a functional TCR/CD3 complex». Journal of Experimental Medicine, vol. 173, p. 7-17.
- DI CRISTOFANO, A., N. Carpino, N. Dunant, G. Friedland, R. Kobayashi, A. Strife, D. Wisniewski, B. Clarkson, P. P. Pandolfi et M. D. Resh. 1998. «Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins». Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 4827-30.
- DI CRISTOFANO, A., M. Niki, M. Zhao, F. G. Karnell, B. Clarkson, W. S. Pear, L. Van Aelst et P. P. Pandolfi. 2001. «p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl)». Journal of Experimental Medicine, vol. 194, p. 275-84.
- DIEHL, N. L., H. Enslin, K. A. Fortner, C. Merritt, N. Stetson, C. Charland, R. A. Flavell, R. J. Davis et M. Rinc inverted question mark. 2000. «Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo». Journal of Experimental Medicine, vol. 191, p. 321-34.

- DISANTO, J. P. 1997. «Cytokines: shared receptors, distinct functions». Current Biology, vol. 7, p. R424-6.
- DOWER, N. A., S. L. Stang, D. A. Bottorff, J. O. Ebinu, P. Dickie, H. L. Ostergaard et J. C. Stone. 2000. «RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling». Nature Immunology, vol. 1 (4), p. 317-21.
- EGAN, S. E., B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland et R. A. Weinberg. 1993. «Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation». Nature, vol. 363, p. 45-51.
- ELLIS, C., M. Moran, F. McCormick et T. Pawson. 1990. «Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases». Nature, vol. 343, p. 377-81.
- ERNST, B., C. D. Surh et J. Sprent. 1995. «Thymic selection and cell division». Journal of Experimental Medicine, vol. 182, p. 961-71.
- FALK, I., A. J. Potocnik, T. Barthlott, C. N. Levelt et K. Eichmann. 1996. «Immature T cells in peripheral lymphoid organs of recombina-activating gene-1/-2-deficient mice. Thymus dependence and responsiveness to anti-CD3 epsilon antibody». Journal of Immunology, vol. 156, p. 1362-8.
- FAVRE, C., A. Gerard, E. Clauzier, P. Pontarotti, D. Olive et J. A. Nunes. 2003. «DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells». Genes Immun, vol. 4, p. 40-5.
- FEHLING, H. J., B. M. Iritani, A. Krotkova, K. A. Forbush, C. Laplace, R. M. Perlmutter et H. von Boehmer. 1997. «Restoration of thymopoiesis in pT alpha-/- mice by anti-CD3epsilon antibody treatment or with transgenes encoding activated Lck or tailless pT alpha». Immunity, vol. 6, p. 703-14.
- FEHLING, H. J., A. Krotkova, C. Saint-Ruf et H. von Boehmer. 1995. «Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells». Nature, vol. 375, p. 795-8.
- FRAUWIRTH, K. A., J. L. Riley, M. H. Harris, R. V. Parry, J. C. Rathmell, D. R. Plas, R. L. Elstrom, C. H. June et C. B. Thompson. 2002. «The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism». Immunity, vol. 16, p. 769-77.
- FUKAI, I., R. E. Hussey, R. Sunder-Plassmann et E. L. Reinherz. 2000. «A critical role for p59(fyn) in CD2-based signal transduction». European Journal of Immunology, vol. 30, p. 3507-15.
- GAO, J. X., H. Zhang, X. F. Bai, J. Wen, X. Zheng, J. Liu, P. Zheng et Y. Liu. 2002. «Perinatal blockade of b7-1 and b7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells». Journal of Experimental Medicine, vol. 195, p. 959-71.
- GERARD, A., C. Favre, F. Garcon, J. G. Nemorin, P. Duplay, S. Pastor, Y. Collette, D. Olive et J. A. Nunes. 2004. «Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase». Oncogene, vol. 23, p. 1594-8.

