

INRS-Institut Armand Frappier

DOK-1: RÉGULATEUR NÉGATIF DE LA
TRANSDUCTION DES SIGNAUX DES
LYMPHOCYTES T

Par
Jean-Guy Némorin

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Santé Humaine, Immunologie et Virologie

Jury d'évaluation

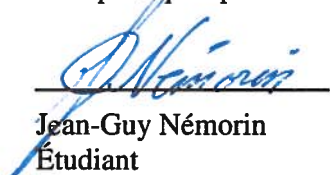
François Denis PhD.	Président du Jury
Richard Blouin PhD.	Examineur Externe
Sylvain Bourgoin PhD.	Examineur Externe
Pascale Duplay PhD.	Directeur de Recherche

RÉSUMÉ

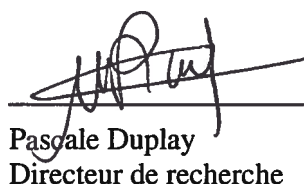
L'intégration des signaux issus du TCR et ceux issus d'autres récepteurs comme CD28 ou CD2 permettent l'assemblage de complexes multimoléculaires de signalisation qui vont orchestrer les différents programmes biologiques contrôlant le développement, la croissance et les fonctions effectrices des lymphocytes. Les molécules adaptatrices, bien que dépourvues d'activité enzymatique, sont des régulateurs essentiels de ces complexes multimoléculaires de signalisation. Les protéines de la famille dok sont des prototypes de molécules dites adaptatrices. Elles présentent plusieurs domaines ou motifs qui par le biais d'interactions «protéine : protéine» leur permettent de transférer un signal initié par des tyrosine kinases vers des mécanismes effecteurs. Deux membres de cette famille, dok-1 et dok-2, sont exprimés dans les cellules T mais leur rôle dans la transduction des signaux est encore très peu connu. Nous avons montré que la phosphorylation des protéines dok est spécifiquement induite suite à la stimulation des cellules T via CD2 et non pas via le TCR. Par ailleurs, nous avons démontré que la protéine tyrosine kinase Lck joue un rôle essentiel dans ce processus. De plus, une fois phosphorylées, les protéines dok-1 et dok-2 s'associent au domaine SH2 de Lck. Afin de mieux comprendre la fonction des protéines dok dans la cascade de signaux initiée par CD2, nous avons surexprimé de façon stable dans les cellules T Jurkat la protéine dok-1 et analysé différents événements déclenchés suite à une stimulation CD2. Cette étude nous a permis de montrer que dok-1 est un régulateur négatif impliqué dans l'activation de Erk1/2, la mobilisation de calcium et l'activation de NF-AT. L'effet inhibiteur corrèle avec une augmentation de la quantité de p120RasGAP recrutée à la membrane par l'intermédiaire de son association avec dok-1.

De manière à identifier les régions ou résidus clefs dans la fonction inhibitrice, nous avons généré et caractérisé fonctionnellement une série de mutants dok-1. Cette étude a permis de confirmer le rôle crucial de p120RasGAP dans l'inhibition de l'activation de Erk1/2. D'autre part, nous avons montré que le domaine PTB et la tyrosine 146 sont des résidus importants pour la phosphorylation de dok-1. En vertu de cette importance, ces résidus sont probablement impliqués dans le recrutement de dok-1 à la membrane. Cette étude nous a permis de proposer un modèle où la dimérisation de dok-1 est une étape clef dans la phosphorylation de dok-1 qui a lieu suite à la stimulation des cellules T via le récepteur CD2. La phosphorylation de dok-1 et dok-2 se produit aussi suite à une stimulation CD28 du lymphocyte T. Dans ces conditions, il a été démontré que la tyrosine kinase Tec est responsable, au moins en partie, de la phosphorylation de dok-1. Nous avons donc entrepris d'étudier l'implication des protéines dok dans la régulation de la fonction de la kinase Tec. Nous avons démontré que l'activation de Tec induit son association à dok-1 et dok-2, ce qui a pour conséquence d'induire une diminution de la phosphorylation de Tec. Cette étude nous a permis de conclure que dok-1 et dok-2 réguleraient négativement la fonction de Tec en inhibant son activité et les voies de signalisation initiées suite à son activation.

L'ensemble de nos travaux a apporté des informations importantes sur les mécanismes moléculaires mis en jeu par les protéines dok dans la modulation de la signalisation intracellulaire des lymphocytes T. Une meilleure compréhension du mode d'action des molécules impliquées dans la régulation négative de l'activation des cellules T pourrait permettre d'identifier des cibles potentielles contre lesquelles de nouvelles approches thérapeutiques pourront être développées.



Jean-Guy Némorin
Étudiant



Pascale Duplay
Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	V
LISTE DES TABLES.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
CONTRIBUTIONS.....	VIII
REMERCIEMENTS.....	IX
1 REVUE DE LITTÉRATURE	- 12 -
1.1 ACTIVATION DE LA CELLULE T : LE COMPLEXE TCR/CD3	- 13 -
1.1.1 Structure du TCR	- 13 -
1.1.2 Interaction entre le TCR et le CMH.....	- 15 -
1.1.3 Synapse Immunologique	- 17 -
1.1.4 Îlots lipidiques.....	- 19 -
1.2 PROTÉINES TYROSINE KINASE (PTK).....	- 20 -
1.2.1 Famille Src (p56Lck et p59Fyn)	- 21 -
1.2.2 Famille Syk	- 24 -
1.2.3 Famille Tec	- 26 -
1.3 ACTIVATION DU LYMPHOCYTE T : TRANSDUCTION DES SIGNAUX	- 27 -
1.3.1 Activation des PTKs.....	- 28 -
1.3.2 Le complexe multimoléculaire formé autour de LAT.....	- 28 -
1.3.3 Rôle de PLC γ 1 dans l'activation cellulaire	- 30 -
1.3.4 Calcium.....	- 31 -
1.3.5 MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases.....	- 32 -
1.4 RÉGULATION D'IL-2 : LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	- 38 -
1.4.1 Événements déclenchés par l'IL-2	- 38 -
1.4.2 Structure du promoteur d'IL-2.....	- 39 -
1.4.3 NF-AT.....	- 41 -
1.4.5 AP-1.....	- 42 -
1.5 RÉCEPTEURS QUI MODULENT L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T.....	- 43 -
1.5.1 CD4 et CD8	- 44 -
1.5.2 CD2.....	- 44 -
1.5.3 CD28.....	- 56 -
1.5.4 CTLA-4.....	- 59 -
1.6 PROTÉINES ADAPTATRICES	- 61 -
1.6.1 Protéines adaptatrices qui modulent négativement l'activation cellulaire.....	- 63 -
1.7 PROTÉINES DOK.....	- 71 -
1.7.1 dok-1	- 73 -
1.7.2 dok-2	- 79 -
1.7.3 dok-3	- 80 -
1.7.4 dok-4	- 81 -
1.7.5 dok-5	- 82 -
2 EVIDENCE THAT LCK-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF P56DOK AND P62DOK MAY PLAY A ROLE IN CD2 SIGNALING.....	- 83 -
2.1 MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE I	- 84 -
ARTICLE I:	- 86 -
3 P62DOK NEGATIVELY REGULATES CD2 SIGNALING IN JURKAT CELLS.....	- 91 -

3.1	MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE II.....	- 92 -
	ARTICLE II :	- 93 -
4	FUNCTIONAL INTERACTION OF RASGAP-BINDING PROTEINS DOK-1 AND DOK-2 WITH THE TEC PROTEIN TYROSINE KINASE.....	- 102 -
4.1	MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE III.....	- 103 -
	ARTICLE III:.....	- 104 -
5	RÉSULTATS ADDITIONNELS.....	- 109 -
6	DISCUSSION.....	- 120 -
6.1	PHOSPHORYLATION DE DOK-1	- 121 -
6.1.1	Identité des kinases qui phosphorylent dok-1	- 121 -
6.1.2	Phosphorylation à la membrane	- 122 -
6.1.3	Dok-1 et dok-2 : rôles respectifs.....	- 125 -
6.2	VOIES DE SIGNALISATION AFFECTÉES PAR DOK-1.....	- 128 -
6.2.1	dok-1 dans la voie ras	- 128 -
6.2.2	dok-1 dans la régulation du calcium.....	- 131 -
6.2.3	Effet de dok-1 sur l'activation de NF-AT	- 132 -
6.2.4	Effet de dok-1 sur la fonction de Tec	- 132 -
6.3	DOK-1 DANS UN MODÈLE D'ACTIVATION	- 133 -
6.3.1	dok-1 dans la génération d'un seuil d'activation.....	- 134 -
6.3.2	dok-1 et la stimulation via le TCR.....	- 134 -
6.3.3	dok-1 dans la terminaison du signal	- 136 -
6.4	DOK-1 DANS LE RÉARRANGEMENT DU CYTOSQUELETTE.....	- 136 -
7	CONCLUSION.....	- 137 -
8	RÉFÉRENCES.....	- 141 -

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BCR	B Cell Receptor
CD#	Cluster of Differentiation #
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CSK	C-terminal Src Kinase
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FcXR	Fc X receptor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GRB2	Growth Receptor Binding protein 2
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL-#	Interleukine #
IL#-R	Interleukine # Receptor
ITAM	Immuno-Tyrosine based Activation Motifs
ITIM	Immuno-Tyrosine based Inhibition Motifs
LAT	Linker for Activated T cells
LFA	Lymphocyte Function Associated
MCSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MTOC	Microtubule-Organizing Center
NFAT	Nuclear Factor for Activated T cells
NK	Natural Killer
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
RasGRP	Ras GTPase Releasing Protein
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamid Gel Electrophoresis
SHIP	Src homology 2 domain inositol phosphatase
SHP	SH2 containing Protein
SMAC	Supramolecular Activation Cluster
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SLP-76	Src homology 2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa
TCR	T Cell Receptor
Th	T helper cells
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

LISTE DES TABLES

TABLEAU I : PROTÉINES DE LA FAMILLE DOK..... - 73 -

TABLEAU II : EFFET DES MUTATIONS DE DOK-1 SUR SA FONCTION..... - 112 -

LISTE DES FIGURES

Figures des chapitres 1, 5 et 6

<i>Figure 1</i>	<i>Kinases impliquées dans l'activation de la cellule T.....</i>	<i>- 23 -</i>
<i>Figure 2</i>	<i>Signalisation par le TCR.....</i>	<i>- 29 -</i>
<i>Figure 3</i>	<i>Mobilisation de calcium dans la cellule T.</i>	<i>- 34 -</i>
<i>Figure 4A</i>	<i>Activation de la petite protéine G Ras</i>	<i>- 35 -</i>
<i>Figure 4B</i>	<i>Activation des MAPKs</i>	<i>- 36 -</i>
<i>Figure 5</i>	<i>Molécules associées au co-récepteur CD2.....</i>	<i>- 51 -</i>
<i>Figure 6</i>	<i>Protéines adaptatrices : inhibiteurs de l'activation cellulaire.</i>	<i>- 65 -</i>
<i>Figure 7</i>	<i>Famille de protéines dok (downstream of kinases).....</i>	<i>- 72 -</i>
<i>Figure 8</i>	<i>Niveaux d'expression et de phosphorylation des versions mutées de dok-1.</i>	<i>- 113 -</i>
<i>Figure 9</i>	<i>Activation des MAPKs</i>	<i>- 115 -</i>
<i>Figure 10</i>	<i>Activation du facteur de transcription NF-AT.</i>	<i>- 116 -</i>
<i>Figure 11</i>	<i>Modèle de phosphorylation de dok-1.....</i>	<i>- 123 -</i>
<i>Figure 12</i>	<i>Inactivation du domaine PTB.</i>	<i>- 127 -</i>
<i>Figure 13</i>	<i>Dok-1 et la p120RasGAP.....</i>	<i>- 129 -</i>
<i>Figure 14</i>	<i>Dok-1 dans un modèle d'activation.</i>	<i>- 135 -</i>

CONTRIBUTIONS

Article I

Pascale Duplay avait déjà généré les constructions qui codent pour les chimères EGFR/Lck de même que les clones Jurkats qui les exprimaient. Pascale Duplay avait aussi produit les constructions MBP-SH2Lck. Tous les résultats présentés dans cette publication sont issus des travaux que j'ai effectués. Ma contribution à la rédaction de cet article a été mineure.

Article II

Pierre Laporte a produit les premiers clones HAdok-1 et mis au point les techniques de transfections transitoires et d'essais luciférase. Geneviève Bérubé a produit les anticorps dirigés contre les portions PTB et C-terminale de dok-1. Les résultats présentés dans cette publication sont issus des travaux que j'ai effectués. La rédaction de cet article a été réalisée par Pascale Duplay et moi-même.

Article III

Ma participation à cet article se limite à la production de la construction qui code pour la version HAdok-1 muté à la tyrosine 315, à la production des clones Jurkat qui surexpriment HAdokYF315 et à la réalisation des immunoprécipitations sur ces clones. J'ai pu démontrer par cette approche que la mutation YF315 abolissait l'association de la p120RasGAP avec dok-1.

Résultats additionnels

Geneviève Bérubé et Iohann Boulay ont produit les protéines de fusion GST-PTB sauvage ou mutées pour les protéines dok-1 et dok-2. Iohann boulay a réalisé l'essai de liaison *in vitro* (figure 10). Ingrid Saba a produit la construction qui code pour une version de HAdok-1 dont le domaine PH est délété. Les autres résultats ont été réalisés par moi-même.

REMERCIEMENTS

Mes plus sincères remerciements à Pascale Duplay. Grâce à toi j'ai eu la chance de me développer comme chercheur, j'ai appris la rigueur scientifique et j'ai développé un sens critique aiguisé. Je ne saurais te remercier suffisamment pour m'avoir fourni un environnement de travail qui m'a permis de réaliser un doctorat dont je suis fier. Quelque part dans tes tâches de direction, tu as trouvé le temps de devenir pour moi une personne ressource qui m'a guidée pendant six années de ma vie. J'ai même découvert le Porto et la bonne bouffe française. Merci Pascale, j'ai réussi un doctorat dans ton laboratoire, j'ai appris sur la science et sur la recherche mais j'ai aussi grandi en ta présence en apprenant sur la vie.

Merci aux collègues de laboratoire qui m'ont côtoyé, supporté et subi pendant toutes ses années. Joanne : Tu m'en as appris sur l'ordre et l'importance de TOUT écrire. En toi, j'ai aussi eu l'occasion de regarder évoluer quelqu'un qui possède beaucoup de courage et selon moi, une force mentale et morale exceptionnelle. Aux étudiants qui m'ont côtoyé, vos forces et vos connaissances ont contribué à ma formation. Ainsi, par ordre chronologique d'apparition dans ma vie, je tiens à remercier Nadia Bonvouloir, Annie Viau, Marc Joannette, Geneviève Dépars, Pierre Laporte, Maryse Dupuis, Geneviève Bérubé, Iohann Boulay et Ingrid Saba. Je m'en voudrais de ne pas mentionner les collègues de travail qui, malheureusement pour eux, ne faisaient pas partie du laboratoire de Pascale. Anick Chalifour, tu m'as aidé du côté manips mais surtout tu m'as écouté et tu as pris le temps de discuter avec moi plusieurs fois plutôt qu'une. Tu m'a fais remettre plusieurs choses en perspective et aidé à poursuivre mes études alors que j'étais dans une période... disons difficile. Merci du fond du cœur. Aux étudiants du laboratoire d'Albert Descoteaux que j'ai côtoyés et à mon super partenaire de racket ball, Albert lui-même, je vous remercie d'avoir été là tout au long de mes études. J'ai fortement apprécié votre apport scientifique, les discussions diverses, les sorties amicales et oui, aussi me faire flanquer une raclée au racket ball. Je chérirai ces moments toute ma vie, ils sont gravés dans ma mémoire. Pour d'autres collègues qui m'ont côtoyé et qui ont contribué à ma formation scientifique, je vous remercie, sans vous mon doctorat n'aurait pas été l'ombre de ce qu'il est devenu.

Sylvie, tu es entrée dans ma vie vers la fin de mon doctorat mais ta présence, ton support et les discussions que nous avons partagées m'ont été très utiles. Plus que tout, je trouve en toi une source d'inspiration. Alix et Danny, être votre grand frère m'a enseigné plusieurs leçons qui m'ont servi et me servent toujours, vous m'avez toujours encouragé à votre façon et je vous en remercie. Mes parents, Henri et Jacqueline, je réussis et fais ma marque dans ce monde grâce aux qualités que vous m'avez transmises. Ma réussite sera toujours la vôtre. Et en plus je vous aime!

1 Revue de littérature

Les cellules T immatures ou thymocytes passent plusieurs étapes de différenciation, de maturation et de sélection dans le thymus. Les lymphocytes matures sont ensuite redirigés vers la périphérie où ils pourront être activés suite à une exposition à un antigène particulier. Cette activation s'effectue lorsque les cellules sont exposées aux complexes peptide/CMH présentés par des cellules présentatrices d'antigène ou CPA. Les lymphocytes T peuvent être classés en 2 groupes distincts selon la nature des sous-unités qui composent la moitié extracellulaire de l'immunorécepteur -le « T cell receptor » ou encore le TCR- de la cellule. Il s'agit des cellules T $\gamma\delta$ (groupe minoritaire) et des cellules T $\alpha\beta$ (groupe majoritaire). Parmi les cellules qui expriment un TCR de type « $\alpha\beta$ », il y a une distinction additionnelle à effectuer selon l'expression du co-récepteur CD4 ou CD8. Les cellules T CD4+ reconnaissent les antigènes présentés par le CMH de classe II alors que les cellules T CD8+ reconnaissent le complexe peptide/CMH de classe I. Outre l'utilisation de différents moyens de reconnaissance de l'antigène, les cellules T CD4+ et T CD8+ coordonnent des fonctions effectrices différentes dans une réponse immunitaire. Les cellules T CD8+ peuvent se différencier en cellules T cytotoxiques, les CTLs, (cytotoxic T-lymphocytes) lesquelles sont en mesure de lyser des cellules cibles infectées ou tumorales. Les cellules T CD4+ ont comme fonction principale la régulation de la réponse immune. Cette fonction est assurée en grande partie par les cytokines sécrétées par les cellules T CD4+ activées. Selon le contexte d'activation, le lymphocyte T CD4+ activé peut se différencier en 2 sous-groupes distincts de cellules T, les Th2 et les Th1. Ces sous-groupes sécrètent différentes combinaisons de cytokines, les cytokines IL-4, IL-5, IL-6, et IL-10 correspondent à un phénotype Th2 alors que les cellules qui produisent principalement les cytokines IFN- γ , GM-CSF, TNF α et β sont classées Th1. Les cellules Th2 sont surtout efficaces à promouvoir une réponse humorale c'est-à-dire promouvoir l'activation des lymphocytes B afin qu'ils produisent des anticorps. Les cellules Th1 sont plutôt adaptées à une réponse inflammatoire où les Th1 vont contribuer à l'activation des macrophages et monocytes qui présentent des antigènes en stimulant leurs capacités inflammatoires et bactéricides. L'activité inflammatoire affecte aussi les cellules de l'endothélium vasculaire qui répondent aux cytokines Th1 en augmentant l'expression de molécules

d'adhésion et de chimiokines afin d'attirer des cellules immunitaires à un site d'inflammation. Les cytokines sécrétées par les cellules T jouent aussi d'autres rôles importants dans les fonctions effectrices du lymphocyte. Par exemple, l'IL-2 et le GM-CSF agissent tous deux comme des agents prolifératifs, certaines cytokines dites anti-inflammatoires vont coordonner la terminaison de la réponse immune et d'autres cytokines peuvent déclencher les mécanismes d'induction de l'apoptose.

Ainsi, les cellules T sont instrumentales dans la génération d'une réponse immune complète et à ce titre, coordonnent plusieurs aspects de la réponse allant de son initiation jusqu'à sa terminaison. D'autres fonctions incluent l'activation d'autres effecteurs du système immunitaire tels les macrophages et enfin, la destruction de cellules cibles. La capacité des cellules T à réagir aux peptides présentés par les CPA dépend principalement de leur TCR. En effet, cette structure permet aux lymphocytes T d'effectuer la distinction entre les complexes peptides/CMH qui seront considérés comme du soi de ceux qui déclencheront une réponse immune spécifique.

1.1 Activation de la cellule T : le complexe TCR/CD3

1.1.1 Structure du TCR

Le TCR confère la spécificité de l'activation de la cellule T. À l'aide de 6 chaînes polypeptidiques assemblées dans une structure composée de 8 chaînes, le TCR cumule 2 fonctions dans l'activation cellulaire. La première, la reconnaissance d'un antigène spécifique, est assurée par un hétérodimère formé des chaînes α et β ou γ et δ . Les dimères $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ forment la sous-unité polymorphique du TCR. Le polymorphisme est généré par des étapes de recombinaison dont les mécanismes sont actifs lors de la maturation de la cellule dans le thymus (Paul, W. E., Silverstein, A. M. *et al.*, 1998). Ces chaînes sont reliées ensemble par un pont disulfure et font partie de la superfamille des Ig. Elles ne possèdent pratiquement pas de queue cytoplasmique et ne démontrent aucune activité enzymatique intrinsèque.

Le TCR contient un deuxième sous-groupe d'unités responsables de la transduction du signal c'est-à-dire la deuxième fonction du TCR. Cette fonction est assurée par 4

chaînes invariantes agencées en 3 dimères : $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ et $\zeta\zeta$. Ces paires de chaînes invariantes sont aussi identifiées comme le complexe CD3 (excepté ζ qui est inclus dans le TCR). L'assemblage fonctionnel d'un TCR comprend une sous-unité de reconnaissance formée par les dimères $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ et une sous-unité de transduction qui inclut 2 dimères $\gamma\epsilon$ ou $\delta\epsilon$ et un dimère $\zeta\zeta$ (figure 2). Toutes ces molécules sont requises pour l'assemblage, l'expression et la signalisation du TCR/CD3 (Ashwell, J. D. et Klausner, R. D., 1990). À l'aide de protéines chimériques comprenant la portion intracytoplasmique des chaînes ϵ ou ζ fusionnées à la portion extracellulaire et transmembranaire de récepteurs de surface comme CD4, CD8 ou CD16, il a été confirmé que le couplage entre le TCR et la transduction du signal intracellulaire est assuré par les sous-unités du CD3 et la chaîne ζ du TCR (Letourneur, F. et Klausner, R. D., 1992). Spécifiquement, la stimulation de ces protéines chimériques avec l'anticorps approprié parvient à induire la phosphorylation sur tyrosine des protéines cytosoliques et à déclencher la cascade d'événements biochimiques caractéristiques de l'activation de la cellule T.

Les sous-unités de transduction contiennent des séquences conservées nommées ITAMs (immuno-tyrosine based activation motifs) trouvées dans la région cytoplasmique des sous-unités $\gamma\delta\epsilon$ -1 ITAM par chaîne- et ζ -3 ITAMs par chaîne- pour un total de 10 ITAMs par complexe TCR/CD3. Les ITAMs sont aussi retrouvés dans d'autres récepteurs exprimés sur des cellules hématopoïétiques (sous-unité $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ du BCR, chaînes β et γ des Fc ϵ R des mastocytes et basophiles). La séquence consensus pour les ITAMs est $YxxI/L(x)_{6-8}YxxI/L$. La fonction principale des ITAMs est de permettre l'interaction des sous-unités de transduction avec des molécules de signalisation intracellulaire. Suite à la ligation du TCR, il y a induction de la phosphorylation des ITAMs dans les sous-unités $\gamma\delta\epsilon$ et ζ . La phosphorylation des deux tyrosines comprises dans ce motif génère des sites de liaison spécifiquement reconnus par les domaines SH2 des PTK de la famille Syk. Les domaines d'interaction SH2 sont des modules de 100 acides aminés qui reconnaissent des tyrosines phosphorylées contenues dans des séquences d'acide aminés spécifiques (Songyang, Z., Shoelson, S. E. *et al.*, 1993). Une interférence au niveau de cette étape critique annule complètement les événements de signalisation en aval de la ligation du TCR/CD3. Le grand nombre de copies d'ITAMs ajoute potentiellement un niveau

additionnel de contrôle de la qualité ou de l'intensité du signal généré par la ligation du TCR. Ainsi, le nombre d'ITAMs phosphorylés pourrait être considéré comme un baromètre qui mesure la qualité de l'interaction entre le TCR et le peptide présenté par le CMH. Un ligand fort induirait la phosphorylation complète des 10 ITAMs alors qu'un ligand faible induirait une phosphorylation partielle des ITAMs. Le degré de phosphorylation des ITAMs aurait donc un impact sur la quantité de molécules de la famille Syk qui interagissent avec les sous-unités CD3 et ζ du TCR suite à l'activation du lymphocyte.

1.1.2 Interaction entre le TCR et le CMH

L'activation de la cellule T représente un processus complexe qui à la base dépend du rapprochement entre 2 cellules afin de créer une zone de contact entre le lymphocyte T et la CPA. Cette zone de contact permet essentiellement la ligation du TCR avec un peptide spécifique présenté par une molécule du CMH appropriée à la surface du CPA. Cependant, l'activation via le TCR doit générer un signal suffisamment puissant pour dépasser un seuil d'activation. Différents modèles d'activation ont vu le jour afin d'expliquer les mécanismes physiques à la base de l'activation du lymphocyte T (Dustin, M. L. et Cooper, J. A., 2000). Rapidement, il s'agit du modèle de signalisation en parallèle ou d'agrégation (« capping ») et du modèle d'activation en série. Le premier modèle stipule qu'un nombre pré déterminé de complexes TCR/CMH doivent être engagés pour générer un signal suffisamment puissant. Dans ce modèle, le signal est généré suite à l'association continue entre les molécules du CMH et les TCRs de même que d'autres molécules de co-stimulation pendant une période de temps relativement longue. Le deuxième modèle favorise plutôt la ligation de courte durée d'une molécule TCR avec un complexe peptide/CMH pour générer le signal. Dans ce processus, un TCR entre en contact avec le complexe peptide/CMH approprié, génère un signal et est ensuite internalisé, possiblement pour poursuivre l'activation cellulaire. De cette façon, un grand nombre de TCRs peuvent interagir avec un nombre restreint de complexes peptides/CMH et produire un signal amplifié et continu. En effet, dans les conditions appropriées, le contact d'un seul complexe peptide/CMH devrait pouvoir induire l'internalisation de près de 200 TCRs (Valitutti, S., Muller, S. *et al.*, 1995; Itoh, Y., Hemmer, B. *et al.*, 1999). D'autres facteurs peuvent aussi influencer la formation de complexes entre le TCR et le peptide

antigénique présenté par le CMH (Valitutti, S., Muller, S. *et al.*, 1995; Shaw, A. S. et Dustin, M. L., 1997). En premier lieu, il a été observé que le TCR démontre une faible affinité pour son ligand. À l'aide de TCR solubles et de complexes peptides/CMH, l'affinité de l'interaction entre le TCR et le CMH a été déterminée (Corr, M., Slanetz, A. E. *et al.*, 1994). Les résultats de ces études indiquent que l'affinité du TCR pour son ligand est relativement faible et avoisine les 10^{-4} et 10^{-7} M, par comparaison la majorité des immunoglobulines possèdent une constante de dissociation inférieure à 10^{-9} M. Cependant les immunoglobulines doivent se maintenir complexées à leur cible dans un environnement soluble alors que le TCR fonctionne dans une zone de contact entre 2 cellules. Donc le site de contact doit démontrer des caractéristiques qui favorisent les interactions de faible affinité. Un deuxième problème potentiel lors de la formation du complexe TCR/peptide/CMH correspond à la faible quantité d'antigènes spécifiques présentés à la surface de la CPA. En accord avec sa fonction, la CPA présente en tout temps une grande quantité de peptides d'origine intracellulaire et extracellulaire à sa surface. Donc, le nombre de CMH qui présentent un peptide activateur spécifique pour un TCR particulier est vraisemblablement limité. De plus, ces complexes peptide/CMH activateurs sont probablement distribués aléatoirement sur la surface de la CPA, ainsi seulement une petite fraction de ligands spécifiques sera incluse dans l'interface entre la cellule T et le CPA. Des mécanismes qui facilitent la détection de concentrations faibles d'antigène par le TCR doivent donc être mis en fonction lorsque les 2 cellules entrent en contact. Finalement, le TCR est court par rapport à d'autres molécules de surface exprimées sur le lymphocyte T. En fait, des études de la structure tridimensionnelle du complexe TCR/peptide/CMH révèle que la distance enjambée par le complexe n'est que de 15 nm alors que des molécules de surface abondantes comme CD45 ou CD43 mesurent jusqu'à 45 nm (déterminée par microscopie électronique). De plus, ces molécules occupent environ 30% de la surface totale du lymphocyte. L'interface entre les 2 cellules doit donc fournir une zone de contact d'environ 15 nm qui favorise l'interaction entre le TCR et le peptide/CMH, parvenir à exclure les plus grosses molécules de la zone, optimiser l'interaction entre la faible quantité de ligand spécifique disponible et le TCR et surmonter la faible affinité du TCR pour son ligand.