- GODFREY, D. I., J. Kennedy, P. Mombaerts, S. Tonegawa et A. Zlotnik. 1994. «Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation». Journal of Immunology, vol. 152, p. 4783-92.
- GODFREY, D. I., J. Kennedy, T. Suda et A. Zlotnik. 1993. «A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression». Journal of Immunology, vol. 150, p. 4244-52.
- GOLDRATH, A. W., K. A. Hogquist et M. J. Bevan. 1997. «CD8 lineage commitment in the absence of CD8». Immunity, vol. 6, p. 633-42.
- GRAKOU, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen et M. L. Dustin. 1999. «The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation». Science, vol. 285, p. 221-7.
- GRAVES, J. D., J. S. Campbell et E. G. Krebs. 1995. «Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade». Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 766, p. 320-43.
- GREEN, J. M., V. Karpitskiy, S. L. Kimzey et A. S. Shaw. 2000. «Coordinate regulation of T cell activation by CD2 and CD28». Journal of Immunology, vol. 164, p. 3591-5.
- GRIMM, J., M. Sachs, S. Britsch, S. Di Cesare, T. Schwarz-Romond, K. Alitalo et W. Birchmeier. 2001. «Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation». Journal of Cell Biology, vol. 154, p. 345-54.
- GROVES, T., P. Smiley, M. P. Cooke, K. Forbush, R. M. Perlmutter et C. J. Guidos. 1996. «Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development». Immunity, vol. 5, p. 417-28.
- GUGASYAN, R., C. Quilici, S. T. I, D. Grail, A. M. Verhagen, A. Roberts, T. Kitamura, A. R. Dunn et P. Lock. 2002. «Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites». Journal of Cell Biology, vol. 158, p. 115-25.
- GUIDOS, C. J., I. L. Weissman et B. Adkins. 1989. «Intrathymic maturation of murine T lymphocytes from CD8+ precursors». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 86, p. 7542-6.
- HARADA, Y., E. Tanabe, R. Watanabe, B. D. Weiss, A. Matsumoto, H. Ariga, O. Koiwai, Y. Fukui, M. Kubo, C. H. June et R. Abe. 2001. «Novel role of phosphatidylinositol 3-kinase in CD28-mediated costimulation». Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 9003-8.
- HOLDORF, A. D., K. H. Lee, W. R. Burack, P. M. Allen et A. S. Shaw. 2002. «Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse». Nature Immunology, vol. 3, p. 259-64.

ITANO, A., P. Salmon, D. Kioussis, M. Tolaini, P. Corbella et E. Robey. 1996. «The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells». Journal of Experimental Medicine, vol. 183, p. 731-41.

IZQUIERDO, M., S. J. Leever, D. H. Williams, C. J. Marshall, A. Weiss et D. Cantrell. 1994. «The role of protein kinase C in the regulation of extracellular signal-regulated kinase by the T cell antigen receptor». European Journal of Immunology, vol. 24, p. 2462-8.

JONES, N. et D. J. Dumont. 1998. «The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R». Oncogene, vol. 17, p. 1097-108.

JONES, N. et D. J. Dumont. 1999. «Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required for attenuation of Erk MAP kinase activation». Current Biology, vol. 9, p. 1057-60.

KANE, L. P., J. Lin et A. Weiss. 2002. «It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation». Trends Immunol, vol. 23, p. 413-20.

KAPPLER, J. W., N. Roehm et P. Marrack. 1987. «T cell tolerance by clonal elimination in the thymus». Cell, vol. 49, p. 273-80.

KILLEEN, N., S. G. Stuart et D. R. Littman. 1992. «Development and function of T cells in mice with a disrupted CD2 gene». EMBO Journal, vol. 11, p. 4329-36.

KORETZKY, G. A. 1997. «The role of Grb2-associated proteins in T-cell activation». Immunology Today, vol. 18, p. 401-6.

KUNDIG, T. M., A. Shahinian, K. Kawai, H. W. Mittrucker, E. Sebzda, M. F. Bachmann, T. W. Mak TW et P. S. Ohashi. 1996, «Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells». Immunity, vol. 5 (1), p. 41-52.

LATOUR, S., G. Gish, C. D. Helgason, R. K. Humphries, T. Pawson et A. Veillette. 2001. «Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product». Nature Immunology, vol. 2, p. 681-90.

LECHLER, R., J. G. Chai, F. Marelli-Berg, G. Lombardi. «The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance». 2001. Immunology, vol. 103 (3), p. 262-9.

LEE, S., F. Roy, C. M. Galmarini, R. Accardi, J. Michelon, A. Viller, E. Cros, C. Dumontet et B. S. Sylla. 2004. «Frameshift mutation in the Dok1 gene in chronic lymphocytic leukemia». Oncogene, vol. 23, p. 2287-97.

LEMAY, S., D. Davidson, S. Latour et A. Veillette. 2000. «Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling». Molecular and Cellular Biology, vol. 20, p. 2743-54.

LEMMON, M. A. et K. M. Ferguson. 2000. «Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains». Biochemical Journal, vol. 350 Pt 1, p. 1-18.

LENSCHOW, D. J., T. L. Walunas et J. A. Bluestone. 1996. «CD28/B7 system of T cell costimulation». Annual Review of Immunology, vol. 14, p. 233-58.

- LINSLEY, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle et J. A. Ledbetter. 1991. «CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7». Journal of Experimental Medicine, vol. 174, p. 561-9.
- LINSLEY, P. S., J. L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J. A. Ledbetter et R. Peach. 1994. «Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors». Immunity, vol. 1, p. 793-801.
- LUCAS, P. J., I. Negishi, K. Nakayama, L. E. Fields et D. Y. Loh. 1995. «Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response». Journal of Immunology, vol. 154, p. 5757-68.
- MACHESKY, L. M. et R. H. Insall. 1999. «Signaling to actin dynamics». Journal of Cell Biology, vol. 146, p. 267-72.
- MALEK, T. R., B. O. Porter et Y. W. He. 1999. «Multiple gamma c-dependent cytokines regulate T-cell development». Immunology Today, vol. 20, p. 71-6.
- MARTELLI, M. P., J. Boomer, M. Bu et B. E. Bierer. 2001. «T cell regulation of p62(dok) (Dok1) association with Crk-L». Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 45654-61.
- MASTER, Z., N. Jones, J. Tran, J. Jones, R. S. Kerbel et D. J. Dumont. 2001. «Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak». EMBO Journal, vol. 20, p. 5919-28.
- MCADAM, A. J., A. N. Schweitzer et A. H. Sharpe. 1998. «The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells». Immunological Reviews, vol. 165, p. 231-47.
- MICHEL, F., G. Attal-Bonnefoy, G. Mangino, S. Mise-Omata et O. Acuto. 2001. «CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities». Immunity, vol. 15, p. 935-45.
- MICHEL, F., G. Mangino, G. Attal-Bonnefoy, L. Tuosto, A. Alcover, A. Roumier, D. Olive et O. Acuto. 2000. «CD28 utilizes Vav-1 to enhance TCR-proximal signaling and NF-AT activation». Journal of Immunology, vol. 165, p. 3820-9.
- MILLER, A. T. et L. J. Berg. 2002. «New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system». Current Opinion in Immunology, vol. 14, p. 331-40.
- MOINGEON, P., H. C. Chang, P. H. Sayre, L. K. Clayton, A. Alcover, P. Gardner et E. L. Reinherz. 1989. «The structural biology of CD2». Immunological Reviews, vol. 111, p. 111-44.
- MOMBAERTS, P., S. J. Anderson, R. M. Perlmutter, T. W. Mak et S. Tonegawa. 1994. «An activated lck transgene promotes thymocyte development in RAG-1 mutant mice». Immunity, vol. 1, p. 261-7.