1.1.3 Synapse Immunologique

L'un des concepts d'activation actuels implique la réorganisation macromoléculaire de plusieurs molécules, incluant le TCR et d'autres molécules accessoires, à la surface du lymphocyte T. Ce concept se base sur des observations qui indiquent que les molécules de surface au site de contact entre un lymphocyte T CD4+ et une CPA sont redistribuées dans des patrons distincts de façon à former une interface spécialisée nommée la Synapse Immunologique aussi désignée sous l'appellation de SMAC pour « supramolecular activation cluster ». La formation de cette structure dépend en grande partie de la réorganisation du cytosquelette (Anton van der Merwe, P., Davis, S. J. *et al.*, 2000; Dustin, M. L. et Cooper, J. A., 2000). Il est aussi important de noter que des réorganisations semblables sont observées chez les cellules T CD8+ de même que les cellules NK.

La synapse est une structure dynamique qui passe par plusieurs étapes lors de sa formation. On parlera d'une synapse immature ou d'une structure mature selon la localisation physique des différents constituants de la synapse. Chronologiquement, les observations actuelles entre une cellule T CD4+ et des cellules B comme CPA indiquent qu'initialement, les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM1 se trouvent au centre de la zone de contact, le couple TCR/peptide/CMH est situé en périphérie du centre, les molécules de co-stimulation comme CD2 et CD28 sont redistribuées plus ou moins aléatoirement et les grosses molécules inhibitrices comme CD43 et CD45 sont exclues de la zone de contact. Après quelques minutes on peut observer la formation de la synapse dite mature. L'architecture de l'interface mature comprend une région centrale désignée c-SMAC pour « central supramolecular activation cluster » entourée d'un anneau d'adhésion désigné le p-SMAC pour « peripheral supramolecular cluster ». Le c-SMAC contient des molécules petites comme le TCR, CD2 et CD28. Les complexes formés par ces molécules avec leurs ligands respectifs, le peptide/CMH, CD58 et la paire CD80/CD86 pour le TCR, CD2 et CD28 respectivement enjambent une distance d'environ 15 nm. Par conséquent, cette région de la synapse correspond à la zone membranaire qui permet le contact le plus intime entre l'APC et la cellule T. De cette façon, la grande quantité d'interactions locales stabilise l'interaction entre le TCR et le peptide/CMH. La présence des molécules de CD2 dans l'interface pourrait aussi permettre une fonction de balayage laquelle diminue substantiellement la quantité de ligands nécessaires à la surface de la CPA

pour interagir avec le TCR. La présence de CD28 quant à elle favoriserait plutôt l'amplification du signal faible généré par le TCR lorsqu'il est dans le c-SMAC. Le p-SMAC forme un anneau concentrique autour de la région centrale de la synapse et contient surtout des molécules d'adhésion comme LFA-1 et ICAM-1. Les molécules inhibitrices comme CD43 et CD45 demeurent exclues de la zone de contact. La formation d'une synapse immunologique mature peut prendre de 10-60 min. Cependant, des observations faites à l'aide d'anticorps dirigés contre les formes activées des PTKs p56Lck et ZAP-70 indiquent que la signalisation via le TCR atteint son maximum bien avant la formation d'une synapse (Lee, K. H., Holdorf, A. D. *et al.*, 2002). Ainsi, la signalisation via le TCR ne nécessite pas la formation d'une synapse. Ceci suggère que la formation de la synapse contribue plutôt à l'optimisation ou l'augmentation de la durée du signal induit par le TCR. La synapse pourrait aussi être perçue comme une structure qui marque la fin de l'initiation du signal. Une étude plus récente menée par le même groupe indique que la synapse serait plutôt nécessaire au maintien d'un signal constant et d'intensité contrôlée (Lee, K. H., Dinner, A. R. *et al.*, 2003). Dans cette étude, les résultats indiquent que l'absence perçue des formes activées des PTKs p56Lck et ZAP-70 provient plutôt de l'internalisation et de la dégradation perpétuelle des complexes TCR activés dans la région centrale de la synapse.

D'autres fonctions non exclusives sont actuellement proposées pour la synapse. La synapse pourrait servir à optimiser les interactions entre les molécules présentes à l'interface de la CPA et la cellule T. Par exemple, la liaison entre les molécules CD28 et B7 (CD80, CD86) est habituellement faible mais devient plus forte dans l'environnement de la synapse (Bromley, S. K., Iaboni, A. *et al.*, 2001). De plus, la formation d'une zone de contact intime qui contient plusieurs couples de molécules activatrices pourrait aussi contribuer davantage à l'activation de la CPA. En effet, lors du contact entre la cellule B et la cellule T, les molécules CD40 et leurs ligands CD40L entrent aussi en jeu afin d'activer la cellule B (van Kooten, C. et Banachereau, J., 1997). La formation de la synapse pourrait donc contribuer au maintien de l'interaction CD40/CD40L pendant un intervalle nécessaire afin d'optimiser l'activation du lymphocyte B. Dans plusieurs cas, la synapse pourrait définir un mécanisme de sécrétion spécialisé pour les cellules T. Par exemple, on observe une sécrétion polarisée des cytokines entre les T CD4⁺ et les cellules B engagées

ensembles (Kupfer, H., Monks, C. R. *et al.*, 1994). Dans le cas des T CD8+, les granules sont ciblés vers le centre de la synapse (Stinchcombe, J. C., Bossi, G. *et al.*, 2001). En effet, la région du p-SMAC correspond à l'endroit où les microtubules du MTOC entrent en contact avec la membrane. Le MTOC est important parce que la réorganisation des microtubules est critique pour le transport des granules lytiques. Finalement, via le recrutement de molécules inhibitrices telle la protéine CTLA-4, la synapse pourrait jouer un rôle dans la terminaison de la signalisation induite par la ligation du TCR (Egen, J. G. et Allison, J. P., 2002). Peu importe le ou les rôles exacts joués par la synapse, sa formation induit un réarrangement macromoléculaire des récepteurs de surface ainsi que des molécules intracellulaires impliquées dans la signalisation cellulaire. Bien que l'interaction entre le cytosquelette et la synapse demeure encore mal compris, la réorganisation du cytosquelette joue assurément un rôle crucial dans les différentes étapes qui mènent à l'agrégation d'îlots lipidiques, au recrutement de molécules impliquées dans la signalisation et ultimement à la formation de la synapse (Dustin, M. L. et Cooper, J. A., 2000; Miletic, A. V., Swat, M. *et al.*, 2003).

Le concept de la synapse immunologique intègre un autre concept d'organisation structurale de la cellule T, les îlots lipidiques.

1.1.4 Îlots lipidiques

Dans plusieurs types cellulaires, au niveau de la membrane lipidique, on observe des domaines riches en sphingolipides (classe de lipides spécifiques) et en cholestérol. Grâce aux propriétés biochimiques de leurs constituants, ces domaines forment des radeaux ou des îlots ordonnés de petite taille (grosueur moyenne en deçà de 70 nm) qui se déplacent dans la membrane (Janes, P. W., Ley, S. C. *et al.*, 2000). Ces îlots ont hérité de différentes appellations selon leurs propriétés biochimiques soit : les DIMs (Detergent Insoluble Membranes), les DRMs (Detergent Resistant Membranes), les DIGs (Detergent Insoluble Glycolipid-rich membranes), les TIFFs (Triton Insoluble Floating Fraction) et les GEMs (Glycosphingolipid Enriched Membranes).

Certaines observations suggèrent que la formation de la synapse immunologique et l'existence des îlots lipidiques soient inter-reliées dans l'activation de la cellule T. Premièrement, les TCRs de même que certaines molécules impliquées dans la cascade

de signalisation initiée par la ligation du TCR sont redistribués aux îlots dans des cellules T activées (Montixi, C., Langlet, C. *et al.*, 1998; Yang, H. et Reinherz, E. L., 2001; Giurisato, E., McIntosh, D. P. *et al.*, 2003; Pizzo, P. et Viola, A., 2003). Ensuite, plusieurs molécules importantes dans la signalisation cellulaire possèdent des modifications post-traductionnelles nécessaires à la localisation dans les îlots lipidiques (PKC θ , Itk, Lck, Fyn, LAT) (Zhang, W., Tribble, R. P. *et al.*, 1998; Bunnell, S. C., Diehn, M. *et al.*, 2000; Bi, K., Tanaka, Y. *et al.*, 2001; Czar, M. J., Debnath, J. *et al.*, 2001; Drevot, P., Langlet, C. *et al.*, 2002; Isakov, N. et Altman, A., 2002). En dernier lieu, à l'instar de la formation de la synapse immunologique, on observe une réorganisation des îlots lipidiques suite à l'activation du lymphocyte T. Bien que la relation entre les îlots lipidiques et la formation de la synapse immunologique ne soit pas tout à fait claire, il est possible que les îlots jouent un rôle critique dans l'élaboration de la synapse. En effet, le rôle des îlots dans l'activation cellulaire est mis en évidence par des études où l'intégrité structurale des îlots est compromise (Kabouridis, P. S., Janzen, J. *et al.*, 2000). De plus certaines observations indiquent que l'agrégation des îlots permet le rapprochement des molécules de signalisation afin de former un environnement plus riche en molécules de signalisation et ainsi favoriser l'initiation du signal (Janes, P. W., Ley, S. C. *et al.*, 2000; Burack, W. R., Lee, K. H. *et al.*, 2002).

1.2 Protéines tyrosine kinase (PTK)

Les protéines tyrosines kinases forment un groupe d'enzymes spécialisées qui catalysent le chargement d'un groupement phosphate sur des résidus tyrosine. Cette modification est fréquente dans les cascades d'activation cellulaire et permet des changements de conformations nécessaires pour libérer des sites catalytiques ou exposer des sections peptidiques masquées souvent reconnues par d'autres protéines. Il y a ensuite formation de complexes multimériques et amplification du signal. Dans certains cas, les PTKs peuvent aussi inhiber l'activation cellulaire, par exemple la kinase Csk qui régule négativement l'activité des PTKs de la famille Src. Plusieurs familles de PTKs existent dans les lymphocytes T et leurs implications dans les fonctions effectrices de la cellule sont variées. Parmi les plus importantes, nommons les PTKs de la famille *Src*, de la famille *Syk* et de la famille *Tec* (figure 1).

1.2.1 Famille *Src* (p56Lck et p59Fyn)

La famille *Src* contient 9 membres (*Blk*, *Fgr*, *Fyn*, *Hck*, *Src*, *Lck*, *Lyn*, *Yes* et *Yrk*) desquels seulement 4 sont exprimés dans les lymphocytes T (*Fyn*, *Lck*, *Src* et *Yes*). Les membres de cette famille partagent plusieurs caractéristiques, ils contiennent des domaines SH3 et SH2 conservés de même qu'un domaine catalytique nommé SH1 qui possède jusqu'à 80% d'homologie entre les différentes kinases de la famille. Outre ces domaines, les membres de la famille *Src* se caractérisent par la présence d'une région N-terminale unique qui possède un site de myristoylation. Ce site de myristoylation est essentiel pour l'association à la membrane et la bonne localisation de l'enzyme (Resh, M. D., 1994; Yasuda, K., Kosugi, A. *et al.*, 2000). La localisation à la membrane dépend aussi de la palmitoylation de la molécule (Kosugi, A., Hayashi, F. *et al.*, 2001). Selon le cas, la région N-terminale des kinases *Src* contient aussi des sites qui permettent l'association avec d'autres récepteurs comme les co-récepteurs CD4 et CD8 pour p56Lck (Rudd, C. E., Barber, E. K. *et al.*, 1991) ou des sites de phosphorylation sur sérine par la PKC pour p60Src (Gould, K. L., Woodgett, J. R. *et al.*, 1985) et les kinases ERK1/2 pour p56Lck (Winkler, D. G., Park, I. *et al.*, 1993). À l'extrémité C-terminale ces kinases possèdent une tyrosine qui, une fois phosphorylée, régule négativement leur activité. Dans le cas de p56Lck, la région C-terminale de la protéine se termine par une tyrosine (Y505) laquelle peut être phosphorylée sous l'action de la kinase cytoplasmique Csk. Selon le modèle actuel de régulation de l'activité enzymatique de p56Lck, la phosphorylation du résidu Y505 est à l'origine d'une interaction intramoléculaire avec le domaine SH2 de Lck. Ceci cause un repliement de la molécule qui masque son domaine catalytique et inactive l'enzyme. Le domaine SH3 de Lck pourrait aussi être impliqué dans la régulation de l'enzyme. Les observations faites à partir de la kinase Hck, un autre membre de la famille *Src*, suggèrent que l'interaction entre le domaine SH3 de la molécule et une région à proximité du site catalytique sert à stabiliser l'enzyme dans une configuration inactive (Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M. *et al.*, 1997). Les 2 kinases de la famille *Src* qui revêtent une importance capitale dans l'activation des lymphocytes T sont les kinases p56Lck et p59Fyn (Straus, D. B. et Weiss, A., 1992; Wong, J., Straus, D. *et al.*, 1998). Ces enzymes sont activées suite à une stimulation TCR/CD3 (Danielian, S., Alcover, A. *et al.*, 1992). Une activation par CD2 implique aussi l'activation des

kinases p56Lck (Danielian, S., Fagard, R. et al., 1991) et surtout p59Fyn (Gassmann, M., Amrein, K. E. et al., 1994; Fukai, I., Hussey, R. E. et al., 2000). La ligation du récepteur SLAM induit aussi l'activation de la PTK p59Fyn. Finalement, l'activation de la cellule T par CD28 nécessite la présence de p56Lck pour permettre l'activation d'une seconde famille de PTKs, les kinases Tec (Gibson, S., August, A. et al., 1996; Gibson, S., August, A. et al., 1996).

La régulation positive de l'activité de la kinase p56Lck implique surtout la phosphatase CD45. Ainsi, lors de l'activation cellulaire, la phosphatase CD45 contribue à l'activation de p56Lck en catalysant la déphosphorylation du résidu Y505. D'autres études suggèrent aussi que CD45 déphosphoryle la protéine adaptatrice membranaire Cbp/PAG, libérant Csk et PEP dans le cytoplasme donc à l'écart de la p56Lck (Davidson, D., Bakinowski, M. *et al.*, 2003). Finalement, puisque l'association de Lck à la queue cytoplasmique des molécules de surface CD4 et CD8 contribue à la localisation appropriée de l'enzyme, la co-ligation du TCR et des molécules CD4 ou CD8 avec la portion non polymorphique du CMH recrute Lck au complexe peptide/CMH/TCR-CD3. L'activation de Lck s'accompagne aussi de plusieurs modifications au niveau de résidus spécifiques sérine et thréonine. Il a été démontré que les MAPKs induisent la phosphorylation de la sérine 59 de la p56Lck (Winkler, D. G., Park, I. *et al.*, 1993). Cette phosphorylation correspond à une variation du poids moléculaire apparent de p56Lck, d'une p56 à une p60, observable sur SDS-PAGE (Soula, M., Rothhut, B. *et al.*, 1993; Watts, J. D., Sanghera, J. S. *et al.*, 1993). Cette modification sur sérine empêche aussi l'association de p56Lck avec la PTPase SHP-1 et suggère que la phosphorylation de p56Lck par les MAPKs induit un changement de conformation qui nuit à l'interaction entre la PTK et la PTPase (Germain, R. N. et Stefanova, I., 1999; Stefanova, I., Hemmer, B. *et al.*, 2003).

Bien que l'absence de la PTK p56Lck n'affecte pas particulièrement ni le développement ni la fonction des cellules B, p56Lck joue tout de même un rôle crucial dans le développement des thymocytes. En effet, il a été démontré que des souris déficientes pour l'expression de la p56Lck possèdent un thymus atrophié. Ceci corrèle avec une diminution drastique de la quantité de thymocytes double positifs CD4⁺CD8⁺. De plus, aucune cellule T CD4⁺ ou CD8⁺ n'est détectable dans ces souris et très peu de cellules T sont trouvées en périphérie. Cependant, l'absence de

p56Lck n'affecte pas la capacité de prolifération des cellules T en réponse à une stimulation via le TCR, bien que celle-ci soit diminuée (Molina, T. J., Kishihara, K. *et al.*, 1992). Ceci suggère que la fonction de p56Lck est essentielle au développement des cellules T mais que sa contribution dans la signalisation est compensée, au moins en partie, par les autres PTKs de la famille Src exprimées dans les cellules T soit p59Fyn et p62Yes. En l'occurrence, l'absence de p59Fyn chez des souris n'affecte pas le développement thymique des cellules T mais correspond à une diminution de la capacité d'activation des cellules suite à une stimulation par des antigènes ou des agents pharmacologiques (Appleby, M. W., Gross, J. A. *et al.*, 1992; Stein, P. L., Lee, H. M. *et al.*, 1992). Il est toutefois important de noter que l'activation des cellules T humaines matures qui n'expriment pas p56Lck (J.CaM1.6) est pratiquement complètement inhibée (Straus, D. B. et Weiss, A., 1992).

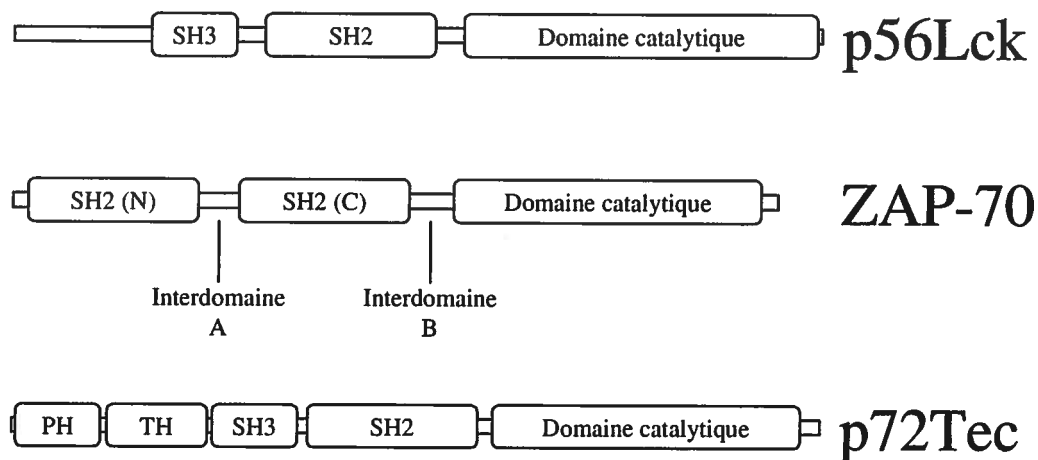


Figure 1 *Kinases impliquées dans l'activation de la cellule T. Les kinases p56Lck, ZAP-70 et p72Tec sont représentées schématiquement. SH2 et SH3: Src Homology domains 2 and 3, PH: Pleckstrin Homology domain, TH: Tec Homology domain (aussi désigné comme un domaine riche en prolines).*

1.2.2 Famille Syk

Les protéines de la famille Syk représentent une deuxième famille de tyrosine kinases importantes dans l'initiation de la signalisation via le TCR. Cette famille comprend 2 membres, les kinases Syk et ZAP-70. La kinase Syk est exprimée dans les lymphocytes T et B, les macrophages, les monocytes, les mastocytes et les plaquettes. L'expression de ZAP-70, quant à elle, est restreinte aux cellules T et NK. De plus il est important de noter que ZAP-70 est fortement exprimée dans les lymphocytes T matures alors que les niveaux d'expression de la kinase Syk demeurent faibles dans ce type cellulaire. Syk et ZAP-70 partagent jusqu'à 50% d'identité de séquence et par conséquent, une organisation structurale semblable. Syk possède aussi une séquence de 23 acides aminés absente de ZAP-70. Une deuxième forme relativement rare de Syk, nommée SykB, représente le produit de l'épissage alternatif de Syk et ne possède pas cette séquence de 23 aa. La structure des enzymes comprend un domaine catalytique C-terminal suivi d'une séquence d'acides aminés désignée l'interdomaine B et finalement, 2 domaines SH2 disposés en tandem dans la région N-terminale de la molécule. Une autre séquence, l'interdomaine A est située entre les 2 domaines SH2 et servirait à stabiliser l'interaction des 2 domaines SH2 de l'enzyme avec leurs cibles. Les domaines SH2 coopèrent pour permettre aux kinases Syk et ZAP-70 de lier leur cible principale, les ITAMs phosphorylés (Hatada, M. H., Lu, X. *et al.*, 1995; Isakov, N., Wange, R. L. *et al.*, 1995; Johnson, S. A., Pleiman, C. M. *et al.*, 1995; Kimura, T., Sakamoto, H. *et al.*, 1996). L'importance de l'interdomaine B se reflète surtout au niveau de plusieurs tyrosines qui lorsque phosphorylées, forment des sites de reconnaissance pour des protéines impliquées dans la signalisation telles la PLC γ -1, Vav et Cbl (Deckert, M., Tartare-Deckert, S. *et al.*, 1996; Law, C. L., Chandran, K. A. *et al.*, 1996; Lupher, M. L., Jr., Reedquist, K. A. *et al.*, 1996; Wu, J., Zhao, Q. *et al.*, 1997). De plus, la phosphorylation de certaines tyrosines régule l'activation de ZAP-70 (Kong, G., Dalton, M. *et al.*, 1996; Chu, D. H., Morita, C. T. *et al.*, 1998). Ainsi, ZAP-70 est d'abord phosphorylée pour ensuite être activée et participer à la phosphorylation de différents substrats impliqués dans la transduction des signaux tels LAT (Zhang, W., Sloan-Lancaster, J. *et al.*, 1998) et SLP-76 (Wardenburg, J. B., Fu, C. *et al.*, 1996).

Chez le lymphocyte T, l'activation de ZAP-70 dépend de l'activité des kinases de la famille Src. Ainsi, suite à la ligation du TCR, les kinases Src phosphorylent les

ITAMs. Ceci permet l'association de ZAP-70 aux ITAMs. ZAP-70 est ensuite phosphorylée sur certains résidus de régulation positive et activée par la kinase Lck. ZAP-70 complète alors son activation par une ronde d'auto-phosphorylation et peut alors participer à la signalisation via le TCR (Hatada, M. H., Lu, X. *et al.*, 1995). Parallèlement, il a été démontré que l'activité de Syk dépend beaucoup moins de l'action des kinases de la famille Src. Une série d'études réalisées dans des cellules COS illustre que l'expression d'une chimère CD16/Syk parvient à rétablir la mobilisation de calcium dans ces cellules alors qu'une chimère CD16/ZAP-70 requiert la co-expression de kinases de la famille Src pour observer le même phénomène (Kolanus, W., Romeo, C. *et al.*, 1993). De plus, des études de transfection dans des cellules T Jurkat qui n'expriment pas Lck démontrent que l'expression de Syk parvient à rétablir, au moins partiellement, la signalisation cellulaire (Chu, D. H., Spits, H. *et al.*, 1996). L'indépendance de Syk envers les kinases Src découle probablement de sa capacité d'autophosphorylation qui permettrait son autoactivation. Il a aussi été observé que l'expression de Syk suffit pour induire la phosphorylation des ITAMs (Zoller, K. E., MacNeil, I. A. *et al.*, 1997). De plus, il est à noter que l'interaction entre des phospho-peptides dérivés des ITAMs et la kinase Syk augmente l'activité de celle-ci (Kimura, T., Sakamoto, H. *et al.*, 1996). Néanmoins, l'activité de Syk en absence de Lck ne parvient pas à rétablir tous les événements de signalisation induits suite à la ligation du TCR. En effet, bien que l'expression d'une version activée de Syk permet la phosphorylation de SLP-76, un substrat reconnu de Syk/ZAP-70 et l'augmentation d'expression à la surface de CD69, un marqueur d'activation lymphocytaire, la production d'IL-2 n'est pas restaurée (Wong, J., Straus, D. *et al.*, 1998). Ainsi, contrairement à ZAP-70, la kinase Syk devrait être en mesure d'agir dans des situations précises où l'activation des kinases de la famille Src est incomplète voire absente.

Les enzymes de la famille Syk sont aussi importantes dans la maturation des lymphocytes dans le système immunitaire. Ainsi, chez la souris, il a été démontré que l'absence de Syk se traduit par des déficiences au niveau de la maturation des cellules B et un blocage au niveau de l'activation des cellules B matures. Chez les lymphocytes T, l'absence de Syk ne semble pas affecter leur maturation, leur capacité de signalisation ou la quantité de cellules produites. Au contraire, dans le modèle murin l'absence de ZAP-70 bloque la maturation des lymphocytes T de sorte que la

souris affectée ne développe aucun lymphocyte T CD4⁺ mature (Kadlecek, T. A., van Oers, N. S. *et al.*, 1998). Chez l'humain, une maladie de type SCID « Severe Combined Immuno-Deficiency » est causée par l'absence de la protéine ZAP-70. Chez ces patients, on observe un nombre normal de cellules T CD4⁺ mais les cellules T dans la périphérie ne peuvent induire de phosphorylation sur tyrosine, de mobilisation de calcium ainsi qu'une sécrétion d'IL-2 suite à une stimulation via le TCR (Elder, M. E., Lin, D. *et al.*, 1994). Aussi, des cellules T Jurkat déficientes pour l'expression de ZAP-70 se comportent d'une manière semblable aux cellules T recueillies de patients ZAP-70^{-/-} (Williams, B. L., Schreiber, K. L. *et al.*, 1998).