- MOMBAERTS, P., A. R. Clarke, M. A. Rudnicki, J. Iacomini, S. Itoharu, J. J. Lafaille, L. Wang, Y. Ichikawa, R. Jaenisch, M. L. Hooper et al. 1992. «Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages». Nature, vol. 360, p. 225-31.
- NEET, K. et T. Hunter. 1995. «The nonreceptor protein-tyrosine kinase CSK complexes directly with the GTPase-activating protein-associated p62 protein in cells expressing v-Src or activated c-Src». Molecular and Cellular Biology, vol. 15, p. 4908-20.
- NEGISHI, I., N. Motoyama, K. Nakayama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A. C. Chan et D. Y. Loh. 1995. «Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes». Nature, vol. 376, p. 435-8.
- NELMS, K., A. L. Snow, J. Hu-Li et W. E. Paul. 1998. «FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation». Immunity, vol. 9, p. 13-24.
- NEMORIN, J. G. et P. Duplay. 2000. «Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling». Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 14590-7.
- NEMORIN, J. G., P. Laporte, G. Berube et P. Duplay. 2001. «p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells». Journal of Immunology, vol. 166, p. 4408-15.
- NIKI, M., A. Di Cristofano, M. Zhao, H. Honda, H. Hirai, L. Van Aelst, C. Cordon-Cardo et P. P. Pandolfi. 2004. «Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression». Journal of Experimental Medicine, vol. 200, p. 1689-95.
- NOGUUCHI, T., T. Matozaki, K. Inagaki, M. Tsuda, K. Fukunaga, Y. Kitamura, T. Kitamura, K. Shii, Y. Yamanashi et M. Kasuga. 1999. «Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration». EMBO Journal, vol. 18, p. 1748-60.
- NUNES, J. A., A. Truneh, D. Olive et D. A. Cantrell. 1996. «Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules». Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 1591-8.
- OKABE, S., S. Fukuda, Y. J. Kim, M. Niki, L. M. Pelus, K. Ohyashiki, P. P. Pandolfi et 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, vol. 105, p. 474-80.
- OKUDA, K., Y. Sato, Y. Sonoda et J. D. Griffin. 2004. «The TEL/ARG leukemia oncogene promotes viability and hyperresponsiveness to hematopoietic growth factors». International Journal of Hematology, vol. 79, p. 138-46.
- OPENSHAW, P., E. E. Murphy, N. A. Hosken, V. Maino, K. Davis, K. Murphy et A. O'Garra. 1995. «Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations». Journal of Experimental Medicine, vol. 182, p. 1357-67.

- OTT, V. L., I. Tamir, M. Niki, P. P. Pandolfi et J. C. Cambier. 2002. «Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling». Journal of Immunology, vol. 168, p. 4430-9.
- PAZ, P. E., S. Wang, H. Clarke, X. Lu, D. Stokoe et A. Abo. 2001. «Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells». Biochemical Journal, vol. 356, p. 461-71.
- PENNINGER, J. M. et G. R. Crabtree. 1999. «The actin cytoskeleton and lymphocyte activation». Cell, vol. 96, p. 9-12.
- PIVNIOUK, V., E. Tsitsikov, P. Swinton, G. Rathbun, F. W. Alt et R. S. Geha. 1998. «Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76». Cell, vol. 94, p. 229-38.
- PRASAD, K. V., Y. C. Cai, M. Raab, B. Duckworth, L. Cantley, S. E. Shoelson et C. E. Rudd. 1994. «T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, p. 2834-8.
- RAAB, M., Y. C. Cai, S. C. Bunnell, S. D. Heyeck, L. J. Berg et C. E. Rudd. 1995. «p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 8891-5.
- RETH, M. 1989. «Antigen receptor tail clue». Nature, vol. 338, p. 383-4.
- RINCON, M., A. Whitmarsh, D. D. Yang, L. Weiss, B. Derijard, P. Jayaraj, R. J. Davis et R. A. Flavell. 1998. «The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes». Journal of Experimental Medicine, vol. 188, p. 1817-30.
- ROBEY, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, G. Weinmaster et P. Salmon. 1996. «An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages». Cell, vol. 87, p. 483-92.
- ROOSE, J. et A. Weiss. 2000. « T cells: getting a GRP on Ras». Nature Immunology, vol. 1 (4), p. 275-6.
- SALOMON, B. et J. A. Bluestone. 2001. «Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation». Annual Review of Immunology, vol. 19, p. 225-52.
- SCHMEDT, C., K. Saijo, T. Niidome, R. Kuhn, S. Aizawa et A. Tarakhovsky. 1998. «Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells». Nature, vol. 394, p. 901-4.