1.2.3 Famille Tec

Dans les cellules hématopoïétiques, les kinases *Tec* pour « tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma » sont surtout impliquées dans la signalisation via le TCR, le BCR et les récepteurs Fcε. Jusqu'à ce jour, la famille contient 8 membres dont 5 sont exprimées chez les mammifères : Bmx/Etk, Btk/Atk, Itk/Tsk/Emt, Tec et Rlk/Txk. Le trio de kinases Itk, Tec et Rlk est exprimé spécifiquement dans les thymocytes et les cellules T matures (Yang, W. C., Ghiotto, M. *et al.*, 2000). La structure des kinases *Tec* comprend, en amino-terminal, un domaine PH pour le ciblage de la protéine à la membrane, suivi d'un domaine nommé TH pour Tec Homology lequel contient, dans l'ordre, un domaine de liaison au Zn²⁺ et 1 ou 2 régions riches en prolines. Viennent ensuite un domaine SH3, un domaine SH2 et finalement, un domaine kinase. Contrairement aux PTKs de la famille *Src*, il n'y a pas de tyrosine carboxy-terminale pour assurer la régulation de l'activité de l'enzyme. La régulation de ces enzymes s'effectue plutôt par des interactions intermoléculaires et dans certains cas intramoléculaires qui impliquent leurs domaines SH3 et leurs régions riches en prolines (Miller, A. T. et Berg, L. J., 2002). Le modèle actuel d'activation dans les cellules T propose que les kinases *Tec* sont recrutées à la membrane via leur domaine PH suite à l'action de la PI3K laquelle augmente la concentration locale de PIP3 (Yang, W. C., Ching, K. A. *et al.*, 2001). Par la suite, les PTKs de la famille *Src* peuvent phosphoryler et activer les kinases *Tec* (Heyeck, S. D., Wilcox, H. M. *et al.*, 1997; Miller, A. T. et Berg, L. J., 2002; Lucas, J. A., Miller, A. T. *et al.*, 2003). Une ronde d'autophosphorylation complète enfin l'activation des *Tec* et celles-ci sont en mesure de phosphoryler leurs propres substrats comme la PLCγ-1.

La phosphorylation et l'activation de la kinase Tec dans des cellules T est observée suite à la ligation du TCR/CD3 et du récepteur CD28 (Yang, W. C., Ghiotto, M. *et al.*, 1999; Yang, W. C., Ching, K. A. *et al.*, 2001). Il a été démontré que la kinase Tec est impliquée dans la régulation des promoteurs pour l'IL-2 et l'IL-4 de même que dans l'activation du facteur de transcription NF-AT suite à une stimulation CD28 de la cellule T (Yang, W. C. et Olive, D., 1999; Yang, W. C., Ghiotto, M. *et al.*, 2000).

Chez la souris, il a été démontré que l'absence de la kinase Tec n'affecte pas le développement des cellules B et T. Dans ce modèle, la prolifération des cellules B n'est pas altérée. Parallèlement, des cellules T Tec^{-/-} prolifèrent normalement suite à une stimulation via le TCR/CD3 ou via CD28 (Ellmeier, W., Jung, S. *et al.*, 2000). Il est possible que l'absence d'un phénotype chez la souris soit due à la présence d'autres membres de la famille Tec dans ces types cellulaires. En effet, l'absence de Tec n'affecte pas le développement des cellules B cependant, l'absence combinée de Tec et Btk (une kinase de la famille Tec exprimée dans les cellules B) donne lieu à une déficience marquée dans le développement et dans la fonction des cellules B (Ellmeier, W., Jung, S. *et al.*, 2000). D'une manière analogue, les kinases Itk et Rlk compensent probablement pour l'absence de Tec dans les cellules T. Inversement, la kinase Tec compense possiblement pour les kinases Itk et Rlk puisque l'on peut toujours observer une signalisation partielle associée au TCR dans des cellules T recueillies à partir de souris déficientes pour Itk et Rlk (Schaeffer, E. M., Debnath, J. *et al.*, 1999).

1.3 Activation du lymphocyte T : transduction des signaux

Les immunorécepteurs (Paul, W. E., Silverstein, A. M. *et al.*, 1998), TCR pour les cellules T, BCR pour les cellules B et plusieurs récepteurs Fc présents sur différentes cellules hématopoïétiques, sont des récepteurs multimériques composés d'une portion qui reconnaît un ligand et d'une portion chargée de transmettre le signal à l'intérieur de la cellule. Le signal transmis déclenche une cascade d'événements souvent désignée comme la transduction des signaux. La transmission du signal extérieur jusqu'à l'intérieur de la cellule entraîne une réponse qui inclut l'expression de gènes

et l'augmentation de la prolifération cellulaire c'est-à-dire l'activation cellulaire. La figure 2 schématise différentes étapes de l'activation cellulaire.

1.3.1 Activation des PTKs

Selon le modèle actuel d'activation du lymphocyte T (figure 2), la ligation du TCR induit l'activation des PTKs p56Lck et -à un moindre degré- p59Fyn, lesquelles phosphorylent les ITAMs trouvées dans la région cytoplasmique des sous-unités $\gamma\delta$ et ϵ du CD3 et ζ du TCR. Les ITAMs phosphorylés sont ensuite reconnus par les domaines SH2 de ZAP-70. Le recrutement de ZAP-70 à l'immunorécepteur (Straus, D. B. et Weiss, A., 1993; Hatada, M. H., Lu, X. *et al.*, 1995) permet son activation par une combinaison d'autophosphorylation et de phosphorylation par les PTKs de la famille *Src*.

1.3.2 Le complexe multimoléculaire formé autour de LAT

La protéine adaptatrice LAT représente l'un des substrats majeurs de ZAP-70 (Paz, P. E., Wang, S. *et al.*, 2001). Brièvement, LAT est une molécule adaptatrice transmembranaire qui contient une portion extracellulaire courte, un domaine transmembranaire et une portion intracellulaire longue qui contient 9 tyrosines, lesquelles sont toutes potentiellement reconnues par les domaines SH2 de protéines impliquées dans la signalisation (Zhang, W., Sloan-Lancaster, J. *et al.*, 1998; Lin, J. et Weiss, A., 2001). Des études de reconstitution dans des cellules Jurkat qui n'expriment pas LAT ont confirmé le rôle central joué par LAT dans l'initiation de la cascade d'activation du lymphocyte T (Zhang, W., Triple, R. P. *et al.*, 2000).

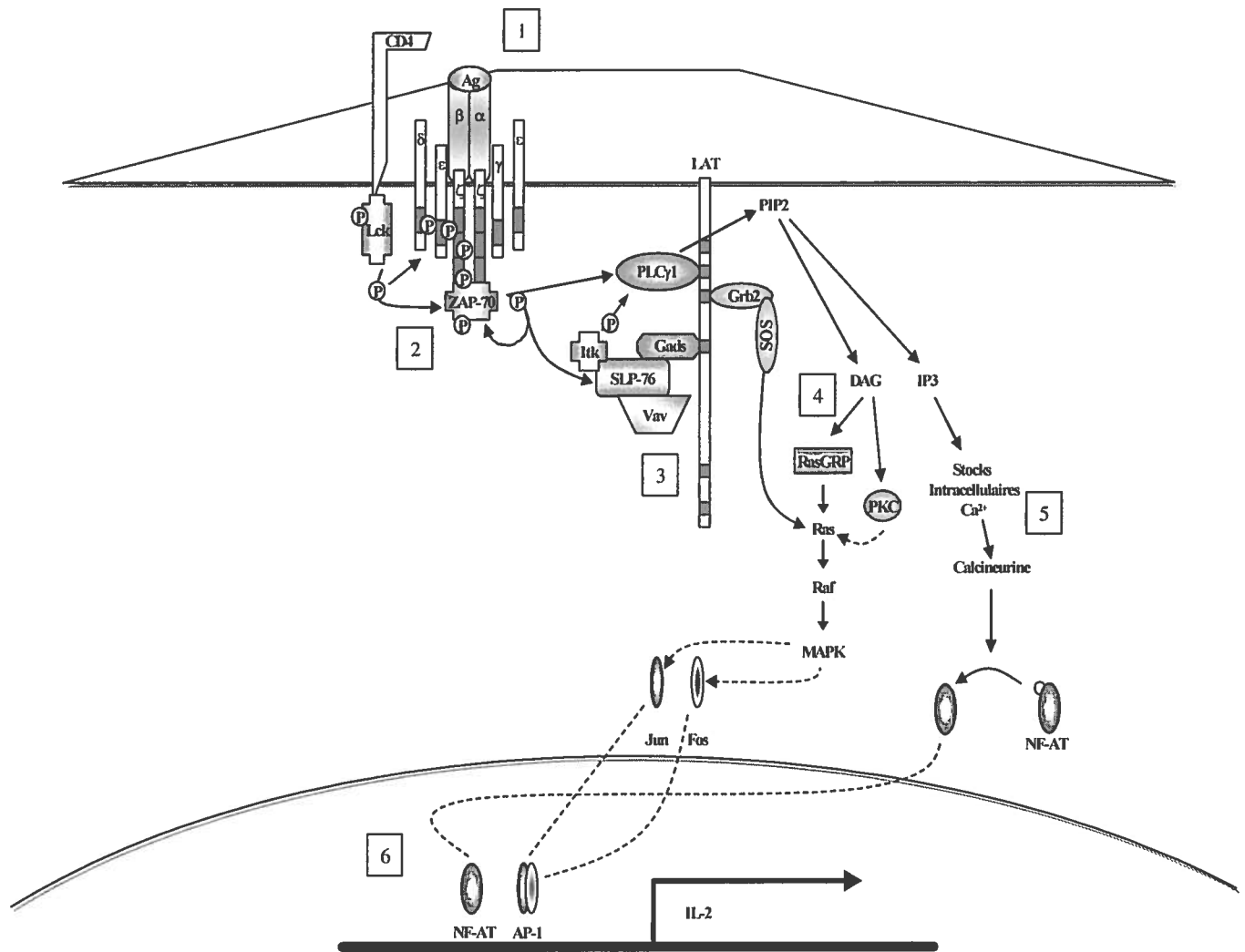


Figure 2 **Signalisation par le TCR.** (1) L'interaction entre le complexe peptide-CMH (classe II ci-haut) et le TCR induit une cascade de signalisation. (2) Les PTK de la famille Src, p56Lck et p59Fyn, sont recrutées et activées au TCR. Ceci induit la phosphorylation des ITAMs contenus dans les sous-unités du CD3 et la phosphorylation des PTKs de la famille Syk, ZAP-70 et Syk. (3) La protéine adaptatrice membranaire LAT, l'adaptateur cytosolique SLP-76 et d'autres enzymes effectrices telles PLC γ 1 et Itk représentent quelques substrats des PTKs Src et Syk activées. Après sa phosphorylation sur les résidus tyrosine, LAT coordonne la formation de complexes de signalisation qui, entre autres, permettent l'activation de la PLC γ 1 et de la voie de p21ras. (4) Ces événements déclenchent l'activation d'autres enzymes, (5) la mobilisation de calcium et éventuellement, (6) la régulation de gènes importants à la fonction du lymphocyte T (par exemple IL-2).

Spécifiquement, dans ces cellules, l'expression de LAT est requise pour observer la mobilisation de calcium, la phosphorylation complète de PLC γ -1, SLP-76 et Vav, l'activation des kinases Erk, l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-AT et l'expression d'IL-2 suite à la ligature du TCR (Finco, T. S., Kadlecsek, T. *et al.*, 1998; Zhang, W., Irvin, B. J. *et al.*, 1999; Jordan, M. S., Singer, A. L. *et al.*, 2003). Dans un modèle *in vivo*, l'absence de LAT se reflète dans un arrêt du développement des cellules T au stade double négatif. Il n'y a donc aucune cellule T mature détectée en périphérie, indiquant que LAT est aussi importante dans le développement des cellules T chez la souris (Zhang, W., Sommers, C. L. *et al.*, 1999). Une fois phosphorylée, LAT recrute à la membrane Gads, une protéine adaptatrice de la famille Grb2 (Liu, S. K., Fang, N. *et al.*, 1999; Liu, S. K., Berry, D. M. *et al.*, 2001), elle-même constitutivement associée à la protéine adaptatrice cytosolique SLP-76 via son domaine SH3 en C-terminal (Motto, D. G., Ross, S. E. *et al.*, 1996; Myung, P. S., Derimanov, G. S. *et al.*, 2001; Yoder, J., Pham, C. *et al.*, 2001). Le domaine SH3 représente un module d'interaction protéine : protéine qui reconnaît des séquences d'acides aminés riches en prolines. Par conséquent, SLP-76 se trouve recrutée à la membrane et forme un complexe avec LAT et Gads à proximité du complexe TCR/CD3 activé. Dans le complexe LAT-Gads-SLP-76, SLP-76 est phosphorylée par ZAP-70. SLP-76 phosphorylée recrute à son tour Itk, une PTK de la famille Tec, via une interaction SH2 (Lucas, J. A., Miller, A. T. *et al.*, 2003). LAT interagit aussi avec la PLC γ -1 laquelle est nécessaire à la mobilisation de calcium suite à l'activation cellulaire. PLC γ -1 lie l'une des tyrosines de LAT et est complètement activée à la suite de sa phosphorylation par ZAP-70 et Itk (Veri, M. C., DeBell, K. E. *et al.*, 2001).

1.3.3 Rôle de PLC γ -1 dans l'activation cellulaire

La PLC γ -1 hydrolyse son substrat, le phosphatidyl inositol (4,5)-biphosphate (PIP₂) situé à la membrane, en 2 « seconds messagers ». Il s'agit de l'inositol (1,4,5)-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG). L'IP₃ agit en se fixant à son récepteur à la surface du réticulum endoplasmique ce qui permet le relargage de Ca²⁺. L'augmentation de Ca²⁺ provoque ensuite l'ouverture des ionophores ce qui permet l'entrée du calcium extracellulaire. Cette mobilisation/entrée de calcium maintient un niveau constant de l'ion à l'intérieur de la cellule. Ces niveaux constants sont nécessaires à l'activation complète du facteur de transcription NF-AT (détaillé dans la

section NF-AT). Le DAG agit sur les PKCs en se liant au module d'activation DAG-dépendant de l'enzyme. L'activation de PKC contribue à celle des MAPKs via la régulation qu'elle exerce sur Raf-1 (Isakov, N. et Altman, A., 2002). Des études récentes suggèrent que DAG agit plus directement sur la voie Ras-MAPK en activant la molécule RasGRP, un activateur de Ras. Ces études soulignent aussi l'importance du calcium dans l'activation de cette molécule (Ebinu, J. O., Bottorff, D. A. *et al.*, 1998; Ebinu, J. O., Stang, S. L. *et al.*, 2000).

Comme illustré à la figure 2, d'autres interactions impliquant différents intermédiaires comme Vav, Sos, PI3K, etc., complètent le schéma d'activation lymphocytaire qui mène à l'activation de différents facteurs de transcription et la transcription des gènes nécessaires à la réponse cellulaire.

1.3.4 Calcium

Le calcium représente l'un des seconds messagers les plus versatiles dont dispose le corps pour réguler des fonctions corporelles et cellulaires aussi diverses que la contraction musculaire (le mouvement, battements cardiaques), les processus cognitifs (impulsions neurales), la prolifération cellulaire, la transcription des gènes et même l'apoptose. La particularité du Ca^{2+} comme messenger réside dans sa capacité à générer de l'information spécifique par la fréquence, l'intensité ou la durée du signal généré par la cellule (Berridge, M. J., Bootman, M. D. *et al.*, 1998; Crabtree, G. R., 1999). La fréquence de l'influx Ca^{2+} s'avère clef dans l'activation de certains facteurs de transcription (Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S. *et al.*, 1997). Dans cette optique, plusieurs observations indiquent que la génération d'un pic de Ca^{2+} intense mais transitoire fournit un signal qui favorise l'expulsion du facteur de transcription NF-AT à l'extérieur du noyau (Timmerman, L. A., Clipstone, N. A. *et al.*, 1996). L'expulsion du facteur de transcription NF-AT empêche celui-ci d'activer la transcription des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Ce type de mécanisme empêche vraisemblablement les transcriptions inutiles des gènes lorsque la cellule génère des pics de Ca^{2+} courts dans le but d'activer des fonctions comme l'adhésion ou la motilité cellulaire. Un signal d'intensité élevée soutenu pendant trop longtemps peut induire l'apoptose des cellules ainsi surchargées de l'ion Ca^{2+} . Brièvement l'augmentation de Ca^{2+} dans la mitochondrie initie une série d'évènements qui mènent à l'induction de

l'apoptose (Berridge, M. J., Bootman, M. D. *et al.*, 1998). De plus, le contexte cellulaire peut influencer la réponse induite par une mobilisation de calcium, ainsi d'autres stimuli qui activent des voies de transduction différentes peuvent être requis pour induire une réponse particulière dans une cellule. Par exemple, la mobilisation de Ca^{2+} dans le lymphocyte T déclenche l'activation de NF-AT, cependant NF-AT se lie difficilement à l'ADN en absence du facteur de transcription AP-1 lequel dépend de l'activation des MAPKs qui elles-mêmes dépendent de l'activité d'autres cascades de signalisation. Ce type de système fourni à la cellule un moyen additionnel de contrôle de la réponse cellulaire suite à l'augmentation de Ca^{2+} .

Dans les lymphocytes B et T, la signalisation qui implique le Ca^{2+} intervient lorsqu'un ligand se lie à un récepteur d'activation (TCR/CD3, CD2, CD28, BCR, etc.). On observe alors une augmentation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaires due au largage des réserves de Ca^{2+} contenus dans le réticulum endoplasmique (figure 3). Chez le lymphocyte T, ce largage s'effectue lorsqu'il y a production d'IP3 par la PLC γ -1 activée. L'IP3 se fixe ensuite à un récepteur IP3 à la surface du réticulum endoplasmique. Puisqu'une période de signalisation calcique prolongée est nécessaire à l'activation des lymphocytes et que les réserves intracellulaires sont limitées, la cellule a besoin d'une source extérieure de Ca^{2+} , il y a donc activation des canaux calciques. Les canaux spécialisés nommés CRAC – Ca^{2+} release activated channels (aussi SOCS -store operated Ca^{2+} channels) sont ouverts en réponse à la déplétion des stocks intracellulaires de Ca^{2+} , ceci permet l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire et le maintien du signal nécessaire à l'activation de certains facteurs de transcription qui régulent la transcription des gènes importants à la réponse immunitaire.

1.3.5 MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases

Il y a trois groupes de MAPKs dans les cellules de mammifères (figure 4B), ERK (extracellular signal-regulated protein kinase), JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) et p38. Ces kinases sont activées suite à leur phosphorylation sur des résidus sérine/thréonine et tyrosine contenus dans une séquence conservée : Ser/Thr-X-Tyr. Ces kinases font partie d'une cascade de signalisation caractéristique où les MAP kinases (MK) (ex. ERK1/2) sont phosphorylées par des MAP kinase kinases (MKK) (ex. MEK-1) lesquelles sont phosphorylées sur sérine ou thréonine par des MAP kinase kinase kinases (MKKK) (ex. Raf-1). En aval de l'activation des MKKK, ce

sont les petites protéines G qui jouent le rôle d'initiateur de la cascade : Ras pour ERK et Rho/Rac pour p38 et JNK. Ces petites protéines G sont activées par des mécanismes induits par des stimuli variés allant de la ligation d'un récepteur d'activation (i.e. TCR, cytokines, facteurs de croissance) à une situation de stress (i.e. stress oxydatif) en passant par des agents pharmacologiques (i.e. phorbol ester).

La superfamille Ras comprend les petites protéines G impliquées dans différents aspects des processus communs de la cellule comme la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et l'organisation du cytosquelette. La famille comprend la protéine Ras et ses isoformes (H-Ras, K-Ras et N-Ras); les protéines de la famille Rho, souvent impliquées dans la régulation du cytosquelette : Rho-A, -B, -C, -E et -G, Rac-1 et -2, CDC42 et TC-10; celles de la famille Ran, impliquées dans le transport nucléaire (Dasso, M., 2002) et la famille Rab, impliquée dans le trafic vésiculaire (Takai, Y., Sasaki, T. *et al.*, 2001). À leur tour, l'activité des protéines G Ras dépend de 2 facteurs : i) le positionnement à la membrane via la palmitoylation de la portion C-terminale pour permettre l'interaction avec ses effecteurs et ii) l'association de GTP pour obtenir une conformation dite « active » qui permet l'interaction de Ras-GTP avec ses effecteurs comme la kinase Raf-1 -le complexe GDP/Ras correspond à une conformation dite « inactive ». Le passage de la forme active à la forme inactive dépend de l'hydrolyse du groupe phosphate en position gamma (figure 4A). Cette activité de GTPase est inhérente à la protéine Ras mais de très faible intensité et nécessite l'aide de protéines qui optimisent l'activité GTPasique de Ras c'est-à-dire, les GTPase-activating proteins ou GAP (ex.: la p120RasGAP pour Ras). Inversement, l'échange d'un GDP lié pour une molécule GTP est assuré par des GEPs ou Guanine nucleotide Exchange Proteins (Sos et RasGRP en sont des exemples) aussi nommées GEF -Guanine nucleotide Exchange Factors-.

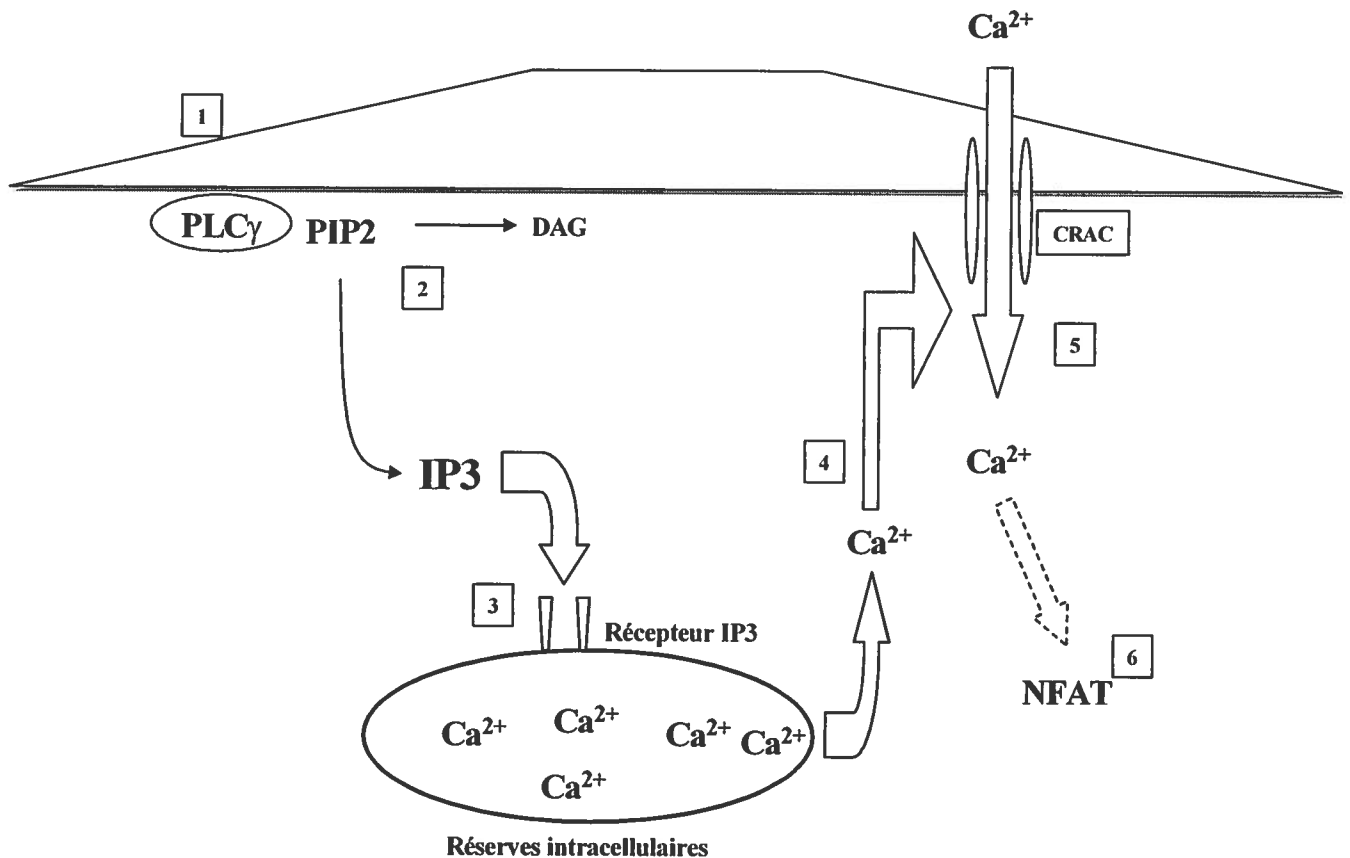


Figure 3 Mobilisation de calcium dans la cellule T. (1) L'activation du lymphocyte T induit le recrutement de PLC γ 1 à la membrane. PLC γ 1 est activée par phosphorylation multiple sur tyrosine par ZAP-70 et Itk. (2) PLC γ 1 hydrolyse ensuite son substrat, le phosphatidyl inositol (4,5)-biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et inositol (1,4,5)-triphosphate (IP3). (3) L'IP3 agit en se fixant à son récepteur sur le réticulum endoplasmique. La fixation de IP3 induit la libération du calcium contenu dans les réserves intracellulaires. (4) La déplétion des réserves intracellulaires de calcium cause l'ouverture des canaux calciques ou CRAC « Calcium Release Activated Channels ». L'entrée de calcium extracellulaire (5) permet l'activation du facteur de transcription NF-AT (6). Une partie de calcium extracellulaire sert à remplir les réserves intracellulaires à nouveau.

A.