- SCHWARTZ, R. H. 2003. «T cell anergy». Annual Review of Immunology, vol. 21, p. 305-34.
- SEN, J., R. Kapeller, R. Fragoso, R. Sen, L. I. Zon et S. J. Burakoff. 1996. «Intrathymic signals in thymocytes are mediated by p38 mitogen-activated protein kinase». Journal of Immunology, vol. 156, p. 4535-8.
- SEONG, R. H., J. W. Chamberlain et J. R. Parnes. 1992. «Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail». Nature, vol. 356, p. 718-20.
- SHAH, K. et K. M. Shokat. 2002. «A chemical genetic screen for direct v-Src substrates reveals ordered assembly of a retrograde signaling pathway». Chemistry and Biology, vol. 9, p. 35-47.
- SHAHINIAN, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kündig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. O. Ohashi, C. B. Thompson et T. W. Mak. 1993. «Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice». Science, vol. 261, p. 609-12.
- SHARP, L. L., D. A. Schwarz, C. M. Bott, C. J. Marshall et S. M. Hedrick. 1997. «The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment». Immunity, vol. 7, p. 609-18.
- SHINKAI, Y., S. Koyasu, K. Nakayama, K. M. Murphy, D. Y. Loh, E. L. Reinherz et F. W. Alt. 1993. «Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes». Science, vol. 259, p. 822-5.
- SIMPSON, P. 1995. «Developmental genetics. The Notch connection». Nature, vol. 375, p. 736-7.
- SINGER, A. 2002. «New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision». Current Opinion in Immunology, vol. 14, p. 207-15.
- SONGYANG, Z., Y. Yamanashi, D. Liu et D. Baltimore. 2001. «Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signaling». Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 2459-65.
- SUZUKI, H., G. S. Duncan, H. Takimoto et T. W. Mak. 1997. «Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain». Journal of Experimental Medicine, vol. 185, p. 499-505.
- SZABO, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman et L. H. Glimcher. 2000. «A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment». Cell, vol. 100, p. 655-69.
- SZAMEL, M. et K. Resch. 1995. «T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways--activation and function of protein kinases C in T lymphocytes». European Journal of Biochemistry, vol. 228, p. 1-15.

- TAKESONO, A., L. D. Finkelstein et P. L. Schwartzberg. 2002. «Beyond calcium: new signaling pathways for Tec family kinases». Journal of Cell Science, vol. 115, p. 3039-48.
- TAMIR, I., J. C. Stolpa, C. D. Helgason, K. Nakamura, P. Bruhns, M. Daeron et J. C. Cambier. 2000. «The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells». Immunity, vol. 12, p. 347-58.
- TEH, H. S., P. Kisielow, B. Scott, H. Kishi, Y. Uematsu, H. Bluthmann et H. von Boehmer. 1988. «Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells». Nature, vol. 335, p. 229-33.
- VACCHIO, M. S., J. A. Williams et R. J. Hodes. 2005. «A novel role for CD28 in thymic selection: elimination of CD28/B7 interactions increases positive selection». European Journal of Immunology, vol. 35, p. 418-27.
- VAN DER MERWE, P. A. et S. J. Davis. 2003. «Molecular interactions mediating T cell antigen recognition». Annual Review of Immunology, vol. 21, p. 659-84.
- VAN DIJK, T. B., E. van Den Akker, M. P. Amelsvoort, H. Mano, B. Lowenberg et M. von Lindern. 2000. «Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells». Blood, vol. 96, p. 3406-13.
- VAN OERS, N. S., B. Lowin-Kropf, D. Finlay, K. Connolly et A. Weiss. 1996. «alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases». Immunity, vol. 5, p. 429-36.
- VEILLETTE, A. 2004. «Specialised adaptors in immune cells». Current Opinion in Cell Biology, vol. 16, p. 146-55.
- VEILLETTE, A., S. Latour et D. Davidson. 2002. «Negative regulation of immunoreceptor signaling». Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 669-707.
- VIOLA, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara et A. Lanzavecchia. 1999. «T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains». Science, vol. 283, p. 680-2.
- VON BOEHMER, H. 1996. «CD4/CD8 lineage commitment: back to instruction?». Journal of Experimental Medicine, vol. 183, p. 713-5.
- WASHBURN, T., E. Schweighoffer, T. Gridley, D. Chang, B. J. Fowlkes, D. Cado et E. Robey. 1997. «Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision». Cell, vol. 88, p. 833-43.
- WATERHOUSE, P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser et T. W. Mak. 1995. «Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4». Science, vol. 270, p. 985-8.

WICK, M. J., L. Q. Dong, D. Hu, P. Langlais et F. Liu. 2001. «Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt». Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 42843-50.

WOODROW, M., N. A. Clipstone et D. Cantrell. 1993. «p21ras and calcineurin synergize to regulate the nuclear factor of activated T cells». Journal of Experimental Medicine, vol. 178, p. 1517-22.

WOOLF, E., C. Xiao, O. Fainaru, J. Lotem, D. Rosen, V. Negreanu, Y. Bernstein, D. Goldenberg, O. Brenner, G. Berke, D. Levanon et Y. Groner. 2003. «Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, p. 7731-6.

YAMANASHI, Y. et D. Baltimore. 1997. «Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok». Cell, vol. 88, p. 205-11.

YAMANASHI, Y., T. Tamura, T. Kanamori, H. Yamane, H. Nariuchi, T. Yamamoto et D. Baltimore. 2000. «Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling». Genes and Development, vol. 14, p. 11-6.

YASUDA, T., M. Shirakata, A. Iwama, A. Ishii, Y. Ebihara, M. Osawa, K. Honda, H. Shinohara, K. Sudo, K. Tsuji, H. Nakauchi, Y. Iwakura, H. Hirai, H. Oda, T. Yamamoto et Y. Yamanashi. 2004. «Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia». Journal of Experimental Medicine, vol. 200, p. 1681-7.

YASUTOMO, K., C. Doyle, L. Miele, C. Fuchs et R. N. Germain. 2000. «The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate». Nature, vol. 404, p. 506-10.

YODER, J., C. Pham, Y. M. Iizuka, O. Kanagawa, S. K. Liu, J. McGlade et A. M. Cheng. 2001. «Requirement for the SLP-76 adaptor GADS in T cell development». Science, vol. 291, p. 1987-91.

YU, Q., B. Erman, A. Bhandoola, S. O. Sharrow et A. Singer. 2003. «In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells». Journal of Experimental Medicine, vol. 197, p. 475-87.

YU, X., S. Fournier, J. P. Allison, A. H. Sharpe et R. J. Hodes. 2000. «The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis». Journal of Immunology, vol. 164, p. 3543-53.

ZHANG, L., V. Camerini, T. P. Bender et K. S. Ravichandran. 2002. «A nonredundant role for the adapter protein Shc in thymic T cell development». Nat Immunol, vol. 3, p. 749-55.