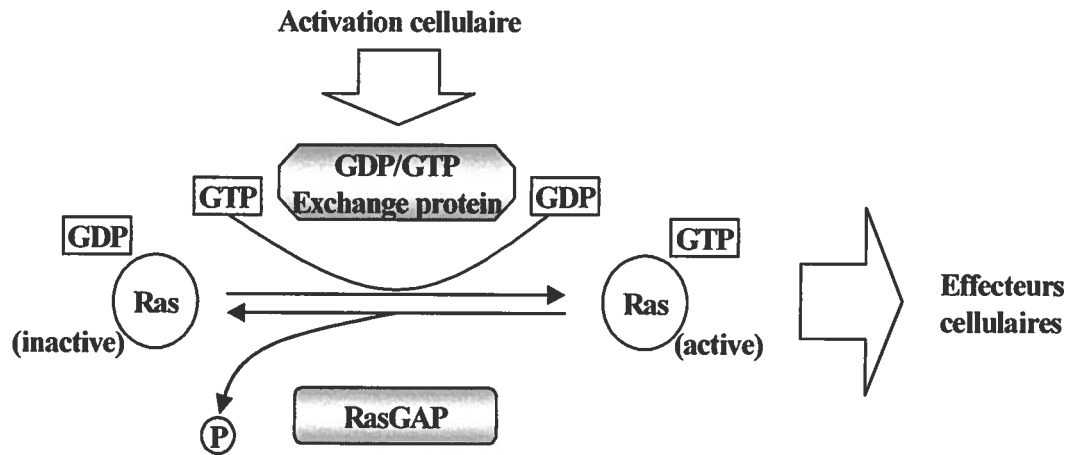


Figure 4A *Activation de la petite protéine G Ras. Les petites protéines G ont 2 formes interchangeables, la forme liée au GTP (active) et la forme liée au GDP (inactive). Un signal en amont stimule la dissociation du GDP de la forme inactive et induit l'association de GTP. Le passage de la forme inactive à la forme active est inefficace et sollicite l'aide de protéines pour accélérer ce processus, il s'agit de GEP (GDP/GTP exchange protein) aussi nommées GEF (exchange factor) ou GRF (release factor). Ras-GTP interagit avec son substrat, Raf-1, une protéine effectrice essentielle à l'activation des MAPKs. Ras-GTP est convertie en Ras-GDP grâce à l'action GTPasique intrinsèque de la molécule. Cette réaction est néanmoins lente donc stimulée par des GAPs (GTPase Activating Proteins). Dans le cas de ras, il s'agit de la p120RasGAP. Il existe différentes GAPs pour différentes petites protéines G mais les GAPs sont spécifiques pour une protéine G donnée.*

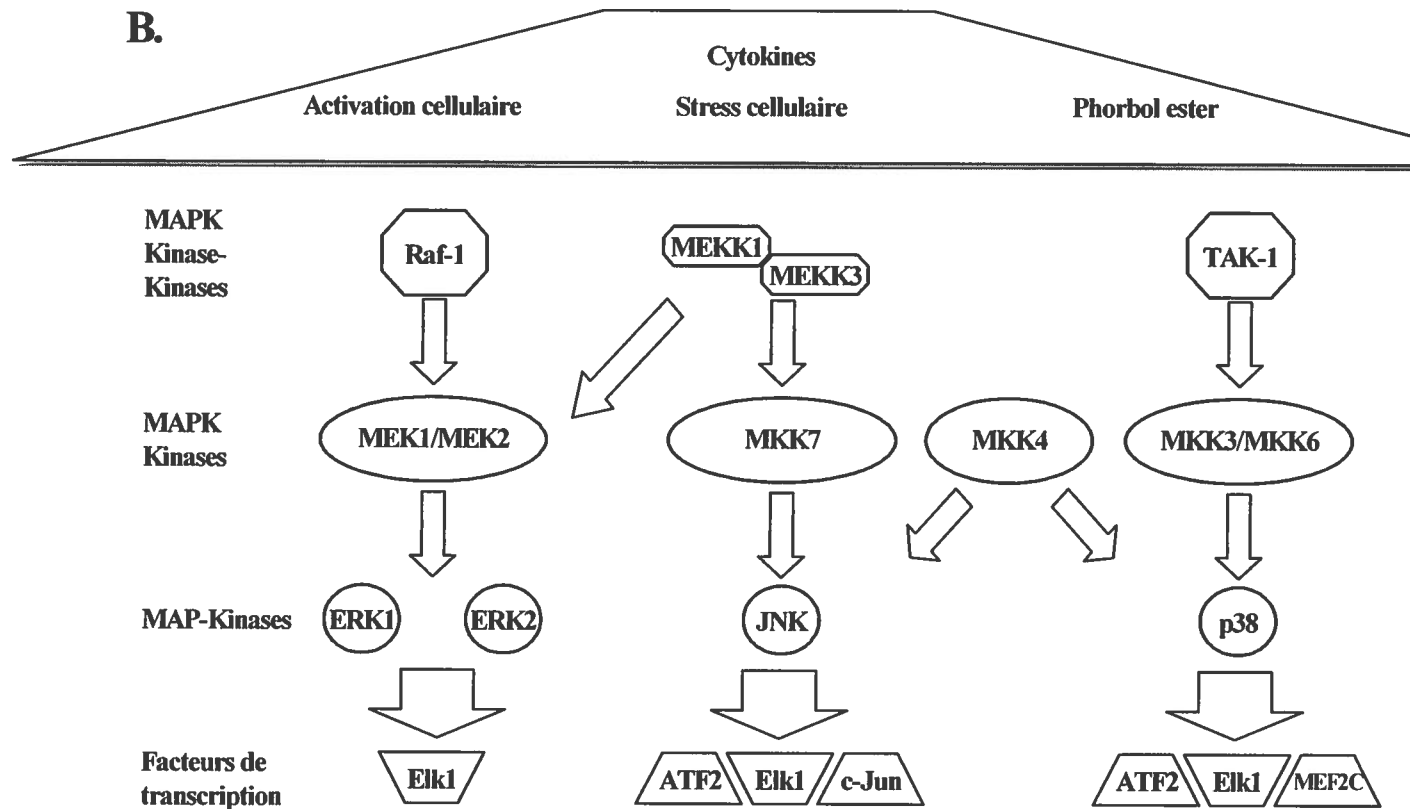


Figure 4B *Activation des MAPKs. Il est possible de séparer la voie des MAPKs en 3 tiers d'activation. En réponse à un stimulus spécifique, le stress cellulaire ou des agents pharmacologiques, le premier tiers, celui des MAPKKKs, est activé. Les MAPKKKs activées phosphorylent un deuxième groupe de MAPKs contenues dans le deuxième tiers, les MAPKKs. Une fois activées, les MAPKKs phosphorylent et activent les kinases du dernier tiers, les MAPKs. Les MAPKs agissent ensuite, entre autre, en activant différents facteurs de transcription.*

Les MAPK sont impliquées dans plusieurs phases de la réponse immunitaire, tout d'abord l'initiation du signal ensuite l'expression des gènes (activation des facteurs de transcription par translocation au noyau), la fonction effectrice des T CD4+ et T CD8+ , la maturation des thymocytes et finalement dans l'apoptose cellulaire induite par l'activation. Vu l'importance des MAPK à plusieurs niveaux dans la fonction cellulaire, les cascades de MAPK sont sujettes à plusieurs mécanismes de régulation.

- **L'activation des petites protéines G dépend du recrutement de protéines à la membrane.** Étant ancrées à la membrane, les petites protéines G dépendent de GAP pour les inactiver et de GEF pour les activer. Ces protéines régulatrices sont recrutées aux récepteurs où l'activation des protéines G a lieu via leur interaction avec des protéines adaptatrices qui forment des complexes multimoléculaires. À titre d'exemple, le complexe Grb2-Sos recruté à LAT et ainsi à proximité de Ras suite à une activation du TCR (figure 2).
- **Le contrôle exercé par les kinases en amont des MAPKs.** Par exemple, MEKK1 peut phosphoryler les MKKs MEK1/2 et MKK4/7 en amont de ERK1/2 et de JNK respectivement. Pourtant, selon le stimulus externe seulement la kinase JNK est activée en fin de cascade. Ceci peut être le résultat d'une association non-productive entre MEKK1 et MEK1/2 ou encore l'activation de phosphatases spécifiques pour ERK1/2 qui vont empêcher son activation.
- **La régulation par les phosphatases.** Puisque les MAPKs sont activées suite à leur phosphorylation double sur sérine/thréonine et sur tyrosine, les phosphatases qui peuvent déphosphoryler les résidus sérines/thréonines et tyrosines exercent un contrôle important dans la régulation des MAPKs. À titre d'exemple, ERK2 voit son activité chuter à moins de 1% de son activité totale lorsque l'enzyme est déphosphorylée sur résidu tyrosine ou sérine/thréonine. PAC-1 (phosphatase of activated T cells) est un exemple de phosphatase à double spécificité qui déphosphoryle ERK et inactive l'enzyme (Chu, Y., Soliski, P. A. *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que l'activation du gène PAC-1 est dépendante de ERK (Brondello, J. M., Brunet, A. *et al.*, 1997), suggérant un mécanisme d'inhibition en boucle. Les phosphatases à

double spécificité MKP-1 et -2 ciblent aussi les MAPKs (Chu, Y., Solski, P. A. *et al.*, 1996; Brondello, J. M., Brunet, A. *et al.*, 1997).

- **La localisation subcellulaire des MAPK activées peut aussi jouer sur leur fonction.** Par exemple, JNK et ERK doivent transloquer au noyau suite à leur activation pour permettre l'activation des facteurs de transcription c-Jun et Elk-1 respectivement. Une mauvaise localisation ou l'inhibition de cette translocation résulte en une inhibition du signal. JNK est aussi importante dans la régulation de NF-AT dans les cellules Jurkat (Su, B., Jacinto, M. *et al.*, 1994).

1.4 Régulation d'IL-2 : les facteurs de transcription

L'interleukine-2 est une glycoprotéine de 15 kDa produite par les lymphocytes T CD4+. À l'origine, l'IL-2 était décrite comme un facteur de croissance autocrine pour les cellules T ou une lymphokine. Depuis, des récepteurs pour la cytokine ont été découverts sur une variété de types cellulaires du système immunitaire tels : les cellules B, les cellules NK, des monocytes et des macrophages (Gomez, J., Gonzalez, A. *et al.*, 1998). La fonction principale de l'interleukine-2 demeure l'activation lymphocytaire et l'expansion clonale, cependant, des études récentes soulignent d'autres rôles possibles pour la molécule. Des études réalisées dans des modèles murins déficients pour l'expression d'IL-2 illustrent l'importance de la cytokine dans l'homéostasie des cellules T. Dans les cellules T, la prolifération des cellules Th1 est intimement liée à la production d'IL-2, la cytokine stimule la prolifération et la cytotoxicité des CTL et des NK et contribue aussi à l'activation des cellules B ainsi qu'à la fonction phagocytaire des macrophages.

1.4.1 Événements déclenchés par l'IL-2

L'un des événements rapidement observable suite à la ligature du TCR/CD3 avec l'antigène est l'activation de la voie Ras. La prolifération ou plus précisément la progression des lymphocytes T quiescents jusqu'au stade G1 représente l'une des conséquences de cette activation. Ce passage s'accompagne de production de la

cytokine IL-2. La cytokine agit ensuite sur les cellules T de manière autocrine et paracrine pour induire une deuxième ronde d'activation de la voie Ras. Spécifiquement, l'IL-2 se lie à l'IL-2R et induit l'association SH2-dépendante de la molécule adaptatrice Shc (Burns, L. A., Karnitz, L. M. *et al.*, 1993; Ravichandran, K. S. et Burakoff, S. J., 1994) à l'IL-2R. Par la suite le complexe Grb2-Sos est recruté à l'IL2R et induit éventuellement l'activation de la voie Ras. Des observations récentes indiquent que ce deuxième pic d'activation est critique au passage de la phase G1 à la phase S, donc à la synthèse de protéines. La signalisation induite par l'IL-2 cible aussi l'activation de plusieurs gènes tels bcl-2, c-myc, c-fos et c-jun (Kawahara, A., Minami, Y. *et al.*, 1995; Gomez, J., Martinez, A. C. *et al.*, 1998). Bcl-2 est un agent anti-apoptotique (Borner, C., 2003) alors que c-myc est aussi impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Les proto-oncogènes c-fos et c-jun sont activés via ras (activation via IL-2R) et se combinent pour former le facteur de transcription AP-1.

La phosphorylation de l'IL-2R entraîne aussi le recrutement de la PI3K via son interaction de type SH2 avec Gab2 qui se lie au complexe Shc-Grb2, lequel est associé à l'IL-2R (Ward, S. G. et Cantrell, D. A., 2001). Brièvement, les membres de la famille d'enzyme PI3K sont formés d'une sous-unité catalytique (p110 avec 4 isoformes : α , β , γ et δ) associée à une sous-unité régulatrice (p85 avec 3 isoformes : α , β et γ). La PI3K phosphoryle le phosphatidyl inositol [PtdIns (4,5)P₂ → PtdIns (3,4,5)P₃ ou PIP3] en réponse à divers facteurs de croissance ou encore suite à l'activation par le TCR. Le produit lipidique PIP3 est responsable entre autres du recrutement et de l'activation des enzymes Akt/PKB et Tec via leur domaine PH. Les fonctions cellulaires qui sollicitent la PI3K sont variées (Ward, S. G. et Cantrell, D. A., 2001) et incluent la prolifération cellulaire, la différenciation, la réorganisation du cytosquelette.

1.4.2 Structure du promoteur d'IL-2

Le promoteur IL-2 comprend environ 300 paires de bases d'ADN et est situé en amont du site d'initiation de la transcription d'IL-2. Cette région d'ADN contient plusieurs domaines d'interaction pour différents membres des familles de facteurs de transcription NF-AT, AP-1, NF- κ B et Oct. Tous ces facteurs de transcription exercent

différents niveaux de contrôle envers l'expression du gène IL-2. La cellule activée doit donc intégrer plusieurs voies de signalisation qui activent différents facteurs de transcription afin de sécréter de l'IL-2. Ainsi, à titre d'exemple, la voie de calcium/calciéurine qui déclenche la déphosphorylation, l'activation et la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-AT doit être synchronisée avec la voie de signalisation qui induit la phosphorylation, l'activation et même la synthèse des facteurs de transcription c-fos et c-jun (facteur AP-1) dans le but d'activer la transcription du gène IL-2.

Le promoteur IL-2 contient 2 sites reconnus par NF-AT et des études menées par Garrity et al (Garrity, P. A., Chen, D. *et al.*, 1994) démontrent que ces 2 sites sont occupés dans des lymphocytes T activés. La mutation de l'un des 2 sites suffit pour inhiber la transcription du gène. Le site NF-AT le plus distal représente un site composite où les molécules NF-AT et AP-1 forment un complexe avec l'ADN, la formation de ce complexe optimise l'efficacité des 2 facteurs de transcription.

Les protéines Oct-1 et -2 (octamer proteins) se lient à 2 régions dans le promoteur d'IL-2 et la mutation de l'une de ces 2 régions inhibe partiellement l'activité du promoteur IL-2 (Jain, J., Loh, C. *et al.*, 1995). Le site Oct proximal forme aussi un site composite qui requiert les facteurs Oct-1 et AP-1. Les protéines Oct-1 et -2 peuvent toutes deux se lier au site proximal Oct, mais Oct-2 représente un transactivateur supérieur à Oct-1. Oct-1 est exprimée de manière constitutive alors que Oct-2 est synthétisée *de novo* suite à l'activation cellulaire.

Il y a aussi un site de liaison pour le facteur de transcription NF- κ B dans le promoteur IL-2. Contrairement aux autres sites de régulation, la mutation du site NF- κ B n'affecte pas la transcription du gène IL-2. Dans la plupart des types cellulaires, NF- κ B est observée en complexe avec son inhibiteur, I κ B, dans le cytoplasme. Après une stimulation appropriée, ce complexe se dissocie via une étape de phosphorylation de l'inhibiteur et NF- κ B est transportée au noyau.

CD28RE représente une séquence d'ADN située en aval du site d'initiation de transcription d'IL-2. Cette séquence est la cible de facteurs de transcription de la

famille NF- κ B/Rel (Verweij, C. L., Geerts, M. *et al.*, 1991). Kathleen L. McGuire et al (McGuire, K. L. et Iacobelli, M., 1997) démontrent que le CD28RE forme un site composite avec une séquence reconnue par le facteur de transcription AP-1.

1.4.3 NF-AT

La famille NF-AT comprend 5 membres désignés NF-AT1 à 5 (Rao, A., Luo, C. *et al.*, 1997). À l'exception de NF-AT5, ces membres possèdent une structure semblable qui ne diffère que par la longueur de la portion C-terminale. Les NF-AT1 à 4 contiennent une région régulatrice N-terminale plus ou moins conservée responsable de la localisation et de l'activité transcriptionnelle de la molécule. Vient ensuite la région responsable de la liaison à l'ADN, c'est la région de plus grande homologie entre les molécules NF-AT, jusqu'à 70% d'homologie entre les premiers membres mais seulement 40% pour NF-AT5. NF-AT1, 2 et 4 sont exprimées surtout dans les cellules du système immunitaire où elles contribuent à la transcription de plusieurs gènes nécessaires à la réponse immune. Par exemple, chez la cellule T les cytokines: IL-2,-3,-4,-8,-13, IFN- γ , TNF- α , CD40L, CD69, IL-2R α sont régulées par ces facteurs de transcription. Les 5 NF-ATs sont aussi exprimés dans des tissus non lymphoïdes. L'identification de leurs fonctions dans ces tissus provient surtout de l'observation de phénotypes murins déficients pour l'expression de tel ou tel facteur de transcription. Par exemple, le facteur de transcription NF-AT2 est impliqué dans la formation de valves cardiaques (Crabtree, G. R. et Olson, E. N., 2002).

L'activité de NF-AT dans la cellule T est contrôlée par le calcium. Comme mentionné précédemment, il faut une entrée de calcium soutenue et de faible intensité pour permettre l'activation de la sérine phosphatase calcineurine (Guerini, D., 1997). La calcineurine activée déphosphoryle ensuite la région régulatrice des différents NF-AT. Par spectrométrie de masse et par mutations ponctuelles il a été démontré que NF-AT1 possède 21 sérines phosphorylées dans la cellule T au repos (Okamura, H., Aramburu, J. *et al.*, 2000). 14 de ces phosphosérines se situent dans une région régulatrice conservée parmi les membres classiques de NF-AT et 13 de ces sérines sont déphosphorylées après stimulation. La déphosphorylation de ces résidus est requise pour exposer le signal de localisation nucléaire (NLS) et masquer le domaine d'exportation nucléaire (NES) du facteur de transcription. Par opposition,

l'exportation de NF-AT est catalysée par des kinases qui résident ou agissent à l'intérieur du noyau (Scott, J. E., Ruff, V. A. *et al.*, 1997). L'analyse des kinases capables de phosphoryler les sites du NES a entraîné la purification de la sérine-kinase GSK3 (Beals, C. R., Sheridan, C. M. *et al.*, 1997). Des études subséquentes ont ensuite confirmé l'implication de GSK3 dans la régulation négative de la production d'IL-2 (Otheiki, T., Parsons, M. *et al.*, 2000). Outre GSK3, d'autres sérines-kinases sont candidates pour promouvoir l'exportation nucléaire de NF-AT. Des approches de phosphorylation *in vitro* suggèrent que les p38, MAPK, la caseine kinase I et MEKK-1 sont potentiellement impliquées dans la régulation du facteur de transcription NF-AT. De plus, JNK peut phosphoryler des sérines spécifiques sur NF-AT2 et non NF-AT1 afin d'inhiber l'interaction entre la calcineurine et NF-AT2 (Okamura, H., Aramburu, J. *et al.*, 2000). Dans une autre étude, Dong et al (Dong, C., Yang, D. D. *et al.*, 1998) observent une augmentation de la localisation nucléaire de NF-AT2 (pas NF-AT1) dans des cellules T prélevées chez des souris JNK^{-/-}.

La liaison de NF-AT et AP-1 sur des sites contigus augmente jusqu'à 20 fois la stabilité du complexe NF-AT:AP-1:ADN en comparaison au complexe NF-AT:ADN. Il semble que des sites composites NF-AT : AP-1 existent pour plusieurs gènes impliqués dans une réponse immunitaire (Macian, F., Lopez-Rodriguez, C. *et al.*, 2001). En effet, des séquences ciblées par NF-AT et AP-1 ont été identifiées dans les gènes IL-3, IL-4, IL-5 et TNF- α .

1.4.5 AP-1

Le facteur de transcription AP-1 a été reconnu à l'origine comme une protéine liée à la séquence d'ADN TGACTCA retrouvée dans le promoteur SV40 des cellules HeLa. Depuis, cette séquence a été identifiée dans plusieurs gènes cellulaires (Shaulian, E. et Karin, M., 2001). Entre les années 1988 et 1991, des études ont démontré que AP-1 était formé de dimères de protéines qui incluent les familles de protéines Fos (c-fos, fra-1,-2, fosB et fosB2) et Jun (c-jun, junB, junD et ATF-2)(Chinenov, Y. et Kerppola, T. K., 2001). Ces protéines forment des dimères (fos/jun ou jun/jun mais pas fos/fos) grâce à un motif leucine-zipper (Foletta, V. C., Segal, D. H. *et al.*, 1998). La régulation des complexes AP-1 s'effectue à différents niveaux. i) D'abord au niveau de la transcription des gènes Fos et Jun qui codent pour les composantes de AP-1. L'expression de ces gènes est rapide, transitoire et strictement régulée. L'expression

de c-fos est régulée par les voies de signalisation qui impliquent la PKC, la mobilisation du calcium, la cascade p21Ras-MAPK et même la sérine/thréonine kinase FosKinase (Nel, A. E., Taylor, L. K. *et al.*, 1994). L'expression de c-jun dépend entre autres de l'activité de la PKC, la mobilisation de calcium et de l'activité des PI3K et sphingomyélinases activées par une co-stimulation CD28. ii) Ensuite, au niveau de la phosphorylation de ces protéines laquelle est requise pour leur localisation/activation nucléaire et leur dimérisation subséquente. Certaines protéines AP-1 sont des substrats des MAPKs. Par exemple, JNK phosphoryle ATF-2, c-Jun, JunD et JunB. Malheureusement, des études sur des souris déficientes pour l'une ou l'autre des ces protéines n'ont jusqu'à présent pas démontré formellement que ces molécules représentent des substrats de JNK, ceci est probablement dû à une forme de compensation par les autres membres de la famille Jun. La fonction du facteur de transcription composite AP-1 dépend en grande partie des combinaisons de molécules, Fos ou Jun, qui forment un dimère AP-1 particulier. Ainsi, l'activité du complexe AP-1 est variable et observée dans plusieurs fonctions cellulaires telles la prolifération, la différenciation et même l'apoptose.

1.5 Récepteurs qui modulent l'activation des lymphocytes T

L'activation physiologique de la cellule T est réalisée lorsque le TCR reconnaît un Ag spécifique présenté par les molécules du CMH, lesquelles sont exprimées sur différentes cellules dites présentatrices d'antigènes ou CPAs. Cependant, d'autres molécules de surface participent à l'interaction entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice. Ces molécules jouent des rôles essentiels dans l'optimisation et/ou l'amplification du signal pour contribuer à l'activation cellulaire mais peuvent aussi réguler négativement la réponse cellulaire. Ces molécules comprennent CD2, CD4, CD8, LFA-1, CD5, CD28, etc.. La liste potentielle de molécules accessoires est longue et la contribution de ces molécules n'est pas toujours claire cependant, le patron d'expression de leurs ligands permet de prévoir lesquelles de ces molécules accessoires sont impliquées dans un contexte de stimulation particulier. Par exemple, CD28 reconnaît les molécules B7 et celles-ci sont exprimées sur les lymphocytes B activés, les macrophages et les cellules dendritiques. Donc l'interaction entre la cellule T et une cellule B va possiblement impliquer le TCR et la molécule CD28. On

connaît aussi l'implication des molécules d'adhésion qui contribuent à la formation de zones de contact entre les lymphocytes T et les CPAs. Par exemple, LFA-1 (CD11a/CD18) qui participe entre autres à l'adhésion cellulaire indépendante de l'antigène avec ICAM-1 (CD54). D'autres molécules, comme CD2 et CD28, combinent des composantes d'adhésion, de co-stimulation et d'activation du lymphocyte. Voici donc une description plus détaillée de certaines de ces molécules.

1.5.1 CD4 et CD8

Les molécules CD4 et CD8 définissent les deux grands groupes de cellules T. Ces co-récepteurs contribuent au phénomène de restriction des classes lors de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH en liant la partie non-polymorphique des molécules CMH de classe II ou I respectivement. Outre la stabilisation de l'interaction entre la CPA et la cellule T au niveau du contact TCR/peptide/CMH (Garcia, K. C., Scott, C. A. *et al.*, 1996), les molécules CD4 et CD8 contribuent à la transduction des signaux via l'interaction entre leur domaine intracellulaire et la région N-terminale de la PTK cytoplasmique Lck (Rudd, C. E., Barber, E. K. *et al.*, 1991). Selon le mécanisme proposé, l'interaction entre le CMH et la molécule CD4 ou CD8 permet le recrutement de la kinase Lck à proximité du complexe TCR/peptide/CMH activé.

1.5.2 CD2

1.5.2.1 Structure, rôle et fonction

CD2 est une glycoprotéine de surface de 45-55 kDa exprimée à la surface des thymocytes, des lymphocytes T matures, des cellules NK et des cellules LAK. CD2 a une structure moléculaire hautement conservée qui comprend une région extracellulaire formée de 2 domaines du type immunoglobuline, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique riche en prolines et chargée positivement (Davis, S. J., Ikemizu, S. *et al.*, 1998; Tangye, S. G., Phillips, J. H. *et al.*, 2000). La portion extracellulaire de CD2 humain est reconnue par des anticorps spécifiques dirigés contre 3 épitopes différents, les épitopes T11-1, T11-2 et T11-3. Les 2 premiers sont exprimés sur les cellules T au repos alors que T11-3 n'est détectable qu'à la surface des cellules T activées. Une étude menée par le groupe de

Reinherz a permis de déterminer que l'utilisation simultanée des anticorps dirigés contre les épitopes T11-2 et T11-3 est nécessaire pour induire la prolifération et l'activation cellulaire en absence d'une stimulation antigénique (Meuer, S. C., Hussey, R. E. *et al.*, 1984). CD58 (LFA-3), une protéine de surface exprimée sur les cellules présentatrices d'antigène et une variété de types cellulaires différents, représente le ligand naturel de CD2 chez l'homme (Selvaraj, P., Plunkett, M. L. *et al.*, 1987). La régulation de l'avidité de CD2 pour CD58 est réglée en grande partie par une courte séquence d'acides aminés qui se situe dans la région c-terminale de la portion intracytoplasmique du co-récepteur (Hahn, W. C., Rosenstein, Y. *et al.*, 1992; Hahn, W. C. et Bierer, B. E., 1993). La protéine CD48 humaine est aussi un ligand pour le CD2 humain cependant, l'affinité de cette association est très faible (100-1000 μ M) en comparaison à l'affinité mesurée pour le couple CD2 humain et CD58 humain (2-20 μ M) (Arulanandam, A. R., Moingeon, P. *et al.*, 1993). Au contraire, chez la souris, la molécule CD48 représente le ligand majoritaire de CD2 (Kato, K., Koyanagi, M. *et al.*, 1992). Les molécules CD2, CD48, CD58 de même que SLAM, CD84, 2B4 et Ly-9 sont tous membres de la famille de protéines CD2 (Tangye, S. G., Phillips, J. H. *et al.*, 2000). Curieusement, les molécules de cette famille se lient à des molécules qui présentent une structure semblable, par exemple la formation des couples CD2 et CD58 ou CD2 et CD48. Ceci est poussé à l'extrême dans le cas de la molécule SLAM qui agit comme auto-ligand. Chez l'humain, CD2 est une molécule d'adhésion impliquée dans l'optimisation de la reconnaissance de l'antigène par des cellules T (Davis, S. J., Ikemizu, S. *et al.*, 1998; Wild, M. K., Cambiaggi, A. *et al.*, 1999). CD2 est aussi impliquée dans la cytolyse dirigée par des cellules T cytotoxiques (Le Guinier, S., Le Dréan, E. *et al.*, 1998) et les cellules NK. Finalement, elle joue un rôle de molécule d'adhésion mais aussi de voie de stimulation directe du lymphocyte T (Meuer, S. C., Hussey, R. E. *et al.*, 1984; Ohno, H., Ushiyama, C. *et al.*, 1991). La capacité de favoriser la production de cytokines impliquées dans une réponse de type Th2 représente une autre fonction coordonnée par CD2. Ainsi, la double stimulation de cellules T par CD3 et CD58 optimise la production des cytokines IL-10 et IFN γ au-delà des niveaux observés dans une double stimulation des récepteurs CD3 et CD28 (Bullens, D. M., Rafiq, K. *et al.*, 2001). De plus, une série d'études indique que l'interaction entre CD2 et CD58 régule la différenciation du lymphocyte T en modifiant la réponse cellulaire envers la cytokine IL-12 (Gollob, J. A., Li, J. *et al.*,

1995; Gollob, J. A., Li, J. *et al.*, 1996; Gollob, J. A. et Ritz, J., 1996). Les propriétés activatrices de CD2 n'ont été décrites que pour les lymphocytes T humains. En effet, chez la souris, la molécule CD2 ne représente tout simplement pas une voie d'activation importante pour la cellule T. En fait, même l'absence d'expression de CD2 chez la souris n'affecte pas la capacité des cellules T à mener une réponse immunitaire apparemment normale (Killeen, N., Stuart, S. G. *et al.*, 1992). Néanmoins, il a clairement été démontré que la présence de CD2 contribue à abaisser la concentration d'antigènes nécessaires pour atteindre le seuil d'activation chez les lymphocytes T murins, confirmant une certaine importance pour la molécule CD2 dans le processus d'activation lymphocytaire chez la souris (Bachmann, M. F., Barner, M. *et al.*, 1999).