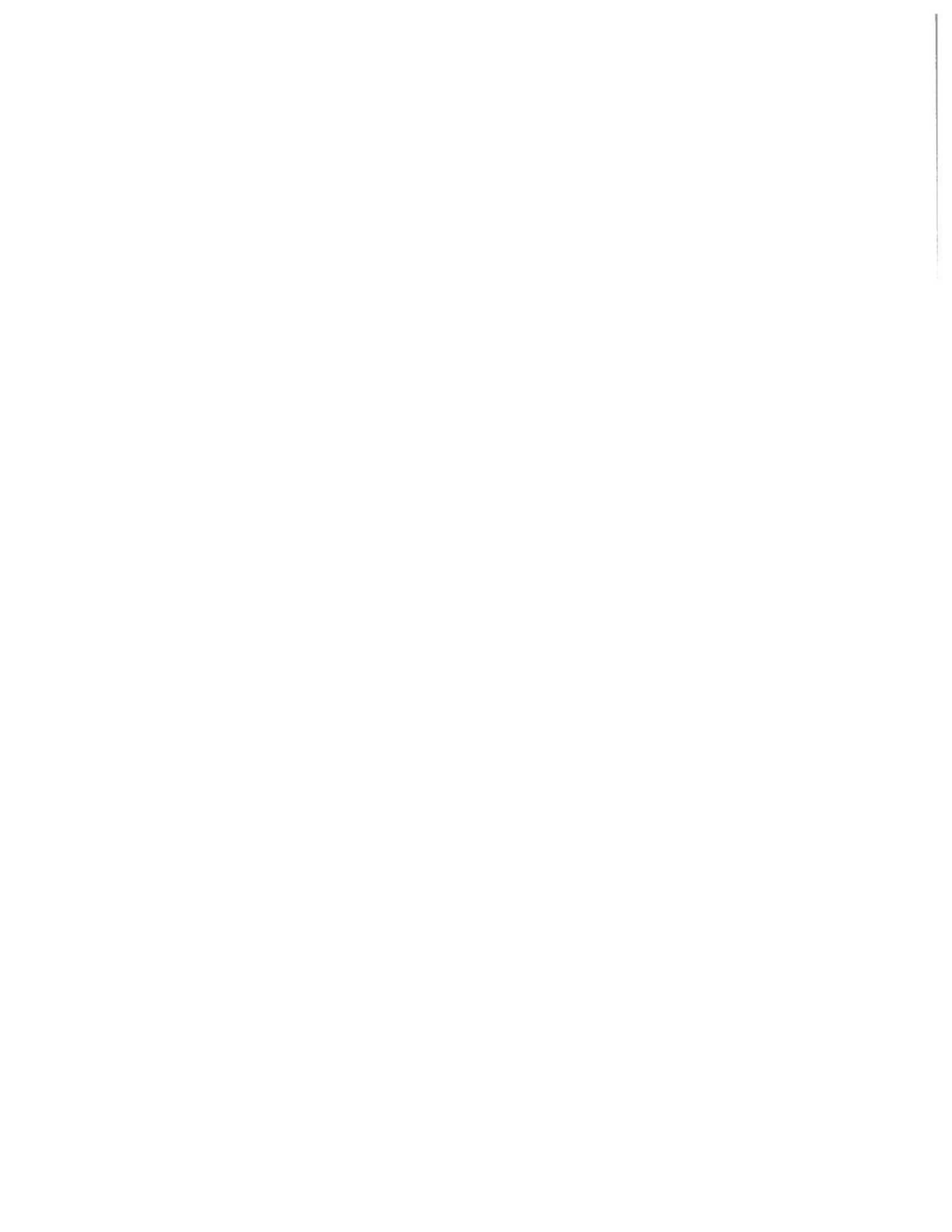
ZHANG, W. et L. E. Samelson. 2000. «The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling». Seminars in Immunology, vol. 12, p. 35-41.

ZHANG, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. DeJarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, H. C. Tsay, H. M. Jacobs, C. M. Kessler, E. O. Long, P. E. Love et L. E. Samelson. 1999. «Essential role of LAT in T cell development». Immunity, vol. 10, p. 323-32.

ZHANG, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough et J. Sprent. 1998. «Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15». Immunity, vol. 8, p. 591-9.

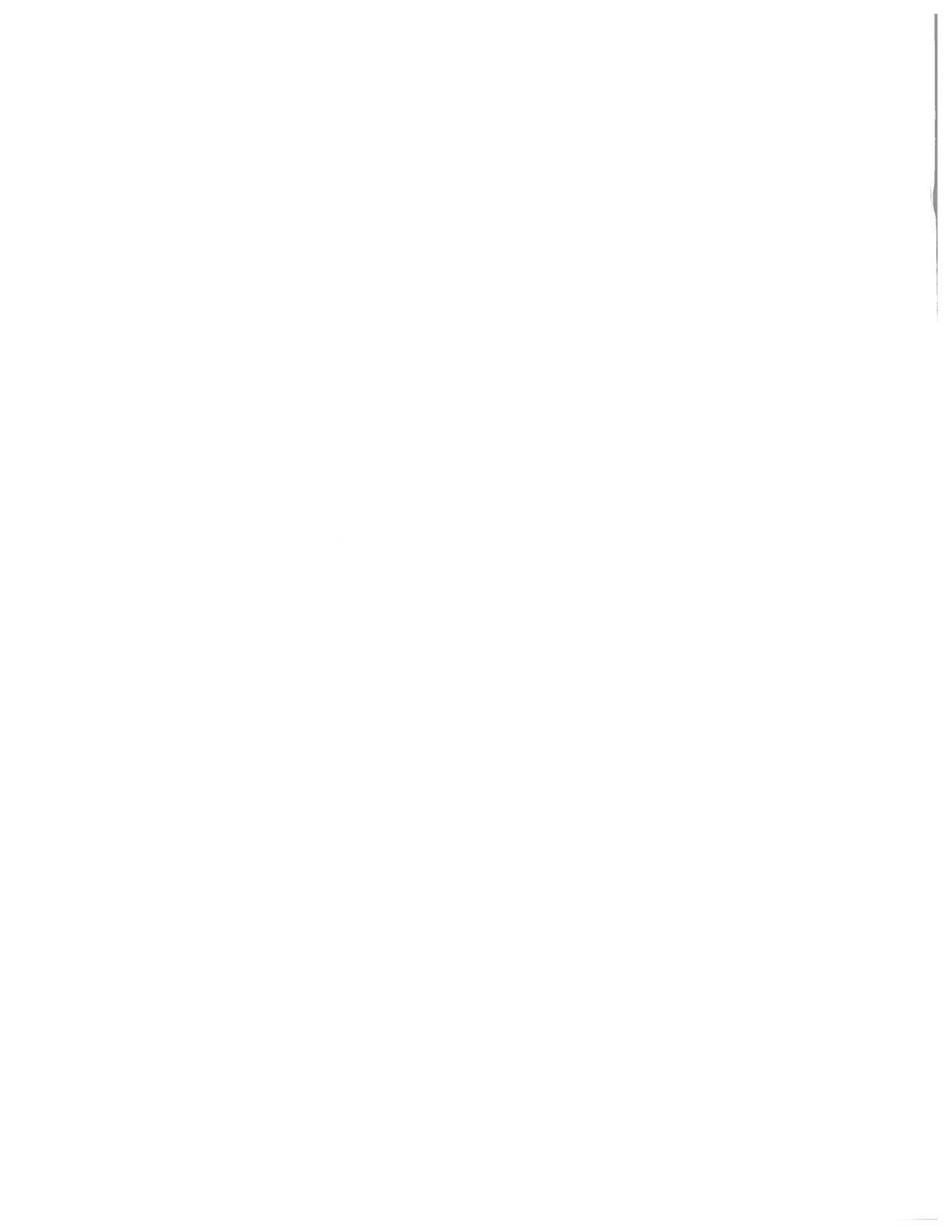
ZHAO, M., A. A. Schmitz, Y. Qin, A. Di Cristofano, P. P. Pandolfi et L. Van Aelst. 2001. «Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation». Journal of Experimental Medicine, vol. 194, p. 265-74.

ZHOU, X. Y., Y. Yashiro-Ohtani, M. Nakahira, W. R. Park, R. Abe, T. Hamaoka, M. Naramura, H. Gu et H. Fujiwara. 2002. «Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation». Journal of Immunology, vol. 168, p. 3847-54.



ANNEXE A

Lettre de confirmation de soumission pour publication



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

From: The Journal of Immunology [mailto:admin@ji-emts.org]
Sent: Thu 3/3/2005 7:16 AM
To: Duplay, Pascale (IAF) (LAVAL)
Subject: The JI Ms. No. 05-1668

Dear Dr. Duplay:

This email is to acknowledge receipt of all appropriate materials for your manuscript entitled "transgenic expression of Dok-1 interferes with T cell development and cytokine secretion" to be considered for publication in The Journal of Immunology. Your manuscript has been assigned the manuscript identification number 05-1668.

A further notice will be emailed as soon as a decision has been reached concerning the suitability of this paper for publication. Please refer to the manuscript identification number in all inquiries. You can check the status of your manuscript online by logging in and selecting Check The Status Of A Manuscript from the Main Menu.

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.