D'autres études suggèrent que la ligation de la molécule CD2 pourrait représenter une composante dans la régulation négative de certains aspects de l'activation de la cellule T. Par exemple, CD2 semble aussi impliquée dans l'inversion du phénotype d'anergie observé dans un système de stimulation où la cellule T est exposée à un antigène en absence d'une co-stimulation par B7 (Boussiotis, V. A., Freeman, G. J. *et al.*, 1994). Brièvement, les cellules T deviennent anergiques suite à une stimulation via CD3 tout en bloquant la voie de co-stimulation via B7. Par la suite, les cellules anergiques demeurent réfractaires à l'activation cellulaire suite à une variété de stimuli incluant des alloantigènes, les molécules B7 et CD58. Le groupe observe alors une inversion du phénotype d'anergie uniquement suite à l'incubation des cellules avec une combinaison de CD58 et d'IL-2 pendant une période de 7 jours. Curieusement, dans cette étude, le comportement des cellules anergiques suggère que CD2 joue aussi un rôle dans le maintien du phénotype d'anergie cellulaire. Ce rôle s'effectue en envoyant des signaux de régulation négative suite à la ligation de CD2 ou encore suite à la modification de l'expression de CD2 à la surface des cellules anergiques. En effet, les molécules CD2 exprimées à la surface des cellules T anergiques adoptent une conformation qui masque l'un des épitopes d'activation de CD2, l'épitope CD2R (aussi T11-3). Cet épitope est essentiel pour qu'il y ait activation cellulaire suite à une stimulation CD2 et correspond à une région reconnue par le ligand naturel de CD2, CD58. Chez les cellules T anergiques, cette version de CD2 ne répond plus à la stimulation par des anticorps dirigés contre CD2R, du moins jusqu'à ce que l'incubation de 7 jours avec de l'IL-2 restaure l'expression de la molécule CD2

entière. Cette étude démontre ainsi que la restauration de la capacité à répondre de la cellule T corrèle avec l'expression de l'épitope d'activation CD2R.

La signalisation négative observée suite à la ligation de CD2 semble restreinte à des cas particuliers. Ainsi, on observe une diminution de l'activation induite chez les cellules T en co-engageant CD45 avec CD2 ou en internalisant CD3 avant la stimulation par CD2 (Samelson, L. E., Fletcher, M. C. *et al.*, 1990). LFA3TIP est une protéine de fusion composée du premier domaine de LFA3 (CD58) lié à une séquence d'IgG1. Elle se lie à CD2 au même endroit que CD58 cependant, l'interaction entre LFA3TIP et CD2 inhibe l'activation de la cellule T en réponse à plusieurs stimuli. Ainsi, LFA3TIP inhibe entre autres, la prolifération cellulaire induite par le TCR et parvient à diminuer la réponse de cellules T alloréactives lorsqu'elles sont en présence d'un alloantigène (Miller, G. T., Hochman, P. S. *et al.*, 1993). Finalement, dans des cellules T recueillies à partir de souris traitées avec des anticorps dirigés contre CD2, on observe que les cellules T répondent beaucoup moins bien vis-à-vis différents stimuli incluant des anticorps dirigés contre CD3, des super antigènes et des alloantigènes (Guckel, B., Berek, C. *et al.*, 1991). Ces observations suggèrent que la signalisation initiée par CD2 possède vraisemblablement une composante négative dans l'activation du lymphocyte T bien que le rôle de cette fonction ou plus précisément le contexte physiologique qui sollicite cet aspect de la signalisation via CD2 demeure inconnu.

Finalement, la signalisation via CD2 pourrait aussi jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose chez des cellules T activées (Mollereau, B., Deckert, M. *et al.*, 1996). En effet, des lymphocytes T stimulés en combinant la cytokine IL-2 et des anticorps dirigés contre CD2 deviennent susceptibles à l'apoptose Fas-indépendante.

1.5.2.2 Signalisation via CD2

La phosphorylation sur tyrosine et l'activation de la PLC γ -1 représente l'un des premiers événements biochimiques induits par une stimulation CD2. Il a été démontré que la stimulation de CD2 avec la protéine de fusion CD58/Ig induit l'activation de la PLC γ -1 et optimise l'activation cellulaire via CD3 (Kanner, S. B., Damle, N. K. *et al.*, 1992). Dans cette étude, les auteurs démontrent aussi qu'une stimulation avec un anticorps dirigé contre CD2 peut activer la cellule sans la contribution du TCR. Dans

ce cas, on observe ensuite une augmentation de la mobilisation de calcium, de la quantité de protéines phosphorylées, de la concentration intracellulaire de messagers secondaires phosphatidylinositols, la phosphorylation sur sérine de la sous-unité ζ du complexe CD3 et finalement une augmentation de la sécrétion d'IL-2. Il est à noter que l'expression du complexe TCR/CD3 et spécifiquement l'expression de la sous-unité ζ est requise pour obtenir une stimulation via CD2 (Alcover, A., Alberini, C. *et al.*, 1988) sauf dans les cas de surexpression du récepteur CD2 chez les cellules T (Ohno, H., Ushiyama, C. *et al.*, 1991). L'activation par CD2 induit aussi la phosphorylation et l'activation des PTKs p56Lck (Danielian, S., Fagard, R. *et al.*, 1991; Danielian, S., Alcover, A. *et al.*, 1992) et p59Fyn (Fukai, I., Hussey, R. E. *et al.*, 2000) de même que l'activation d'une autre famille de PTK, celle des Tec plus précisément Itk/Emt (King, P. D., Sadra, A. *et al.*, 1996; King, P. D., Sadra, A. *et al.*, 1998). Somme toute, la signalisation induite par une stimulation via CD2 est semblable à celle initiée suite à une stimulation via CD3 avec, néanmoins, quelques différences notamment au niveau des patrons de phosphorylation observés suite à la ligation du récepteur. Par exemple, tel que détaillé dans la section dok, la ligation du co-récepteur CD2 induit la phosphorylation de protéines à 55 et 62 kDa soit dok-1 et dok-2.

1.5.2.3 Rôle de CD2 dans le contact cellulaire

L'expression ubiquiste de CD58 permet l'interaction entre la cellule T et les CPAs, les cellules stromales de même qu'une variété de cellules qui expriment CD58. Chez la cellule T, la formation du conjugué entre CD2 et CD58 enjambe une distance de 15 nm ce qui optimise l'espace entre la cellule T et la CPA afin de favoriser l'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH, lequel enjambe aussi 15 nm. De plus, la présence de plusieurs complexes formés des paires CD2 et CD58 contribue à former des jonctions cellulaires stables entre les 2 types cellulaires (Wang, J. H., Smolyar, A. *et al.*, 1999). Cette distance couplée à l'augmentation de la quantité de molécules CD2 dans la zone de contact dispose la cellule T et la CPA dans une configuration idéale pour favoriser la reconnaissance du complexe peptide/CMH par le TCR, réduisant ainsi la quantité nécessaire d'antigènes exposés à la surface de la CPA. Puisque la vitesse d'association/dissociation entre CD2 et CD58 est très rapide, les complexes CD2/CD58 présents dans la zone de contact n'interfèrent pas avec la

diffusion du TCR dans la membrane. Ceci permet donc aux TCRs de balayer la surface de la CPA à la recherche d'un complexe peptide/CMH spécifique.

1.5.2.4 Les molécules qui s'associent à CD2

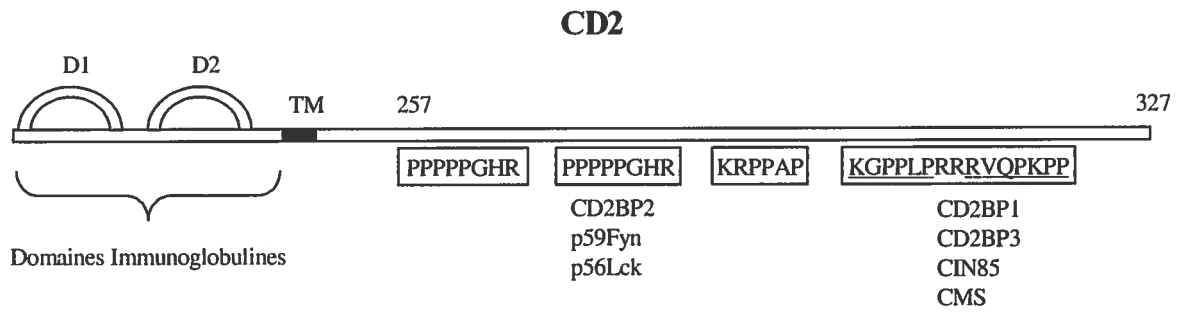
La portion cytoplasmique de CD2 contient 116 aa et comprend 5 régions riches en prolines qui sont à la base d'interactions directes avec diverses molécules intracellulaires. Jusqu'à présent, les molécules cytosoliques identifiées qui s'associent avec CD2 comprennent CD2BP2, les molécules de la famille CMS/CIN83/CD2BP3 de même que les kinases p56Lck et p59Fyn lesquelles sont toutes impliquées dans la signalisation induite par CD2 (figure 5). Les protéines CD2BP1 et en partie celles de la famille CMS/CIN85/CD2BP3 correspondent plutôt à l'aspect d'adhésion cellulaire médié par CD2. Vu l'absence d'une activité enzymatique dans la portion intracytoplasmique de CD2, il est accepté que ces associations soient à l'origine des multiples fonctions attribuées à la ligation de CD2.

1.5.2.4.1 PTKs p56Lck et p59Fyn

Il a été observé que l'activité des kinases p56Lck et p59Fyn augmente aussi suite à une stimulation CD2 du lymphocyte T (Bell, G. M., Bolen, J. B. *et al.*, 1992; Bell, G. M., Fargnoli, J. *et al.*, 1996). Dans les deux cas, une association SH3 dépendante entre la kinase et la queue cytoplasmique de CD2 est observable (Carmo, A. M., Mason, D. W. *et al.*, 1993) (Lin, H., Hutchcroft, J. E. *et al.*, 1998). Cependant, il y a une distinction à souligner au niveau des régions riches en prolines ciblées par le domaine SH3 des deux enzymes. Pour Lck, il s'agit des 2^e et 4^e segments riches en prolines alors que pour Fyn, seul le 2^e segment est impliqué. Bien que Lck soit associée à environ 2% du CD2 total à la surface des lymphocytes T au repos (Bell, G. M., Fargnoli, J. *et al.*, 1996), d'autres observations ont démontré que Fyn plutôt que Lck est associée à CD2 de manière prépondérante (Gassmann, M., Amrein, K. E. *et al.*, 1994). Aussi à partir des observations faites sur des cellules T issues de souris déficientes pour l'expression de Fyn, il a été suggéré que Fyn représente l'enzyme la plus importante dans l'activation de la cellule T suite à une stimulation CD2 (Fukai, I., Hussey, R. E. *et al.*, 2000). Ainsi, il a été observé que l'absence de Fyn corrèle avec une diminution de la mobilisation de calcium, de l'activation de MAPK, de l'activité des enzymes PKC- θ , PLC γ -1, Fak et Pyk2, de la phosphorylation des protéines dok-1

et Vav de même qu'une diminution de la prolifération cellulaire. Selon le groupe de Freund (Freund, C., Kuhne, R. *et al.*, 2002), le domaine SH3 de la kinase p59Fyn -à un moindre degré p56Lck- pourrait entrer en compétition avec le domaine GYF de CD2BP2 pour s'associer à l'une des régions riches en prolines de la queue cytoplasmique de CD2. Dans le cadre de cette compétition, la molécule CD2BP2 (décrite plus loin) est constitutivement associée à la portion intra-cytoplasmique de CD2 via une interaction proline-dépendante. Après la ligature du co-récepteur CD2, on observe une relocalisation de CD2 dans les îlots lipidiques. Pendant cette étape, Fyn déplace CD2BP2 de la portion intra-cytoplasmique du co-récepteur. L'échange de CD2BP2 pour Fyn contribue ainsi, via la phosphorylation des substrats de la kinase et l'induction de différentes voies de signalisation, à la production d'IL-2 induite par CD2.

A.



B.

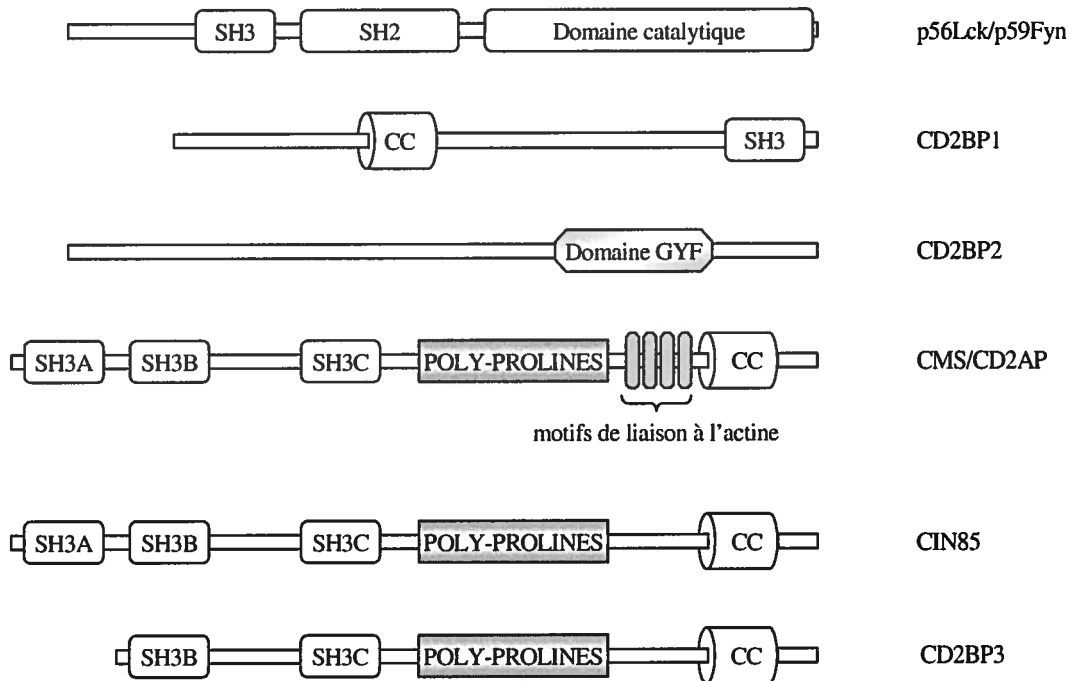


Figure 5 *Molécules associées au co-récepteur CD2. A) Représentation schématique de CD2. Les séquences encadrées correspondent aux régions riches en proline impliquées dans l'interaction de CD2 avec les molécules indiquées. B) Seules les protéines discutées dans le texte sont schématisées. SH2 et SH3: Src homology domains 2 and 3, CC: Coiled Coil domain. Figure inspirée de "CIN85/CMS family of adaptor molecules" Dikic, I., 2000*

1.5.2.4.2 CD2BP1

La protéine CD2BP1 (CD2 Binding Protein -1), a été identifiée dans le système double hybride chez la levure comme une molécule candidate pour contribuer à la fonction cellulaire de CD2 grâce à son association avec la région cytoplasmique du co-récepteur. CD2BP1 migre à 50 kDa sur un gel SDS-PAGE et sa structure comprend un domaine SH3 qui reconnaît le motif PPLP de la région C-terminale de CD2 (figure 5) (Li, J., Nishizawa, K. *et al.*, 1998). CD2BP1 contient aussi une région centrale qui présente une structure en forme d'hélice torsadée. Cette structure est commune chez des protéines qui homo- ou hétéro-dimérisent avec d'autres protéines qui partagent cette même structure comme c'est le cas pour les molécules de la famille CMS (Burkhard, P., Stetefeld, J. *et al.*, 2001). CD2BP1 est exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique et surtout dans les cellules T et les cellules NK. Chez la cellule T au repos CD2BP1 est une protéine cytosolique qui, suite à la ligature de CD2, co-localise à proximité de CD2 à la surface du lymphocyte T activé. Le rôle perçu de CD2BP1 concerne la régulation négative de l'adhésion cellulaire suite à une stimulation CD2. Spécifiquement, suite à une stimulation CD2, des cellules Jurkat peuvent adhérer à une surface couverte de fibronectine via un mécanisme qui implique les intégrines (Shimizu, Y., Mobley, J. L. *et al.*, 1995). Le même comportement est aussi observé avec des cellules Jurkat déficientes pour CD2BP1. Cependant, en exprimant CD2BP1 dans ces cellules Jurkat CD2BP1^{-/-}, on observe une interférence au niveau de l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines suite à une stimulation CD2 (Li, J., Nishizawa, K. *et al.*, 1998). Le mécanisme par lequel CD2BP1 régule l'adhésion cellulaire via CD2 fait intervenir une interaction stable entre CD2BP1 et la phosphatase PTP-PEST. Brièvement, PTP-PEST peut réguler négativement l'activité de la p130Cas laquelle participe, de concert avec d'autres constituants, à la formation et la stabilisation de complexes d'adhésion (Vuori, K. et Ruoslahti, E., 1995; Vuori, K., Hirai, H. *et al.*, 1996; Davidson, D. et Veillette, A., 2001). L'interaction entre CD2BP1 et PTP-PEST est donc probablement à l'origine de l'influence de CD2BP1 sur l'adhésion cellulaire suite à une stimulation CD2. Du point de vue fonctionnel, l'activation via CD2 induit le recrutement de CD2BP1 à proximité de la zone de contact. Puisque CD2BP1 interagit avec PTP-PEST, celle dernière est ainsi rapprochée de la p130Cas. La capacité de la PTP-PEST à déphosphoryler la p130Cas régule alors à la baisse la formation du complexe d'adhésion.

1.5.2.4.3 CD2BP2

L'association entre la portion cytoplasmique de CD2 et la protéine CD2BP2 (CD2 binding protein -2) a aussi été mise en évidence à l'aide du système de double hybride chez la levure. Cette association a été confirmée dans des cellules Jurkat (Freund, C., Kuhne, R. *et al.*, 2002). La région cytoplasmique reconnue correspond aux deux segments riches en prolines disposés en tandem dans la région N-terminale de la queue cytosolique de CD2 (PPPGHR). Cette région est aussi essentielle pour la capacité de CD2 à induire la sécrétion d'IL-2 suite à sa ligation. L'association de CD2BP2 au tandem est médiée par un domaine d'interaction particulier désigné GYF (GPY[F]xxxxM[V]xxWxxxGYF). Ce domaine, comme les domaines d'interactions de type SH3 et WW, reconnaît des séquences riches en prolines (Mayer, B. J. et Eck, M. J., 1995; Sudol, M., Chen, H. I. *et al.*, 1995; Vidal, M., Gigoux, V. *et al.*, 2001).

Dans des cellules T, la transfection transitoire de la portion GYF de CD2BP2 correspond à une augmentation jusqu'à 200% de la production d'IL-2 suite à une stimulation CD2 (Li, J., Nishizawa, K. *et al.*, 1998). Puisque cette portion de CD2BP2 entre en compétition avec la molécule complète pour l'association avec CD2, ceci suggère que CD2BP2 régule négativement la production d'IL-2 possiblement en recrutant des intermédiaires qui interfèrent à un ou plusieurs niveaux avec la voie d'activation du gène IL-2. L'identité de ces molécules demeure inconnue. Il est important de noter que l'association de CD2BP2 avec CD2 est constitutive et donc, ne dépend pas de la ligation du co-récepteur avec des anticorps ou son ligand naturel. Ainsi, il est aussi possible de croire que CD2BP2 interfère avec la production d'IL-2 via CD2 simplement par le maintien du co-récepteur CD2 à l'écart des îlots lipidiques dans le lymphocyte T du moins jusqu'à ce que la ligation de CD2 force le recrutement du co-récepteur dans les îlots lipidiques (Freund, C., Kuhne, R. *et al.*, 2002). La relocalisation de CD2 dans les îlots lipidiques correspondrait avec l'échange de CD2BP2 pour la kinase p59Fyn et l'induction des voies de signalisations qui mènent à l'augmentation de la sécrétion d'IL-2.

1.5.2.4.4 CMS/CD2AP, CIN85, CD2BP3

La protéine CD2AP (CD2 associated protein), l'homologue murin de CMS, a été identifiée avant la découverte des 3 protéines CMS, CIN85 et CD2BP3 chez l'humain. Dans des cellules T, les résultats indiquent que CD2AP reconnaît une région riche en

prolines contenue dans les 20 derniers acides aminés de la queue c-terminale de CD2. La surexpression de CD2AP bloque la polarisation du cytosquelette et le recrutement de la molécule d'adhésion CD2 lorsqu'il y a formation d'une synapse immunologique entre la cellule T et une CPA (Dustin, M. L., Olszowy, M. W. *et al.*, 1998). Cette observation suggère que CD2AP joue un rôle dans la régulation de l'interaction de CD2 avec le cytosquelette.

Chez l'humain, les protéines CMS, CIN85 et CD2BP3 montrent une similarité de structure frappante (figure 5B) mais représentent néanmoins 3 protéines qui détiennent des rôles distincts. Les 3 protéines possèdent des domaines SH3, au nombre de 2 ou 3, suivis d'un segment riche en prolines et une région c-terminale particulière qui présente une structure en forme d'hélice torsadée. Les 3 protéines sont exprimées de manière ubiquiste et semblent impliquées à des degrés variables dans la réorganisation du cytosquelette dans plusieurs types cellulaires.

CMS (Cas ligand with multiple SH3) est une protéine cytoplasmique de 80 kDa qui a été identifiée à l'origine comme une protéine qui interagit avec la p130Cas. Brièvement, la p130Cas est une protéine adaptatrice phosphorylée sur tyrosine suite à divers stimuli extracellulaires; elle joue un rôle critique dans la formation et la stabilisation de complexes d'adhésion. L'interaction entre les 2 protéines s'effectue via le domaine SH3 de la p130Cas et le domaine riche en prolines de CMS (Vuori, K. et Ruoslahti, E., 1995; Ojaniemi, M. et Vuori, K., 1997). Cette région riche en prolines peut aussi être reconnue par les domaines SH3 des protéines suivantes : les kinases de la famille Src (Fyn, Src, Yes), la sous-unité p85 de la PI3K et la protéine Grb2 (Kirsch, K. H., Georgescu, M. M. *et al.*, 1999). L'un des domaines SH3 de CMS (SH3B) permet son association à la protéine c-Cbl (Kirsch, K. H., Georgescu, M. M. *et al.*, 2001). Des études de co-transfection dans des 293T indiquent que CMS peut être phosphorylée par les kinases c-Abl, Fyn et Src. Jusqu'à présent, les conditions physiologiques qui permettent la phosphorylation de CMS demeurent inconnues. La présence de 4 sites de liaison à l'actine dans la région c-terminale de CMS contribue possiblement à l'implication de la protéine dans la réorganisation du cytosquelette.

CIN85 (Cbl interacting protein of 85kDa) interagit de manière SH3-dépendante avec la protéine c-Cbl. Elle est aussi connue sous les appellations Ruk, SETA et

SH3KBP1. Tout comme CMS/CD2AP et CD2BP3, son association à la molécule CD2 s'effectue au niveau de la quatrième région riche en prolines de la queue cytoplasmique du co-récepteur lymphocytaire i.e. le motif PPLP. Cette interaction dépend de deux de ses domaines SH3, surtout SH3A et ensuite SH3B (figure 5B) (Tibaldi, E. V. et Reinherz, E. L., 2003). Le domaine SH3A de CIN85 reconnaît aussi la séquence riche en prolines de CIN85 et de CD2BP3, le domaine SH3B quant à lui contribue partiellement à cette même interaction. Des études *in vitro* ont permis de déceler une faible interaction entre CIN85 et la p130Cas. La co-transfection de CD2 avec CIN85 dans des cellules COS a permis de démontrer que CIN85 est impliquée dans l'internalisation du co-récepteur suite à une stimulation CD2. Possiblement en faisant appel à la formation d'un complexe ternaire incluant des endophilines, c-Cbl et CIN85 tel qu'observé dans des modèles qui démontrent l'internalisation des récepteurs EGFR et c-Met suite à leur activation respective (Petrelli, A., Gilestro, G. F. *et al.*, 2002; Soubeyran, P., Kowanetz, K. *et al.*, 2002). Chez la cellule T, le rôle exact de CIN85 reste à déterminer, cependant suite à une stimulation CD2, il a été démontré que CIN85 peut bloquer partiellement la polarisation du cytosquelette. Chez le rat, des observations indiquent que l'association entre CIN85 et la sous-unité p85 de la PI3K *in vitro* ou *in vivo* mène à l'inhibition de l'activité lipide-kinase de PI3K donc à la régulation négative des voies de signalisation qui dépendent de l'activité de PI3K pour leur initiation (Gout, I., Middleton, G. *et al.*, 2000). CIN85 pourrait aussi jouer un rôle plus important dans les cellules B en vertu de la détection d'interactions avec différentes molécules impliquées dans la signalisation i.e. BLNK (B-cell linker protein), Crk1 et 2, p130Cas, p85 de la PI3K, Grb2 et Sos1 via Grb2 (Watanabe, S., Take, H. *et al.*, 2000).

CD2BP3 représente le produit majeur de l'épissage alternatif de l'ARN messager du gène qui code pour CIN85. Elle contient les 2 domaines SH3 c-terminaux de CIN85, SH3B et C (figure 5B). Ne possédant pas le domaine SH3A présent sur les molécules CMS et CIN85, CD2BP3 représente une version beaucoup plus limitée de CIN85. En fait, CD2BP3 interagit avec les mêmes molécules que CIN85 mais de manière beaucoup plus modeste voire indétectable. La protéine se démarque cependant par un plus haut niveau d'expression dans la cellule T. En se basant sur cette observation, il est possible d'argumenter que CD2BP3 puisse agir comme molécule qui antagonise l'effet de CIN85. Par exemple, l'association de CIN85 avec CD2 mène à

l'internalisation et la dégradation de CD2 via l'ubiquitinylation par c-Cbl associée à CIN85. CD2BP3 montre une faible association avec c-Cbl, donc la compétition entre CIN85 et CD2BP3 pourrait contribuer à la stabilisation de CD2 à la surface lymphocytaire.

1.5.3 CD28

CD28 est membre d'une famille de protéines qui inclut CD28, CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4), ICOS (Inducible co-stimulator) et PD-1 (Programmed death-1). Ces protéines partagent certaines caractéristiques structurales et fonctionnelles (Ishida, Y., Agata, Y. *et al.*, 1992; Lenschow, D. J., Walunas, T. L. *et al.*, 1996; Hutloff, A., Dittrich, A. M. *et al.*, 1999; Chambers, C. A., Kuhns, M. S. *et al.*, 2001). Ainsi, la portion intracellulaire des membres de la famille CD28 contient une séquence YxxM reconnue par des domaines d'interaction de type SH2 (CD28 possède aussi 3 autres tyrosines dont on ne connaît pas l'importance) à l'exception de PD-1 qui possède plutôt un ITIM à cet emplacement. La région intra-cytoplasmique contient aussi 2 motifs riches en prolines reconnus par les domaines de type SH3 retrouvés communément sur des protéines impliquées dans la signalisation. CD28 est une glycoprotéine de surface de 44 kDa constitutivement exprimée sur les cellules T. Elle est exprimée comme homodimère lié par un pont disulfure à la surface de 80% des lymphocytes T humains, soit 100% des T CD4+ et environ 50% des T CD8+. Les ligands naturels de CD28 comprennent les molécules de la famille B7, lesquelles sont surtout exprimées sur des CPAs. La molécule B7-1 (CD80) est exprimée sur les cellules B activées, les macrophages et les cellules dendritiques. Le deuxième ligand, B7-2 (CD86), est aussi exprimé sur les cellules B et T activées de même que les monocytes.

Les cellules T recueillies à partir de souris déficientes dans l'expression de CD28 montrent une réponse cellulaire diminuée vis-à-vis certains antigènes (Shahinian, A., Pfeffer, K. *et al.*, 1993; Green, J. M., Karpitskiy, V. *et al.*, 2000). Cependant, ces cellules sont en mesure de répondre de manière significative dans le contexte d'un rejet de greffe (Lin, H., Rathmell, J. C. *et al.*, 1998) et vis-à-vis certains stimuli antigéniques prolongés (Kundig, T. M., Shahinian, A. *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent que CD28 contribue à l'activation cellulaire en augmentant la sensibilité et la durée du signal via le TCR. Ainsi, la ligation de CD28 n'est pas perçue comme une

voie d'activation lymphocytaire distincte mais plutôt comme une voie de costimulation qui optimise ou influence plusieurs aspects de la réponse T suite à la ligation du TCR. En fait, la ligation simple de CD28 ne déclenche pas d'effets physiologiques notables sur la cellule T. Le concept de costimulation stipule que 2 signaux distincts sont requis pour activer la cellule T. Le modèle propose qu'un premier signal est généré par le complexe TCR/CD3 alors qu'un deuxième signal provient du récepteur de costimulation. La costimulation par CD28 est essentielle pour :

- i) Augmenter l'expression de cytokines surtout en stabilisant l'ARNm codant pour certaines cytokines comme : IL-2, IFN γ , TNF α et GM-CSF (Thompson, C. B., Lindsten, T. *et al.*, 1989). L'effet de la costimulation par CD28 se reflète à plusieurs niveaux, d'abord au niveau nucléaire où on observe une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour IL-2 dans le cytoplasme. Cette augmentation suggère que la costimulation via CD28 joue un rôle dans l'optimisation de la transcription du gène. Par la suite, au niveau post-nucléaire, on observe une stabilité accrue de l'ARNm IL-2.
- ii) Amplifier les mécanismes induits par la ligation du TCR pour mener à la prolifération et la différenciation des cellules T (Michel, F., Attal-Bonnefoy, G. *et al.*, 2001). Comme co-stimulateur, CD28 synergise avec d'autres stimulus pour augmenter la production d'IL-2 via une séquence (décrite dans la section IL-2) dans le promoteur du gène IL-2 nommé « CD28RE ». En fait, une stimulation double par les récepteurs CD3 et CD28 correspond à une augmentation de 30-100 fois dans l'accumulation d'IL-2 en comparaison à une stimulation CD3 unique. CD28 agit aussi sur les facteurs de transcription NF-AT via la modulation de la mobilisation de calcium et AP-1 via le contrôle de la phosphorylation de c-jun et de la transcription de c-fos.
- iii) Dans un contexte de stimulation antigénique, la co-stimulation du lymphocyte T par CD28 déclenche un signal requis afin d'éviter l'anergie (Appleman, L. J. et Boussiotis, V. A., 2003). Le terme « anergie » désigne un état de tolérance immunitaire au niveau d'un lymphocyte normalement

réactif vis-à-vis un antigène spécifique. Ainsi, le lymphocyte anergique n'arrive plus à proliférer, sécréter des cytokines ou se différencier lorsqu'en présence du peptide approprié. Ce phénomène est observé lorsque la cellule entre en contact avec l'antigène en absence du signal de costimulation qui peut être le résultat d'une déficience en molécules B7 ou CD28 ou encore suite au blocage de l'interaction entre la paire de molécules B7 et CD28.

- iv) Une étude menée par Boise et al (Boise, L. H., Minn, A. J. *et al.*, 1995) démontre qu'une costimulation par CD28 exerce un rôle anti-apoptotique en régulant à la hausse l'expression de Bcl-XL (un gène anti-apoptotique), cette expression augmentée corrèle avec une protection de la mort cellulaire dépendante de Fas.

1.5.3.1 Signalisation via CD28

Dans les cellules T humaines, l'interaction entre CD28 et son ligand B7, ou un anticorps dirigé contre CD28, induit la phosphorylation du co-récepteur et son association à plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Des études de co-transfections dans des cellules d'insectes ont identifié les kinases p56lck et p59fyn comme responsables de la phosphorylation sur tyrosine de la queue cytoplasmique de CD28 au niveau du motif YxxM (Raab, M., Cai, Y. C. *et al.*, 1995). La phosphorylation du motif YxxM permet le recrutement subséquent de la PI3K et semble être impliquée dans l'association SH2-dépendante des protéines adaptatrices Grb2, Gads et Vav avec CD28. Suite à la phosphorylation de la queue cytoplasmique de CD28, on observe aussi l'activation des PTK p56Lck et p59Fyn (August, A. et Dupont, B., 1994) de même que l'activation de la kinase Itk/Emt (August, A., Gibson, S. *et al.*, 1994). L'association entre la sérine/thréonine phosphatase PP2A et le motif YxxM non-phosphorylé a aussi été observée (Chuang, E., Fisher, T. S. *et al.*, 2000). Outre l'activation de ces enzymes, une costimulation CD28 amène aussi une augmentation de la mobilisation de calcium, une augmentation de l'activation de la voie des MAPK plus précisément les kinases JNK et ERK et la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines, notamment la sous-unité p85 de la PI3K (August, A. et Dupont, B., 1994) et une p97 qui correspond à la protéine Vav. Il est à noter que contrairement à une stimulation unique CD3 ou CD28, la co-ligation des 2 récepteurs

induit une phosphorylation et une relocalisation membranaire soutenue de Vav. Par contre, une stimulation unique de CD28 permet d'observer la phosphorylation des protéines dok-1 et dok-2 (Klasen, S., Pages, F. *et al.*, 1998; Michel, F., Attal-Bonnefoy, G. *et al.*, 2001). Des observations au niveau de la zone de contact entre la cellule T et la CPA indiquent que CD28 joue un rôle dans la modification du cytosquelette qui permet le recrutement des îlots lipidiques au niveau du contact. De plus, grâce à sa localisation dans le c-SMAC, CD28 jouit d'un positionnement parfait pour contribuer à la signalisation soutenue par le TCR. Par contre, il est important de noter que l'étude de l'interaction entre CD28 et ses ligands indique que CD28 n'est pas instrumental dans la stabilisation du signal généré par le TCR ou dans la formation de la synapse immunologique. CD28 profite plutôt de l'environnement de la synapse pour prolonger la signalisation initiée par le TCR (Bromley, S. K., Iaboni, A. *et al.*, 2001). Des observations suggèrent que CD28 optimise le signal en activant la forme inactive de la p56Lck via une interaction avec le domaine SH3 de l'enzyme. Vu l'absence de CD45 dans la région centrale de la synapse, cela pourrait représenter le seul moyen d'activer la kinase (Holdorf, A. D., Green, J. M. *et al.*, 1999).

1.5.4 CTLA-4

La molécule CTLA-4 est l'homologue de CD28 mais sa liaison aux molécules de la famille B7 limite ou atténue la réponse proliférative de la cellule T activée en réduisant la sécrétion d'IL-2 et en bloquant la progression du lymphocyte au stade G1 du cycle cellulaire (Brunner, M. C., Chambers, C. A. *et al.*, 1999; Chambers, C. A., Kuhns, M. S. *et al.*, 2001). CTLA-4 démontre une avidité pour les molécules B7 environ 40-100 fois supérieure à celle de CD28. Contrairement à CD28, CTLA-4 n'est pas détectable dans les lymphocytes non activés et son expression à la surface est augmentée rapidement suite à la liaison du TCR et de CD28 par leurs ligands respectifs. Cette augmentation rapide est due à l'existence de compartiments intracellulaires qui contiennent des molécules de CTLA-4 qui y sont ciblées via une interaction avec des protéines adaptatrices contenues dans ces compartiments (Egen, J. G., Kuhns, M. S. *et al.*, 2002). La ligation du TCR induit la relocalisation de ces compartiments et le positionnement de ceux-ci à l'endroit où s'effectue le contact cellulaire entre l'APC et la cellule T, la synapse immunologique. Par la suite, la translocation de CTLA-4 à la membrane est influencée par d'autres événements

déclenchés lorsque la cellule T est activée i.e. mobilisation de calcium et phosphorylation de la queue cytoplasmique de CTLA-4 (Bradshaw, J. D., Lu, P. *et al.*, 1997; Egen, J. G. et Allison, J. P., 2002). En fait, puisque l'importance de ces événements dépend de la qualité de la stimulation du TCR, la quantité de CTLA-4 accumulée à cet endroit dépend directement de l'intensité du signal généré par la ligation du TCR i.e. un agoniste partiel active partiellement les kinases et la mobilisation du calcium alors qu'un agoniste fort active complètement les kinases et la mobilisation du calcium.

CTLA-4 peut inhiber la réponse cellulaire de différentes façons :

- i) Tout d'abord en entrant en compétition avec CD28 pour les ligands de la famille B7. Comme mentionné ci-haut, l'avidité de CTLA-4 pour les molécules B7 est supérieure à celle mesurée pour CD28. La réponse cellulaire serait donc terminée suite à la diminution de la co-stimulation via l'interaction entre CD28 et les molécules B7 en faveur de l'interaction entre CTLA-4 et B7.
- ii) Tout comme CD28, la portion cytoplasmique de CTLA-4 comporte des motifs qui permettent son association avec les molécules PI3K et PP2A. Ces observations indiquent que CTLA-4 pourrait antagoniser les effets d'une stimulation par CD28 tout simplement parce que ces deux protéines entrent en compétition pour des molécules effectrices communes.
- iii) Il est possible que la ligation de CTLA-4 induise l'activation d'une phosphatase encore inconnue qui pourrait inhiber ou contrer des cascades de signalisation déclenchées par la ligation du TCR.
- iv) Finalement, la localisation de CTLA-4 dans la synapse pourrait créer de l'encombrement stérique ce qui obstruerait l'interaction entre différentes protéines situées dans cette zone.

Il y a deux modèles qui tentent d'expliquer le rôle de CTLA-4 dans la régulation négative de la réponse du lymphocyte T. Le premier stipule que CTLA-4 sert surtout à placer un seuil d'activation cellulaire afin de limiter la quantité de cellules T qui sont activées dans une situation immunologique. Le deuxième modèle suggère que CTLA-4 sert plutôt à terminer la réponse cellulaire en diminuant les capacités prolifératives des cellules T activées i.e. diminution de la production d'IL-2 et arrêt du cycle cellulaire.

Comme attendu, l'absence d'expression de CTLA-4 chez les souris produit un phénotype marqué qui est dû en grande partie à des troubles lymphoprolifératifs. Spécifiquement, les cellules T sont activées seulement 5-6 jours après la naissance et les souris meurent suite à une infiltration de lymphocytes dans les organes après 28 jours (Chambers, C. A., Kuhns, M. S. *et al.*, 2001).

1.6 Protéines adaptatrices

Les protéines adaptatrices sont des molécules dépourvues d'activité enzymatique, cependant elles contiennent des motifs d'interaction protéine : protéine (SH2, SH3, PTB, PH, WW, etc.) ou encore des séquences reconnues par ces motifs. La phosphorylation des protéines adaptatrices permet le recrutement de différentes combinaisons d'enzymes, de substrats et d'autres protéines adaptatrices dans l'optique de former des complexes protéiques nécessaires à la transduction des signaux intracellulaires. Les protéines adaptatrices ont donc le potentiel de jouer des rôles variés dans l'initiation du signal, son amplification, d'une certaine manière dans le contrôle du signal et dans certains cas, un rôle dans la diversification du signal (Rudd, C. E., 1999; Koretzky, G. A. et Myung, P. S., 2001; Burack, W. R., Cheng, A. M. *et al.*, 2002).

Premièrement, la possibilité de s'associer à plus de 2 protéines à la fois permet la coordination de plusieurs voies enzymatiques par la même protéine. Par exemple, SLP-76 peut lier la PLC γ -1 via une interaction de type SH3 et le complexe Nck/Vav via des interactions de type SH2 (Motto, D. G., Ross, S. E. *et al.*, 1996; Yablonski, D., Kadlecsek, T. *et al.*, 2001). Ainsi l'induction d'éléments tardifs qui gèrent la

transcription des gènes comme l'IL-2, dans ce cas-ci l'activation de AP-1 suite à l'augmentation de la concentration cytosolique de DAG et l'activation de NF-AT suite à l'augmentation de calcium, est coordonnée avec des modifications du cytosquelette contrôlées par Nck et Vav au niveau de la voie Rac.

Deuxièmement, on peut attribuer un rôle de maintien du seuil critique d'activation à certaines protéines adaptatrices. Ici, c'est le temps nécessaire à la formation d'un complexe de signalisation mature (i.e. capable de propager le signal) qui limite la transduction de signaux inutiles. Ainsi, la cellule T serait en mesure d'ignorer des signaux transitoires ou trop faibles (agonistes partiels) pour permettre la formation de complexes matures et seulement réagir lorsque le signal externe se prolonge suffisamment pour que le complexe de signalisation mature se forme et induise la transduction des signaux. Voici donc une façon d'expliquer l'importance de la qualité de l'interaction ligand/récepteur (peptide/CMH/TCR) dans l'induction d'un signal.

Certaines protéines adaptatrices sont ancrées à un endroit dans la cellule, par exemple LAT qui est fixée à la membrane au niveau des îlots lipidiques ou « rafts ». Ceci assure une localisation cellulaire précise des complexes formés autour de LAT. Alternativement, cette fonction d'ancrage peut être perçue comme une fonction de séquestration de certaines molécules (enzymes ou substrats) à l'écart de la voie de signalisation de manière à étouffer ou isoler le signal.

Les protéines adaptatrices peuvent aussi être considérées comme agents catalyseurs. Ainsi, la formation d'un complexe entre une enzyme, une protéine adaptatrice et un substrat crée un rapprochement entre l'enzyme et le substrat ce qui facilite la réaction entre ces 2 molécules. De cette façon, le complexe multiprotéique améliore la qualité de transduction du signal ou rend la transduction plus efficace.

Dans certains cas, l'identité de la protéine adaptatrice va permettre à une protéine spécifique de cumuler des fonctions différentes à des moments distincts, par exemple Sos peut s'associer à Grb2 ou à E3b1. Ainsi, le partenaire de Sos détermine si Sos agit comme facteur d'échange de GTP pour Ras ou comme facteur d'échange pour Rac (Innocenti, M., Tenca, P. *et al.*, 2002).

La régulation de la transduction des signaux via les récepteurs transmembranaires par des protéines dites adaptatrices est primordiale au bon fonctionnement du système immunitaire. Compte tenu de la diversité impressionnante des rôles joués par les protéines adaptatrices et du grand nombre de voies de signalisation dans lesquelles ces protéines sont impliquées, il est normal de compter plusieurs familles de protéines adaptatrices uniquement dans la cellule T.

Il est possible de classer les protéines adaptatrices selon la fonction qu'elles assurent. Soit dans un groupe qui exerce un rôle positif sur la signalisation et un groupe qui régule négativement la signalisation. Il faut aussi tenir compte de la possibilité que certaines protéines adaptatrices puissent assurer une fonction de régulation positive ou négative selon le type cellulaire dans lequel elles sont exprimées ou encore selon la voie de signalisation dans laquelle elles sont impliquées. Le rôle de la molécule adaptatrice membranaire LAT dans la régulation positive du signal d'activation chez le lymphocyte T a été décrit précédemment dans la section sur l'activation cellulaire. Dans les sections suivantes, je me limiterai à la description de protéines adaptatrices impliquées dans la régulation négative de la transduction des signaux d'activation chez le lymphocyte T.

1.6.1 Protéines adaptatrices qui modulent négativement l'activation cellulaire

Chez la cellule T, il y a plusieurs protéines adaptatrices qui peuvent moduler négativement l'activation cellulaire. Parmi celles-ci, il y a des protéines adaptatrices transmembranaires et des protéines adaptatrices cytosoliques (figure 6). Ce sont des molécules importantes pour exercer la diminution, le contrôle ou la terminaison de l'activation cellulaire dans le temps. Vraisemblablement, ces molécules agissent à différentes étapes de la cascade de signalisation initiée par la ligature du TCR.

1.6.1.1 SIT

La molécule SIT (SHP2-interacting transmembrane adaptor protein) est une glycoprotéine transmembranaire récemment découverte (Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H. *et al.*, 1999). Elle forme un homodimère et est exprimée chez les lymphocytes T et B bien que l'on puisse détecter la molécule à de très faibles niveaux dans d'autres cellules d'origine hématopoïétique. Comme d'autres protéines

adaptatrices transmembranaires, SIT est caractérisée par une portion extracellulaire courte (18 aa) et une queue cytoplasmique relativement longue (136 aa). La portion intracellulaire contient 6 résidus tyrosines dont 5 sont inclus dans des motifs d'interaction potentiels avec des domaines SH2 contenus sur d'autres protéines impliquées dans la signalisation. L'une de ces tyrosines est située dans un motif ITIM pour « immuno-tyrosine based inhibition motif ». L'activation du lymphocyte T par la voie du TCR-CD3 induit la phosphorylation sur tyrosine de SIT. Cette phosphorylation est vraisemblablement médiée par des PTKs p56Lck et p59Fyn de la famille Src quoique les protéines de la famille Syk contribuent modestement à la phosphorylation complète de SIT. La surexpression de SIT dans un contexte de stimulation CD3 indique que la molécule régule négativement l'activation du facteur de transcription NF-AT. Cependant, jusqu'à présent, les détails exacts des mécanismes moléculaires à la base de cette inhibition ne sont toujours pas connus. Dans des conditions de surexpression de SIT, l'inhibition de l'activité de NF-AT est aussi observable suite à une stimulation CD2 du lymphocyte T (Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H. *et al.*, 1999).

Les motifs ITIMs peuvent être reconnus, entre autres, par les domaines SH2 de PTPases impliquées dans l'inhibition du signal d'activation, par exemple les PTPases SHP-1, SHP-2 et SHIP. Cependant dans le cas du motif ITIM de SIT, seule l'association avec SHP-2 est détectable *in vivo* alors que des études *in vitro* montrent que les domaines SH2 des PTPases SHP1 et SHIP peuvent aussi reconnaître la tyrosine située dans l'ITIM de SIT. Dans le lymphocyte T, l'association de SIT avec SHP2 est observable suite à l'activation de la cellule par CD3 mais ne s'avère pas nécessaire à l'action inhibitrice de SIT sur NF-AT.

Des études plus approfondies de SIT ont permis de détecter d'autres molécules qui s'associent aux tyrosines phosphorylées de SIT, soit la molécule adaptatrice Grb2 et la kinase Csk. Les résultats de ces études montrent que le rôle inhibiteur de SIT dépend surtout de sa capacité à être phosphorylée par les PTKs de la famille Src plus particulièrement au niveau d'une tyrosine clefs qui semble reconnue par la PTK Csk. Toutefois, l'importance de cette association demeure indéterminée. En se basant sur l'observation que l'adaptateur Grb2 s'associe à la molécule SIT, le groupe de Schraven suggère que SIT peut aussi être impliquée dans des mécanismes de

régulation positive de l'activation cellulaire via des molécules associées aux domaines SH3 de Grb2 (SLP-76, Sos). Ici encore, l'importance de cette association demeure inconnue (Pfrepper, K. I., Marie-Cardine, A. *et al.*, 2001).

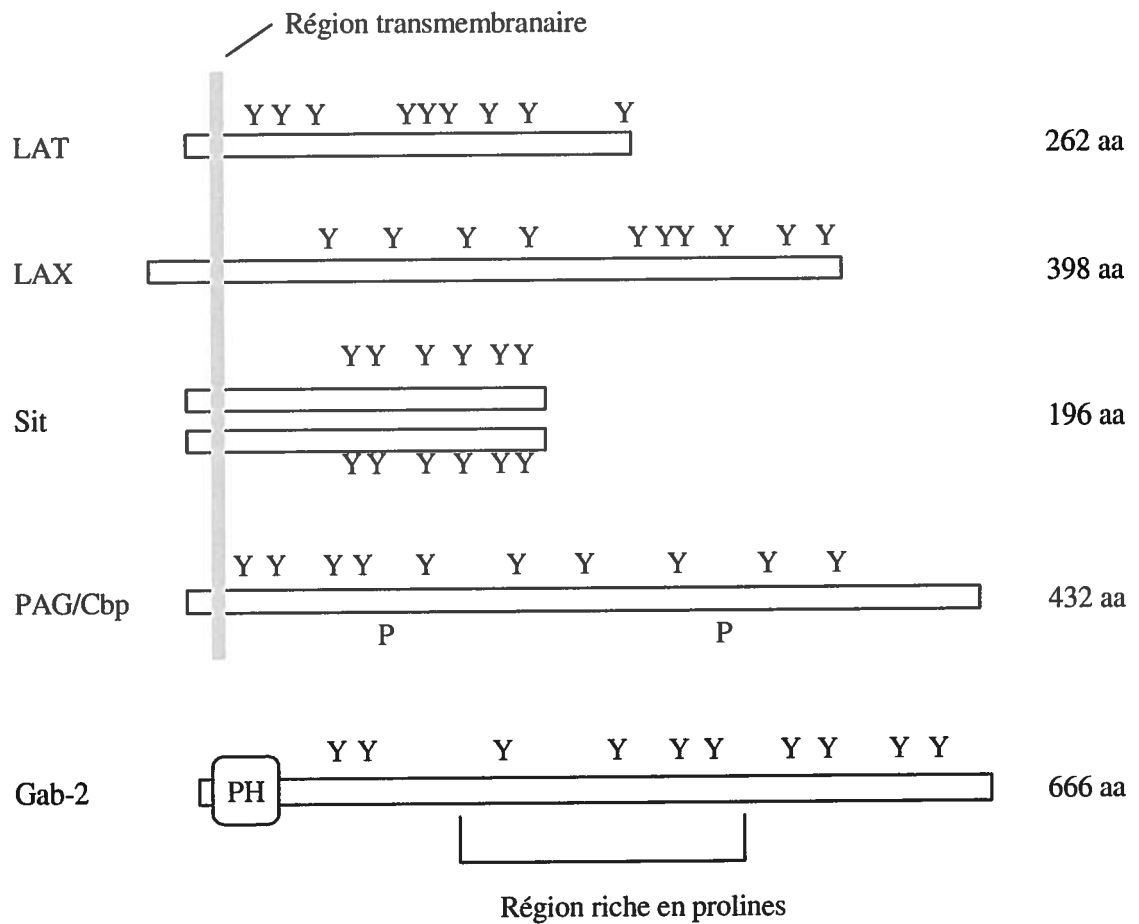


Figure 6 *Protéines adaptatrices : inhibiteurs de l'activation cellulaire.*
Représentation schématique des protéines adaptatrices impliquées dans la régulation négative de l'activation du lymphocyte T. Y: résidus tyrosines, P: résidus prolines.

1.6.1.2 LAX

Le terme LAX signifie « Linker for activation of X cells » où le X désigne une entité cellulaire à être définie. L'ARNm de LAX est détectable au niveau des cellules d'origine hématopoïétique mais surtout dans les lymphocytes T et B. La molécule LAX est une protéine transmembranaire qui migre comme une protéine de 70 kDa malgré un poids moléculaire prédit de 44 kDa, probablement par ce que la molécule contient plusieurs résidus chargés négativement. L'organisation des domaines d'interactions protéine : protéine de LAX montre une grande similarité avec l'organisation de la molécule adaptatrice LAT et ce, malgré une faible homologie de séquence entre ces deux protéines. LAX partage aussi avec LAT un site potentiel de palmitoylation lequel est essentiel à la localisation appropriée de LAT dans les îlots lipidiques. Cependant, LAX ne semble pas localisée au niveau des îlots lipidiques chez les cellules T et n'est pas palmitoylée (Zhu, M., Janssen, E. *et al.*, 2002). Comme d'autres protéines adaptatrices transmembranaires, LAX possède un domaine extracellulaire court de 44 aa et une queue cytoplasmique longue laquelle avoisine les 340 aa. Cette portion intracellulaire compte 10 résidus tyrosine dont 5 sont situés dans des motifs reconnaissables par la protéine adaptatrice Grb2. De plus, l'une de ces 5 tyrosines peut aussi être reconnue par les molécules Gads et p85 (sous-unité régulatrice de la PI3K).

LAX est rapidement phosphorylée sur tyrosine suite à une stimulation de la cellule T via la voie du TCR-CD3. La coexpression de LAX avec les kinases Syk, Lck ou la combinaison Lck et ZAP70 dans des cellules 293T indique que ces kinases peuvent phosphoryler la protéine. Dans un contexte de stimulation CD3 du lymphocyte T, il y a association des molécules Grb2, Gads de même que la sous-unité p85 de la PI3K avec LAX. Dans le lymphocyte T, lorsqu'il y a surexpression de LAX, on observe une inhibition de l'activation des facteurs de transcription NF-AT et AP-1 suite à une stimulation CD3 de la cellule. L'activation de la p38MAPK est aussi inhibée suite à une stimulation combinée CD3 et CD28 de cellules Jurkat qui surexpriment LAX. Ces deux observations concordent avec des études qui suggèrent que l'activation de la p38MAPK contribue à la transcription du gène codant pour IL-2 (Crawley, J. B., Rawlinson, L. *et al.*, 1997).

Du point de vue fonctionnel, il a été déterminé que LAX influence l'activité de la p38MAPK via une interaction avec Grb2, Gads ou la sous-unité p85 de la PI3K puisqu'un mutant incapable de s'associer à ces 3 molécules perd la capacité d'inhiber l'activation de p38MAPK et celle des facteurs de transcription NF-AT et AP-1 (Zhu, M., Janssen, E. *et al.*, 2002). LAX agirait donc en séquestrant les molécules de signalisation normalement associées à LAT. Il est aussi possible que LAX recrute un régulateur négatif à la membrane mais l'identité de la protéine candidate, possiblement une phosphatase, demeure inconnue. Finalement, LAX ne semble pas participer à la mobilisation de calcium dans la cellule T suite à une stimulation par le TCR. Le rôle de LAX dans les cellules B demeure inconnu bien que la stimulation par le BCR induise aussi la phosphorylation de LAX et son association à l'adaptateur Grb2.

1.6.1.3 Gab2

La famille de protéines adaptatrices Gab pour « Grb2-associated binder » comprend 3 membres, Gab1 à 3. L'expression de Gab1 est ubiquiste alors que l'expression des molécules Gab2 et 3 (Wolf, I., Jenkins, B. J. *et al.*, 2002) est plutôt majoritaire dans les tissus d'origine hématopoïétique. Les protéines Gab partagent plusieurs domaines fonctionnels incluant un domaine PH en position N-terminal, plusieurs motifs d'interaction protéine : protéine basés sur des résidus tyrosine et deux séquences riches en prolines situées au centre de la molécule. La première de ces séquences forme un site typique de reconnaissance pour le domaine SH3 des molécules adaptatrices Grb2 et Gads. La seconde séquence de prolines est plutôt caractérisée par une séquence atypique riche en prolines « PXXXXR » potentiellement reconnue par les molécules adaptatrices Grb2 et Gads, elle représente aussi un domaine MBD pour « c-Met receptor Binding Domain » et permet l'association directe de Gab1 avec le récepteur c-Met. Toutefois, chez les molécules Gab2 et Gab3, le MBD ne permet pas l'interaction avec c-Met (Liu, Y. et Rohrschneider, L. R., 2002).

Gab2 est phosphorylée sur tyrosine en réponse à l'activation cellulaire par plusieurs récepteurs de cytokines (IL-2, -3, -15), de facteurs de croissance (GM-CSF, EGF, etc.), par certains récepteurs kinases (c-Kit, Fms) et par les récepteurs d'activation des cellules B et des cellules T (BCR et TCR). Chez la cellule T, on observe aussi la

phosphorylation de Gab2 suite à une stimulation via le co-récepteur CD28. Dans ce type cellulaire, suite à une stimulation par le TCR, la phosphorylation de Gab2 est catalysée principalement par la PTK ZAP-70. La phosphorylation de Gab2 crée plusieurs sites d'associations avec des molécules de signalisation qui contiennent des domaines d'interaction de type SH2 telles PI3K et SHP-2, toutes 2 impliquées dans différents aspects de l'activation du lymphocyte T via le TCR. Des associations entre Gab2 phosphorylée et les molécules LAT, Crk et PLC γ -1 ont aussi été répertoriées (Nishida, K., Yoshida, Y. *et al.*, 1999). L'association de Gab2 avec LAT est une association particulière entre 2 molécules qui ne possèdent pas de domaines d'interaction compatibles. En effet, Gab2 et LAT possèdent toutes deux des sites de reconnaissance basés sur des tyrosines mais aucun domaine qui reconnaît ces sites. Cette association dépend plutôt d'un intermédiaire qui assure le lien entre ces 2 molécules. Le groupe de Yamasaki propose que l'association constitutive entre Gab2 et les protéines adaptatrices Grb2 ou Gads via le domaine MBD de Gab2 est à l'origine du recrutement de Gab2 à l'adaptateur LAT phosphorylé suite à l'activation du lymphocyte T (Yamasaki, S., Nishida, K. *et al.*, 2003).

Chez la cellule T, suite à une stimulation via le TCR, la surexpression de Gab2 inhibe l'activation du promoteur IL-2. Selon les observations du groupe de Pratt, cette fonction inhibitrice semble dépendre i) du domaine PH de Gab2 et ii) de l'association de Gab2 avec la PI3K puisque l'expression d'une molécule Gab2 où le domaine PH a été délété ou l'expression d'une version de Gab2 incapable de se lier à la sous-unité p85 de la PI3K (triple mutant pour les tyrosines contenues dans un motif YXXM reconnu par p85) n'inhibe plus la transcription d'IL-2 suite à une stimulation CD3 de la cellule T (Pratt, J. C., Igras, V. E. *et al.*, 2000). D'autres observations indiquent que l'inhibition de la production d'IL-2 observée suite à une stimulation CD3 dépend surtout de la capacité que montre Gab2 à interagir avec la PTPase SHP2 via une interaction médiée par le domaine SH2 de SHP2. Ensemble ces études suggèrent que la combinaison de l'absence des molécules PI3K, SHP2 et possiblement d'autres molécules inhibitrices est à l'origine de la fonction inhibitrice de Gab2 (Zhao, C., Yu, D. H. *et al.*, 1999; Yamasaki, S., Nishida, K. *et al.*, 2001). Dans ces 2 études, la diminution de la transcription du gène IL-2 découlerait d'une régulation à la baisse de l'activité des facteurs de transcription NF-AT et NF κ B. Cependant, les détails exacts des mécanismes moléculaires à la base de cette inhibition demeurent incertains.

Selon le groupe de Yamasaki, Gab2 pourrait entrer en compétition avec la molécule adaptatrice SLP-76 pour l'association avec Gads. Dans ce modèle, Gab2 servirait à détourner la réponse vers des voies impliquées dans l'inhibition (Gads/Gab2/SHP2) plutôt que celles menant à l'activation (Gads/SLP76/Itk) du lymphocyte T. Ce modèle corrèle aussi avec l'observation selon laquelle l'expression de Gab2 est augmentée après l'activation du lymphocyte T. Ceci indique que le surplus de Gab2 pourrait déplacer SLP-76 de son association avec Gads et ainsi agir dans une boucle de rétrocontrôle. Le comportement des cellules T qui proviennent de souris Gab2^{-/-} confirment un rôle négatif pour la molécule Gab2. En effet, ces cellules T montrent une hyperprolifération en réponse à une stimulation via le TCR.

1.6.1.4 PAG/Cbp

PAG est une protéine adaptatrice transmembranaire récemment découverte dont le nom fait allusion à son association aux « îlots lipidiques » ou GEMs (glycosphingolipid-enriched membrane microdomains), PAG signifie donc « phosphoprotein associated with GEMs » (Brdicka, T., Pavlistova, D. *et al.*, 2000). PAG est aussi connue sous le nom de Cbp pour « Csk binding protein » (Kawabuchi, M., Satomi, Y. *et al.*, 2000). La protéine PAG/Cbp est exprimée dans plusieurs tissus mais surtout au niveau des tissus d'origine hématopoïétique, plus précisément chez les lymphocytes et les monocytes. PAG/Cbp représente une molécule transmembranaire qui comprend un domaine extracellulaire court de 16 aa, une portion transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés suivie d'un site de palmitoylation lequel contribue probablement à l'association de la molécule aux GEMs et une queue cytoplasmique de 397 aa. La portion intracellulaire contient 10 résidus tyrosine dont 9 sont inclus dans des motifs potentiellement phosphorylés par les kinases de la famille Src. Cette région contient aussi 2 séquences riches en prolines probablement reconnues par des domaines d'interaction protéine : protéine de type SH3 présent sur d'autres protéines impliquées dans la signalisation (Kawabuchi, M., Satomi, Y. *et al.*, 2000).

Chez la cellule T, PAG/Cbp est phosphorylée sur tyrosine de manière constitutive. Cette phosphorylation est majoritairement due à l'action de la PTK Fyn (Yasuda, K., Nagafuku, M. *et al.*, 2002) bien que la phosphorylation partielle de PAG/Cbp dans des

cellules T murines déficientes pour l'expression de Fyn indique que d'autres kinases peuvent phosphoryler l'adaptateur transmembranaire. Plusieurs études ont permis de détecter l'association *in vivo* entre l'une des tyrosines phosphorylées de la portion intracellulaire de PAG/Cbp et le domaine SH2 de la kinase Csk, un régulateur négatif de l'activité des PTKs de la famille Src. Les autres tyrosines représentent des sites reconnus par les domaines SH2 de plusieurs autres protéines impliquées dans la signalisation comme la p56Lck, p59Lyn, Shc, Vav, PI3K et ZAP-70. Cependant, jusqu'à présent ces interactions n'ont été observées que dans des conditions de détection *in vitro*. L'activation de la cellule T via le TCR induit la déphosphorylation de PAG/Cbp. Cette déphosphorylation s'effectue rapidement et par la suite, PAG/Cbp est phosphorylée à nouveau dans les 3 à 5 minutes qui suivent la ligation du TCR.

Chez les cellules T, la surexpression de PAG/Cbp correspond à une diminution de l'activité du facteur de transcription NF-AT suite à une stimulation via le TCR. En se basant sur des études de transfection transitoire dans des cellules COS, il a été proposé que le rôle de régulation négative orchestré par PAG dans l'activation lymphocytaire via le TCR provient de sa capacité à recruter Csk à la membrane et plus précisément au niveau des « îlots lipidiques » qui contiennent les kinases de la famille Src (Brdicka, T., Pavlistova, D. *et al.*, 2000). Csk est une enzyme cytoplasmique qui requiert un recrutement à la membrane pour réguler à la baisse l'activité des kinases Src (Chow, L. M., Fournel, M. *et al.*, 1993). Dans une cellule T au repos, le modèle proposé suggère que Csk est maintenue à la membrane et à proximité de son substrat par une interaction entre son domaine SH2 et l'adaptateur membranaire phosphorylé Cbp/PAG (Brdicka, T., Pavlistova, D. *et al.*, 2000; Cary, L. A. et Cooper, J. A., 2000; Kawabuchi, M., Satomi, Y. *et al.*, 2000; Yasuda, K., Nagafuku, M. *et al.*, 2002). Par l'intermédiaire de son domaine SH3, la kinase Csk s'associe à une seconde protéine, la phosphatase PEP (Cloutier, J. F. et Veillette, A., 1999). Ainsi, toutes deux se trouvent engagées dans un complexe avec l'adaptateur Cbp/PAG (Gjorloff-Wingren, A., Saxena, M. *et al.*, 1999; Torgersen, K. M., Vang, T. *et al.*, 2001; Davidson, D., Bakinowski, M. *et al.*, 2003). La proximité du complexe Cbp/PAG:Csk:PEP à la kinase p56Lck activée permet à la kinase Csk de phosphoryler la tyrosine régulatrice de p56Lck, la Y505. Simultanément, la phosphatase PEP parvient à déphosphoryler la tyrosine activatrice de p56Lck, la Y394.

1.7 Protéines dok

Les membres de la famille de protéines adaptatrices dok (downstream of kinases) démontrent une homologie de séquence remarquable entre eux mais très peu d'homologie avec d'autres familles de protéines existantes. Toutefois, les protéines de la famille dok partagent des motifs d'interaction protéine : protéine fréquemment retrouvés chez d'autres familles de protéines adaptatrices impliquées dans la signalisation cellulaire. L'organisation des domaines présents chez les protéines dok rappelle celle d'autres protéines adaptatrices comme IRS-1 (Sun, X. J., Rothenberg, P. *et al.*, 1991), IRS-2, Sin (Alexandropoulos, K., Donlin, L. T. *et al.*, 2003), Gab-1 (Ingham, R. J., Holgado-Madruga, M. *et al.*, 1998), Gab-2 et FRS2 (Kouhara, H., Hadari, Y. R. *et al.*, 1997). Cette structure présente, en N-terminal, un « pleckstrin homology domain » ou domaine PH (figure 7). Ce type de domaine permet l'interaction entre les protéines dok et certains phospholipides retrouvés à la membrane des cellules (Hemmings, B. A., 1997). Ensuite, on retrouve un « phosphotyrosine binding domain » ou domaine PTB central (Wolf, G., Trub, T. *et al.*, 1995) qui reconnaît des résidus tyrosine phosphorylés dans des séquences NxxpY, ces séquences sont distinctes de celles reconnues par le module d'interaction SH2. La portion C-terminale est riche en résidus tyrosine. Lorsque phosphorylées, ces tyrosines sont potentiellement reconnues par des motifs d'interaction protéine : protéine de type SH2. Outre ces résidus tyrosines, la portion C-terminale est aussi riche en motifs PxxP lesquels sont possiblement impliqués dans des interactions de type SH3 (Alexandropoulos, K., Cheng, G. *et al.*, 1995). La présence de ces motifs d'interaction influence probablement la localisation cellulaire de la protéine de même que sa capacité à diriger ou participer à la formation de complexes de signalisation intermoléculaires. Cinq membres de la famille dok ont été répertoriés jusqu'à ce jour (Carpino, N., Wisniewski, D. *et al.*, 1997; Di Cristofano, A., Carpino, N. *et al.*, 1998; Lemay, S., Davidson, D. *et al.*, 2000; Grimm, J., Sachs, M. *et al.*, 2001). Chez l'humain, les protéines dok-1, -2 et -3 sont exprimées dans les cellules hématopoïétiques alors que la présence des protéines dok-4 et dok-5 n'a pas été confirmée. Néanmoins, des études démontrent la présence d'ARNm codant pour les protéines dok-4 et -5 dans certains types cellulaires d'origine myéloïde comme les cellules T humaines et les mégacaryocytes (Di Cristofano, A., Carpino, N. *et al.*,

1998; Favre, C., Gerard, A. *et al.*, 2003). Chez la souris, la protéine dok-4 est exprimée dans plusieurs tissus alors que la protéine dok-5 est surtout exprimée dans les tissus du système nerveux (Grimm, J., Sachs, M. *et al.*, 2001).

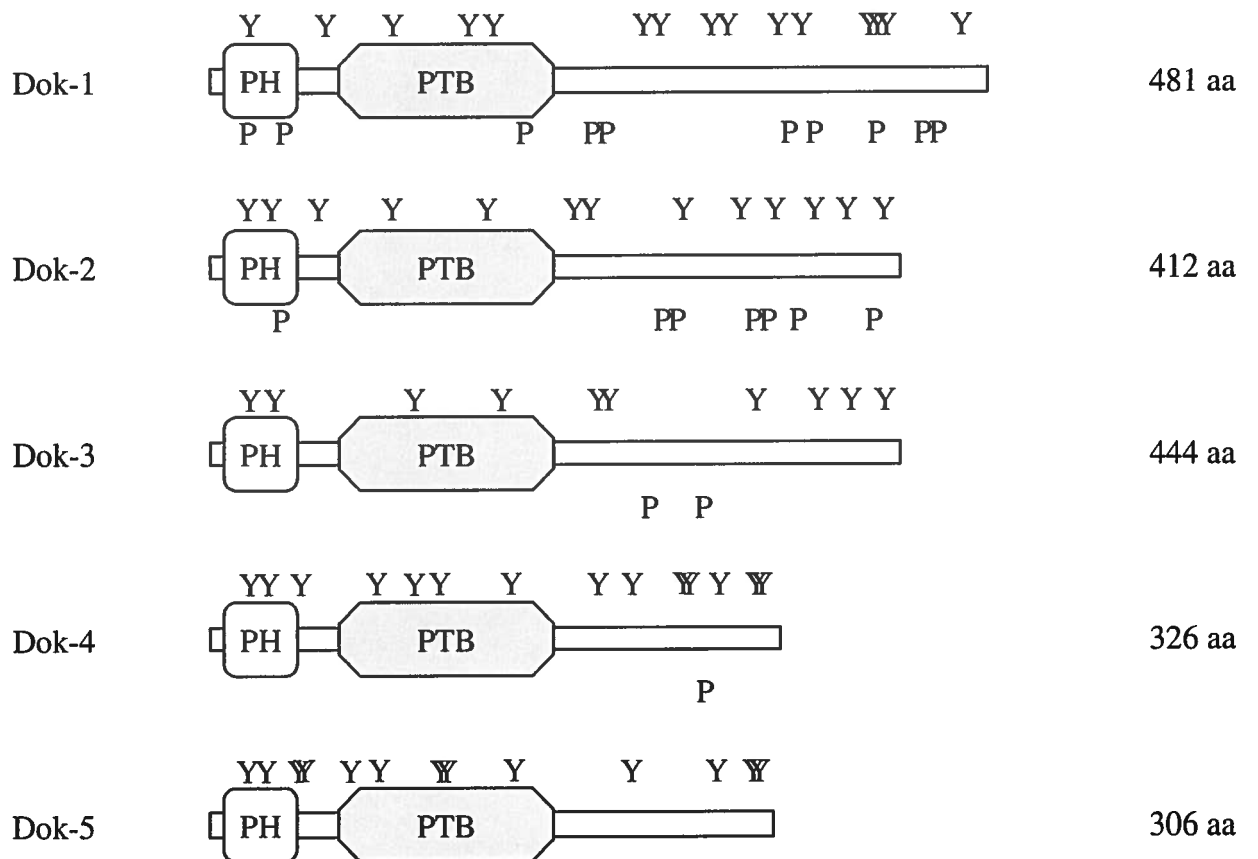


Figure 7 Famille de protéines dok (downstream of kinases). Représentation schématique des différents membres de la famille dok. Y: résidu tyrosine, P: résidu proline.

Tableau I : Protéines de la famille dok

Protéine	PM (kDa)	Partenaires potentiels §	Expression dans les cellules hématopoïétiques chez l'humain
dok-1	62	RasGAP, SHIP1, Nck, PLC γ -1, CrkL, Cas, Smad 3, Smad 4, Csk, Grb-2, SHP-1, Tec, CSFR, SH2D1A, <i>Lyn, Abl, Fgr, Hck, Lyn, Yes, Src, PI3K</i>	Cellules T, B, myéloïdes, mastocytes, monocytes/macrophages
dok-2	56	RasGAP, SHIP1, Nck, Pak, Récepteur Tek/Tie2	Idem à dok-1 sauf les cellules B
dok-3	58-64	Csk, SHIP1	Idem à dok-1 sauf les cellules T
dok-4	34-38	Récepteurs c-Ret et Tek/Tie2	Cellules T
dok-5	34-38	Récepteurs c-Ret et Tek/Tie2	Cellules T, inductible

§ Les interactions mises en évidence uniquement dans un système IN VITRO sont indiquées en italique.

1.7.1 dok-1

La protéine dok-1 aussi nommée p62dok était identifiée, à l'origine, comme une phosphoprotéine de 62 kDa associée à RasGAP dans des fibroblastes transfectés avec la PTK v-Src (Ellis, C., Moran, M. *et al.*, 1990). En 1997, la protéine dok-1 a été purifiée et son gène cloné à partir de cellules progénitrices myéloïdes provenant de patients atteints de leucémie chronique myéloïde (Carpino, N., Wisniewski, D. *et al.*, 1997) ou de précurseurs de cellules B murines transformées par v-Abl (Yamanashi, Y. et Baltimore, D., 1997). Dans les cellules du système immunitaire, dok-1 est exprimée dans les cellules B, les macrophages, les mastocytes et notamment les cellules T (Carpino, N., Wisniewski, D. *et al.*, 1997; Yamanashi, Y. et Baltimore, D., 1997). Il s'agit d'une protéine de 481 aa qui migre comme un doublet à 62-64 kDa sur un gel SDS-PAGE. Dok-1 contient 10 motifs PxxP disséminés au travers de la protéine de même que 15 tyrosines dont 10 sont concentrées dans la région C-terminale de la molécule.

1.7.1.1 Phosphorylation de dok-1

La phosphorylation de dok-1 est une étape commune dans plusieurs systèmes de transduction des signaux et représente une étape clef dans la fonction de la protéine adaptatrice dans différents types cellulaires.

En premier lieu, la phosphorylation de dok-1 est détectable dans des systèmes d'études cellulaires qui évaluent l'activité de kinases souvent impliquées dans la transformation cellulaire. Ainsi, la forme phosphorylée de dok-1 est détectable dans des cellules transfectées avec une variété de kinases activées telles v-Src, Lyn, v-FPS, v-Abl, la p210BcrAbl, etc.. La phosphorylation de dok-1 est aussi détectable dans des systèmes où il y a ligation d'un récepteur qui possède une activité kinase. Cette phosphorylation est observable suite à la ligation de récepteurs tels : EGFR, PDGFR, c-Kit, le récepteur à l'insuline, VEGFR, Tek/Tie2, etc. (Ellis, C., Moran, M. *et al.*, 1990; Ellis, C., Liu, X. Q. *et al.*, 1991; Hosomi, Y., Shii, K. *et al.*, 1994; Carpino, N., Wisniewski, D. *et al.*, 1997; Noguchi, T., Matozaki, T. *et al.*, 1999; Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000).

Dans les cellules du système immunitaire, la phosphorylation de dok-1 est observable suite à la ligation du BCR et de FcγRIIB chez la cellule B. Chez les mastocytes, la ligation de FcεRI et chez les macrophages, la ligation de CSF-R induisent la phosphorylation de dok-1 (Berg, K. L., Siminovitch, K. A. *et al.*, 1999; Abramson, J. et Pecht, I., 2002; Abramson, J., Rozenblum, G. *et al.*, 2003). Chez la cellule T, la phosphorylation de dok-1 est observée suite la ligation des récepteurs d'activation CD2, CD28 et SLAM lesquels induisent l'augmentation de l'activité enzymatique de différentes kinases (Nunes, J. A., Truneh, A. *et al.*, 1996; Klasen, S., Pages, F. *et al.*, 1998; Fukai, I., Hussey, R. E. *et al.*, 2000; Harriague, J., Debre, P. *et al.*, 2000; Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000; Latour, S., Gish, G. *et al.*, 2001; Nemorin, J. G., Laporte, P. *et al.*, 2001).

1.7.1.2 Protéines associées à dok-1

Dans tous ces systèmes, la phosphorylation de dok-1 permet son association avec d'autres protéines de signalisation impliquées dans la transduction des signaux. Dans

le cadre d'études différentes, l'interaction entre la forme phosphorylée de dok-1 et les domaines de type SH2 de molécules impliquées dans différents aspects de la signalisation cellulaire a été détectée. Par exemple, les domaines SH2 des kinases Abl, Fgr, Hck, Lyn, Yes, Src et la sous-unité p85 de PI3K, les enzymes PLC γ -1 et SHIP de même que les molécules CrkL Nck, et RasGAP (van Dijk, T. B., van Den Akker, E. *et al.*, 2000).

1.7.1.3 dok-1 et la p120 RasGAP

La phosphorylation des protéines dok-1 et dok-2 induit leur association avec la p120RasGAP (Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000). La p120RasGAP quant à elle, est reconnue pour son rôle dans la régulation négative de l'activité de la p21ras (voir la section sur les MAPKs). Dans cette optique, il a été suggéré que les protéines dok-1 et dok-2 s'associent à la p120RasGAP afin d'agir comme effecteur de RasGAP, d'orchestrer la relocalisation appropriée de RasGAP ou encore de permettre l'interaction productive entre RasGAP et ses substrats. Des études dans différents systèmes cellulaires indiquent que les protéines dok sont impliquées dans le contrôle de la voie d'activation induite par la p21ras. À l'exception d'une étude qui argumente que l'expression d'une forme mutée de dok-2 parvient toujours à diminuer l'activation des MAPKs malgré l'absence de liaison avec la p120RasGAP (Jones, N. et Dumont, D. J., 1999), la plupart des études, incluant les nôtres, démontrent que l'expression de dok-1 ou dok-2 corrèle avec une diminution de l'activité des MAPKs et une augmentation de la quantité de p120RasGAP à la membrane (Brauweiler, A. M., Tamir, I. *et al.*, 2000; Tamir, I., Stolpa, J. C. *et al.*, 2000; Yamanashi, Y., Tamura, T. *et al.*, 2000; Nemorin, J. G., Laporte, P. *et al.*, 2001; Ott, V. L., Tamir, I. *et al.*, 2002; Abramson, J., Rozenblum, G. *et al.*, 2003). Une autre étude indique plutôt que l'association de dok-1 avec la p120RasGAP inhibe l'activité de RasGAP et active la voie ras donc l'activité des MAPKs (Kashige, N., Carpino, N. *et al.*, 2000). Néanmoins, ensemble ces observations indiquent que les protéines de la famille dok sont impliquées dans le contrôle de la voie induite par la p21ras.

1.7.1.4 Association avec des kinases

L'association de dok-1 avec plusieurs kinases dans différents types cellulaires indique que dok-1 représente un substrat commun ou encore une molécule importante dans la fonction kinase observée dans plusieurs voies de signalisation. On observe ainsi la

formation de complexes stables entre dok-1 et les PTKs des familles Src et Tec (van Dijk, T. B., van Den Akker, E. *et al.*, 2000), toutes deux impliquées majoritairement dans l'activation cellulaire. En effet, nous avons déterminé que le domaine SH2 de la p56Lck peut reconnaître dok-1 phosphorylée sur tyrosine (Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000). De plus, nous avons observé l'association inductible entre Tec et dok-1 via le domaine SH2 de la kinase (Chapitre 4). L'association entre dok-1 et la kinase Csk dans différents types cellulaires a aussi été détectée (Neet, K. et Hunter, T., 1995; Catipovic, B., Schneck, J. P. *et al.*, 1996; Vuica, M., Desiderio, S. *et al.*, 1997). Ces observations suggèrent que dok-1 peut aussi jouer un rôle dans la régulation négative de l'activité des kinases de la famille Src.

1.7.1.5 Association avec des phosphatases

L'association de dok-1 avec des phosphatases a aussi été répertoriée et pourrait représenter un mécanisme d'action additionnel pour la molécule adaptatrice dans la régulation de la signalisation cellulaire. Par exemple, dans des macrophages, Berg et al. (Berg, K. L., Siminovitch, K. A. *et al.*, 1999) montrent une association directe entre la protéine tyrosine phosphatase SHP-1, le récepteur CSFR et dok-1 phosphorylée sur tyrosine. Dans ce système, la phosphorylation constitutive de dok-1 dans des macrophages déficients pour l'expression de SHP-1 corrèle avec la prolifération des macrophages de manière indépendante des facteurs de croissance CSF et M-CSF. Le groupe suggère aussi que SHP-1 arrive à déphosphoryler, du moins en partie, dok-1.

Une autre phosphatase, l'inositol phosphatase SHIP, s'associe à dok-1 dans les cellules B. Dans le modèle proposé par Cambier et al., la ligation du récepteur d'inhibition Fc γ RIIB contribue à la formation de complexes entre les protéines SHIP et dok-1. Selon leur modèle, une stimulation via Fc γ RIIB permet le recrutement de SHIP aux ITIMs du récepteur d'inhibition. SHIP est ensuite phosphorylée sur tyrosine et recrute à son tour la protéine dok-1 via une interaction qui nécessite le domaine PTB de dok-1 (Brauweiler, A. M., Tamir, I. *et al.*, 2000; Tamir, I., Stolpa, J. C. *et al.*, 2000). L'association de SHIP avec dok-1 est aussi observable dans des mastocytes suite à la co-agrégation des récepteurs Fc γ RIIB et Fc ϵ RI (Ott, V. L., Tamir, I. *et al.*, 2002) et dans des cellules T suite à la ligation de la molécule de surface SLAM (Latour, S., Gish, G. *et al.*, 2001).

1.7.1.6 Association avec les molécules Smad

La surexpression de dok-1 dans des cellules B inhibe la prolifération médiée par l'activine, plus précisément, il y a augmentation du taux d'apoptose en réponse à l'activine (Yamakawa, N., Tsuchida, K. *et al.*, 2002). Dans ces conditions, on observe une régulation à la hausse de gènes pro-apoptotiques comme la p21 « cell cycle inhibitor » couplée à une régulation à la baisse de gènes anti-apoptotiques tels bcl-XL et la cycline D2. Puisque les protéines « Smad » sont importantes dans la régulation du promoteur de p21, il a été suggéré que dok-1 soit impliqué dans la régulation de l'activité du promoteur p21 dépendante de Smad 3. Dans ces cellules B, l'interaction entre certains Smads et dok-1 a été détectée. Cette interaction semble dépendre des domaines PH et PTB de dok-1. Selon le modèle suggéré, la compétition entre Smad 3 et dok-1 pour Smad 4 est à l'origine de l'activation du promoteur de p21. Ainsi, la formation de complexes entre Smad 4 et dok-1 dans la cellule au repos empêche l'activation de p21 alors que le traitement avec de l'activine induit la dissociation du complexe Smad 4:dok-1. Ceci favorise alors la formation d'un complexe entre Smad 4 et Smad 3 lequel augmente l'activité de la p21 donc l'induction de l'apoptose. Il est à noter que dans ce contexte-ci, l'activation cellulaire déclenchée via l'activine n'induit pas la phosphorylation de dok-1 mais provoque sa déphosphorylation sur thréonine. Ainsi, dok-1 semble agir comme un régulateur de l'activation du promoteur p21 via son interaction avec les protéines de la famille Smad.

1.7.1.7 Association avec la PLC γ -1

L'association SH2 dépendante de dok-1 avec la PLC γ -1 a été observée et suggère que dok-1 soit impliquée dans la régulation de la mobilisation de calcium (Maa, M. C., Leu, T. H. *et al.*, 1994).

1.7.1.8 Association avec SAP

Par ailleurs, dans des cellules de rein d'embryon humain, des 293T, le groupe de Kieff (Sylla, B. S., Murphy, K. *et al.*, 2000) observe l'association de phospho-dok-1 avec la molécule SH2D1A (SAP), une molécule importante dans la signalisation initiée par SLAM (Sayos, J., Wu, C. *et al.*, 1998; Henning, G., Kraft, M. S. *et al.*, 2001; Latour, S., Gish, G. *et al.*, 2001) et impliquée dans la pathogenèse du syndrome de prolifération lymphoïde lié au chromosome X.

1.7.1.9 Association avec des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette

Plusieurs études ont aussi démontré l'association de dok-1 avec des protéines impliquées dans l'organisation et la régulation du cytosquelette. Ainsi, en surexprimant dok-1 dans des cellules CHO-IR, il a été démontré que dok-1 influence positivement la motilité cellulaire vraisemblablement par le biais des molécules Nck et RasGAP, toutes deux impliquées dans la régulation du cytosquelette dans ces cellules (Noguchi, T., Matozaki, T. *et al.*, 1999). De plus, il a été suggéré que dok-1 agisse comme intermédiaire de liaison entre Nck et la majorité des phosphoprotéines qui y sont associées (p57, p62, p70 et p100) dans certaines situations (Tang, J., Feng, G. S. *et al.*, 1997). Finalement, l'association de dok-1 avec les protéines CrkL et Cas, aussi impliquées dans le réarrangement du cytosquelette, identifie dok-1 comme une pièce importante dans la machinerie cellulaire qui régule le cytosquelette (Martelli, M. P., Boomer, J. *et al.*, 2001; Abramson, J., Rozenblum, G. *et al.*, 2003).

1.7.10 Dimérisation de dok-1

Des études menées par le groupe de Baltimore (Songyang, Z., Yamanashi, Y. *et al.*, 2001) ont démontré que le domaine PTB de dok-1 reconnaît spécifiquement les tyrosines dans la séquence peptidique suivante : Y/MxxNxLpY. Cette séquence se retrouve entre autres au niveau de la phosphatase SHIP1, la kinase Abl, les récepteurs Tie2 et EGFR de même que la tyrosine 146 de dok-1. Ceci indique que, suite à la phosphorylation de cette tyrosine, dok-1 a la possibilité de former un dimère dans la cellule. En effet, une étude menée dans des fibroblastes transformés par la kinase v-Src a confirmé l'importance de la dimérisation de dok-1 dans sa capacité à atténuer l'effet transformant normalement observé (Songyang, Z., Yamanashi, Y. *et al.*, 2001). La séquence reconnue par le domaine PTB de dok-1 encadre aussi la tyrosine 139 de dok-2. Il est donc possible que ces 2 protéines de la même famille forme des hétéro-dimères. La formation d'hétéro-dimères représente une fonction intéressante chez les protéines de la famille dok car cette caractéristique peut représenter un mécanisme de régulation ou un moyen utilisé par 2 protéines adaptatrices afin de recruter différents partenaires de liaison dans un même complexe de protéines. Un tel complexe pourrait cumuler des fonctions enzymatiques ou régulatrices particulières qui serait absentes

dans le cas de complexes protéiques formés à partir d'homo-dimères de dok-1 ou dok-2.

L'inactivation du gène qui code pour la protéine dok-1 ne semble pas affecter de façon importante le développement normal des souris. En effet, ces souris survivent normalement et possèdent une population de cellules hématopoïétiques normale. Cependant, il a été observé que l'absence de l'expression de dok-1 corrèle avec une diminution de la quantité totale d'IgM. L'absence d'un phénotype marqué chez les souris dok-1^{-/-} est possiblement dû à une compensation de la fonction cellulaire de dok-1 réalisée par le 2^e membre de la famille dok, dok-2. En effet, ce deuxième membre possède des caractéristiques semblables à celles de dok-1.

1.7.2 dok-2

Dok-2 est aussi nommée p56dok, FRIP (interleukine Four Receptor Interacting Protein) et dok-R (dok Related). Plus petite que dok-1, cette protéine de 412 aa migre comme un doublet de 54-56 kDa. Elle contient 13 tyrosines et 6 motifs PxxP. Le patron d'expression tissulaire de dok-2 est semblable à celui de dok-1 à l'exception des cellules B où l'ARNm de dok-2 n'est pas détecté. La phosphorylation sur tyrosine de cette protéine est observée entre autres suite à l'action des récepteurs protéine tyrosine kinases comme Tek/Tie2 (Jones, N. et Dumont, D. J., 1998; Jones, N., Chen, S. H. *et al.*, 2003) en réponse à l'angiopoïétine (Master, Z., Jones, N. *et al.*, 2001), l'EGFR (Jones, N. et Dumont, D. J., 1999), le récepteur à l'insuline et les récepteurs de cytokines IL-2,-3,-4 (Nelms, K., Snow, A. L. *et al.*, 1998). On observe aussi sa phosphorylation suite à l'action de kinases telles Bcr-Abl, Lyn, Src et Hck dans des systèmes cellulaires transformés et finalement, dans les cellules T, via les récepteurs d'activation CD2 (Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000) et SLAM (Latour, S., Gish, G. *et al.*, 2001). Dans la majorité des cas, la phosphorylation de dok-2 entraîne aussi son association à la p120RasGAP. De plus, selon le système à l'étude, plusieurs protéines impliquées dans la signalisation ont été identifiées comme étant des partenaires associées à dok-2 phosphorylée sur tyrosine (voir tableau I).

Une étude menée par Master et al (Master, Z., Jones, N. *et al.*, 2001) sur des cellules endothéliales montre que l'association entre le récepteur kinase Tek/Tie2 et dok-2 peut être induite suite à la stimulation du récepteur Tek/Tie2. Ils observent aussi la formation d'un complexe dok-2/Nck/Pak recruté au niveau du récepteur Tek/Tie2 lors de sa stimulation avec l'angiopoïétine. Leurs observations indiquent que dok-2 orchestre la modulation de la motilité cellulaire induite par une stimulation du récepteur Tek/Tie2 via son interaction avec les protéines Nck, Pak et même la p120RasGAP toutes 3 impliquées dans le remodelage du cytosquelette. L'association de dok-2 avec les molécules Nck et p120RasGAP a été répertoriée à plusieurs reprises dans d'autres systèmes cellulaires et confirme l'implication de dok-2 dans la régulation du cytosquelette et possiblement celle de la voie Ras, respectivement (Nelms, K., Snow, A. L. *et al.*, 1998; Jones, N. et Dumont, D. J., 1999; Lock, P., Casagrande, F. *et al.*, 1999; Master, Z., Jones, N. *et al.*, 2001; Gugasyan, R., Quilici, C. *et al.*, 2002).

L'expression de dok-2 est inductible dans les macrophages suite à une stimulation par les facteurs de croissance M-CSF et GM-CSF ou par la cytokine IL-3. De plus, la surexpression de dok-2 régule négativement la prolifération des macrophages en réponse à ces mêmes cytokines. En se basant sur ces résultats, Suzu et al suggèrent que dok-2 exerce un rétrocontrôle négatif dans ce système (Suzu, S., Tanaka-Douzon, M. *et al.*, 2000). Dans le même ordre d'idées, à l'aide de souris irradiées et reconstituées avec de la moelle osseuse « infectée » avec un rétrovirus qui contient la séquence de dok-2 (Gugasyan, R., Quilici, C. *et al.*, 2002), on observe que l'expression constitutive de dok-2 dans des précurseurs myéloïdes interfère avec le développement des cellules T au niveau de la production et de la différenciation des thymocytes. Leurs observations au niveau de la prolifération induite par les cytokines IL-3, GM-CSF, M-CSF et SCF confirment celles de Suzu et al. chez les macrophages.

1.7.3 dok-3

Dok-3 est exprimée majoritairement dans les cellules d'origine hématopoïétique. Cependant, contrairement aux deux premiers membres de la famille dok, dok-3 ne possède pas de motifs appropriés permettant son association à RasGAP. Dok-3 migre comme un doublet entre 58 et 62 kDa sur un gel SDS-PAGE. L'ARNm de dok-3 est

déTECTABLE dans les tissus suivants : la moelle osseuse, la rate, les poumons et dans les cellules hématopoïétiques, plus précisément on note une forte expression de la protéine dans les cellules B, les macrophages, les mastocytes et les cellules souches hématopoïétiques. Par opposition aux autres membres de la famille (dok-1, -2, -4 et -5) l'ARNm de dok-3 n'est pas présent dans les cellules T. Des études ont démontré que dok-3 est phosphorylée sur tyrosine suite à l'action transformante de v-Abl dans des fibroblastes murins NIH 3T3 (Cong, F., Yuan, B. *et al.*, 1999). Aussi, la phosphorylation de dok-3 dans des cellules B est induite après une stimulation du BCR ou de FcγRI dans le macrophage. Dans les cellules B, la phosphorylation de dok-3 induit son association avec les molécules inhibitrices SHIP et Csk (Lemay, S., Davidson, D. *et al.*, 2000). La surexpression de la molécule dans les cellules B corrèle avec une diminution de l'activité du facteur de transcription NF-AT et de la production de cytokines. Dans les cellules NIH3T3, la surexpression de dok-3 correspond à une diminution de l'activité des MAPKs induites par v-Abl ainsi qu'une inversion du phénotype transformé normalement observé dans ces cellules transfectées avec v-Abl.

1.7.4 dok-4

Dok-4 représente l'une des deux plus récentes protéines de la famille à être découverte. Chez l'humain, l'ARNm codant pour cette protéine est détecté principalement dans les tissus du cœur, des muscles, du foie et du petit intestin et en faibles quantités au niveau des poumons. De plus, l'ARNm de dok-4 est absent des tissus d'origine hématopoïétique à l'exception des cellules T et des cellules mégacaryocytes (Di Cristofano, A., Carpino, N. *et al.*, 1998; Favre, C., Gerard, A. *et al.*, 2003). Chez la souris, l'ARNm de dok-4 est détectable dans les mêmes tissus mais cette fois-ci, l'ARNm de dok-4 est aussi détecté dans les tissus nerveux. Chez la souris, la protéine dok-4 est aussi exprimée dans les tissus nerveux (Grimm, J., Sachs, M. *et al.*, 2001). Tout comme dok-3 cette protéine ne possède pas de tyrosines dans des motifs aptes à permettre l'association avec la p120RasGAP. Contrairement aux protéines dok-1 et dok-2, dok-4 ne peut s'associer à la protéine Nck. Par des études du type de double hybride dans la levure, il a été démontré que dok-4 peut interagir avec les récepteurs d'activation c-Ret et Tek/Tie2. En fusionnant le domaine

intracellulaire de dok-4 au domaine extracellulaire et transmembranaire de EGFR, il a été démontré que dok-4 peut induire le branchement axonal de cellules PC12 (Grimm, J., Sachs, M. *et al.*, 2001). De plus, l'activation de cette construction induit la phosphorylation des MAPKs de même que la transactivation du facteur de transcription Elk-1. Cette étude suggère donc un rôle positif à dok-4 dans la signalisation dans le neurone.

1.7.5 dok-5

Chez l'humain l'ARNm codant pour dok-5 n'est détectable que dans les tissus du cerveau, du cœur et des muscles avec une faible expression au niveau des reins et des cellules T activées dans la périphérie (Favre, C., Gerard, A. *et al.*, 2003). Chez la souris, contrairement à dok-4, l'ARNm codant pour dok-5 de même que la protéine dok-5 ne sont détectables que dans les tissus nerveux (Grimm, J., Sachs, M. *et al.*, 2001). Dans des cellules neuronales, après phosphorylation sur tyrosine, dok-5 ne montre aucune association aux protéines p120RasGAP et Nck. Des protéines de fusion de dok-5, analogues à celles décrites plus haut pour dok-4, se comportent de la même manière que les protéines de fusions de dok-4 ce qui suggère que dok-5 puisse aussi agir comme régulateur positif de la signalisation chez le neurone.

2 Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Némorin JG, Duplay P. Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling.
J Biol Chem. 2000 May 12; 275(19):14590-7. PubMed PMID: 10799545.

2.1 Mise en contexte de l'article 1

Cet article concerne l'identification de substrats de p56Lck outre ZAP-70 et les ITAMs. Le but était de démontrer que l'apport de p56Lck dans l'activation du lymphocyte T ne se limitait pas à l'activation de ZAP-70 (Weil, R., Cloutier, J.F. *et al.*, 1995). Notre hypothèse se basait, entre autres, sur une étude menée par Wong et al (Wong, J., Straus, D. *et al.*, 1998) où une PTK Syk constitutivement activée a été transfectée dans des cellules T déficientes pour l'expression de la PTK Lck, les cellules J.CaM1.6. Cette étude indique clairement que la PTK Syk activée parvient à rétablir des éléments proximaux de réponse cellulaire tels que la phosphorylation de SLP-76 et de Vav. Néanmoins, l'expression de Syk activée dans les cellules J.CaM1.6 ne rétablit pas certains éléments distaux de la réponse cellulaire comme l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation des lymphocytes T, CD69 ou l'induction du gène IL-2. Une autre étude de co-transfection dans des JCaM1.6 illustre que la présence de la p56Lck est essentielle à la signalisation médiée par ZAP-70. Ici, l'expression d'une version modifiée de ZAP-70 ciblée à la membrane artificiellement parvient à induire l'activation du facteur de transcription NF-AT uniquement lorsqu'il y a expression de la kinase p56Lck. Spécifiquement, la présence des domaines SH2 et SH3 de p56Lck sont requis (Yamasaki, S., Takamatsu, M. *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent donc qu'il existe vraisemblablement des substrats additionnels pour la PTK p56Lck. La difficulté dans l'identification des substrats de p56Lck provient du contexte d'activation de l'enzyme qui implique invariablement l'activation de plusieurs autres kinases, compliquant ainsi la découverte de substrats spécifiques de Lck.

Les objectifs spécifiques de cet article concernent :

- i) L'utilisation d'un système d'activation de la PTK p56Lck de manière indépendante du TCR. Ceci dans le but de mettre en évidence des substrats phosphorylés par l'action exclusive de la PTK Lck.
- ii) La caractérisation des événements biochimiques déclenchés suite à la phosphorylation de ces substrats.
- iii) L'identification d'une voie d'activation physiologique du lymphocyte T qui induit la phosphorylation de ces substrats.

ARTICLE!:

EVIDENCE THAT LCK-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF p56dok AND p62dok MAY PLAY A ROLE IN CD2 SIGNALING.

Jean-Guy Némorin et Pascale Duplay

Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

La kinase Lck est impliquée dans la signalisation déclenchée par la ligation de plusieurs récepteurs à la surface des cellules T, par exemple le complexe TCRJCD3 et les co-récepteurs CD2 et CD28. L'activation concomitante de plusieurs protéines tyrosines kinases suite à la stimulation via ces récepteurs complique l'identification de substrats spécifiques à l'activité enzymatique de Lck. Nous avons donc développé un système dans lequel l'activation de Lck est indépendante de la ligation du complexe TCRJCD3. Nous montrons que l'activation d'une chimère EGFR/Lck induit la phosphorylation spécifique de la p120RasGAP et de deux protéines associées à la p120RasGAP, les protéines p56(dok) et p62(dok). L'activation de la chimère corrèle avec une augmentation de la mobilisation de calcium intracellulaire en absence de la phosphorylation de ZAP-70 et de la PLC γ -1. De plus, nous observons que p62(dok) co-précipite avec la chimère activée EGFR/LckF505 et que les protéines dok phosphorylées sur tyrosine sont reconnues par le domaine SH2 de Lck *in vitro*. De plus, nous démontrons que l'activation cellulaire via le récepteur accessoire CD2 et non pas via le complexe TCRICD3 induit la phosphorylation de p56(dok) et p62(dok). Avec des cellules JCaM1.6, nous démontrons que la phosphorylation CD2 dépendante de p56(dok) et p62(dok) requiert la présence de Lck. Nous proposons que la phosphorylation de p56(dok) et p62(dok) par Lck de même que leur association SH2-dépendante joue un rôle dans la transduction de signaux déclenchée par les récepteurs accessoires de la cellule T.

Article publié dans: *The Journal of Bio/ologica/ Chemist1y*, 2000; 275(19): 14590-7

3 p62dok NEGATIVELY REGULATES CD2 SIGNALING IN JURKAT CELLS

3.1 mise en contexte de l'article II

Ayant identifié 2 membres de la famille dok comme substrats de Lck, nous nous sommes concentrés sur le rôle joué par les molécules de la famille dok dans un contexte d'activation lymphocytaire. Spécifiquement, l'identification du rôle de dok-1 dans la signalisation induite par une activation CD2 de la cellule T. Lorsque nous avons débuté ce travail, dok-1 était perçu comme un régulateur négatif dans certains systèmes cellulaires. À titre d'exemple, dans le cadre de plusieurs études dans les cellules B, dok-1 est impliquée dans la régulation négative de l'activation cellulaire médiée par FcγRIIB (Tamir, I., Stolpa, J. C. *et al.*, 2000; Yamanashi, Y., Tamura, T. *et al.*, 2000). Par opposition, des études dans un modèle de réponse à l'insuline suggèrent plutôt un rôle de régulation positive pour dok-1 dans le contrôle de la migration en réponse à l'insuline (Noguchi, T., Matozaki, T. *et al.*, 1999). De plus, bien que la phosphorylation de dok-1 suite à une stimulation CD2 ou CD28 avait déjà été répertoriée (Klasen, S., Pages, F. *et al.*, 1998; Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000), des études fonctionnelles de dok-1 dans un modèle de cellule T n'avaient jamais été entreprises.

L'objectif du deuxième article:

- i) L'évaluation de l'impact de la surexpression de dok-1 au niveau de certaines voies de transduction induites par une stimulation CD2 dans des cellules T Jurkat.

ARTICLE II :

p62dok NEGATIVELY REGULATES CD2 SIGNALING IN JURKAT CELLS.

Jean-Guy Némorin, Pierre Laporte, Geneviève Bérubé et Pascale Duplay

Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

La protéine p62dok appartient à un groupe de protéines adaptatrices récemment identifié. Les protéines p56dok et p62dok représentent les 2 membres de cette famille qui sont majoritairement exprimés dans les cellules T. Une stimulation via CD2 ou CD28 et non pas par le complexe TCR/CD3 peut induire la phosphorylation des protéines p56dok et p62dok. Afin d'étudier l'importance de p62dok dans la fonction des cellules T, nous avons généré des clones Jurkat qui surexpriment p62dok. Nos résultats indiquent que la surexpression de p62dok dans des cellules T Jurkat régule négativement la signalisation induite lors d'une stimulation via le récepteur CD2. L'inhibition orchestrée par p62dok affecte plusieurs événements biochimiques induits par la ligation de CD2 tels l'augmentation de calcium intracellulaire, l'activation de la phospholipase C γ -1 et l'activation des MAPK (ERK1/2). Ces événements cellulaires ne sont pas affectés lors de la signalisation déclenchée par la ligation du complexe TCR/CD3. Cependant, la surexpression de p62dok inhibe l'activation du facteur de transcription NF-AT et la sécrétion d'IL-2 suite à une stimulation CD2 ou CD3. De plus, nous montrons que la stimulation de la cellule T via CD2 et non pas CD3 induit le recrutement membranaire de p62dok et de la p120RasGAP. Ces résultats suggèrent que p62dok régule négativement plusieurs aspects de la signalisation induite par CD2. Nous proposons donc que p62dok représente un régulateur négatif important dans la modulation de la réponse cellulaire déclenchée par le TCR.

Article publié dans : *The Journal of Immunology*, 2001, 166:4408-4415.

p62^{dok} Negatively Regulates CD2 Signaling in Jurkat Cells¹

Jean-Guy Némorin, Pierre Laporte, Geneviève Bérubé, and Pascale Duplay²

p62^{dok} belongs to a newly identified family of adaptor proteins. In T cells, the two members that are predominantly expressed, p56^{dok} and p62^{dok}, are tyrosine phosphorylated upon CD2 or CD28 stimulation, but not upon CD3 ligation. Little is known about the biological role of Dok proteins in T cells. In this study, to evaluate the importance of p62^{dok} in T cell function, we generated Jurkat clones overexpressing p62^{dok}. Our results demonstrate that overexpression of p62^{dok} in Jurkat cells has a dramatic negative effect on CD2-mediated signaling. The p62^{dok}-mediated inhibition affects several biochemical events initiated by CD2 ligation, such as the increase of intracellular Ca²⁺, phospholipase C γ 1 activation, and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. Importantly, these cellular events are not affected in the signaling cascade induced by engagement of the CD3/TCR complex. However, both CD3- and CD2-induced NF-AT activation and IL-2 secretion are impaired in p62^{dok}-overexpressing cells. In addition, we show that CD2 but not CD3 stimulation induces p62^{dok} and Ras GTPase-activating protein recruitment to the plasma membrane. These results suggest that p62^{dok} plays a negative role at multiple steps in the CD2 signaling pathway. We propose that p62^{dok} may represent an important negative regulator in the modulation of the response mediated by the TCR. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 4408–4415.

Dok proteins belong to a newly identified family. Their overall structure suggests that they might serve as docking proteins for signaling molecules. They contain an amino-terminal pleckstrin homology domain (PH),³ a central phosphotyrosine binding domain (PTB), and a carboxyl-terminal domain rich in proline and tyrosine residues. The lowest sequence similarity between the members of the family resides in the carboxyl terminus, suggesting that this region is involved in the recruitment of different sets of downstream signaling molecules. The first member identified, p62^{dok}, was originally shown to be a target of activated protein tyrosine kinases and, when phosphorylated, to associate with Ras GTPase-activating protein (RasGAP) (1). p62^{dok} was subsequently cloned from a p210^{bcr-abl}-transformed myeloid cell line (2) and a v-Abl-transformed precursor B cell line (3). Two other members, p56^{dok} (4–7) and dok-3 (8, 9), have been characterized.

In T cells, p62^{dok} and p56^{dok} are expressed (10), whereas dok-3 is absent in thymus and in most T cell lines examined (9). Little information is available on the biological function of these proteins in T cells. Recent evidence suggests that they play a specific role in signal transduction pathways initiated by costimulatory receptors. The phosphorylation of p62^{dok} has been reported to occur following CD2 (10) or CD28 stimulation (11), whereas CD3 stimulation does not induce p62^{dok} phosphorylation. Phosphorylation of the other Dok member, p56^{dok}, seems to be regulated in the same way since we have shown that it is phosphorylated upon CD2

stimulation and not upon CD3 stimulation (10). Several lines of evidence support the conclusion that Src family kinases phosphorylate Dok proteins. Cell adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Dok is mediated by Src tyrosine kinases (12). We have shown that Lck is required for CD2-mediated phosphorylation of Dok proteins (10). In transient transfection assays, Dok proteins are good substrates for Src family kinases (9). Phosphorylation of p56^{dok} by Lyn generates binding sites for RasGAP and Nck (7). Depending on the transduction pathway examined, Dok proteins can act as a positive or negative regulator. In B cells, phosphorylation of p62^{dok} is involved in the Fc γ RIIB-mediated inhibition of B cell receptor signaling (13, 14) most likely by negatively regulating the activity of Ras (15), thereby inhibiting the Ras-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2) (13, 14). By contrast, transient overexpression of p62^{dok} in 293 cells (8) and in Chinese hamster ovary cells expressing insulin receptors (12) has been reported to have no effect on v-abl-dependent and insulin-dependent mitogen-activated protein kinase activation, respectively. Moreover, overexpression of p62^{dok} enhances cell migration in response to insulin. p56^{dok} has been reported to be a negative regulator of the Ras activation pathway. Transient overexpression of p56^{dok} diminishes the IL-2-induced activation of mitogen-activated protein kinase and AP-1 (5). The lowered p56^{dok} expression in *hr/hr* T cells induces an increase of T cell proliferation in response to cytokine and TCR stimulation (5).

In this study, to gain insight into the mechanisms involved in Dok function in T cells, we examined the role of p62^{dok} in regulating T cell signaling. We studied the effect of p62^{dok} overexpression on CD2- and CD3-mediated signal transduction events in Jurkat cells. We demonstrate that overexpression of p62^{dok} specifically inhibits CD2-mediated phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) phosphorylation, Erk1/2 activation, and Ca²⁺ mobilization, and that these events remain unaffected when initiated via the CD3/TCR complex.

Materials and Methods

Cell lines and Abs

Jurkat cells, clone 77-6, were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, penicillin, and streptomycin. Puromycin at 1 μ g/ml was added to the medium when required.

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

Received for publication August 30, 2000. Accepted for publication January 30, 2001.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada.

² Address correspondence and reprint requests 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 address: pascal.duplay@inrs-iaf.quebec.ca

³ Abbreviations used in this paper: PH, pleckstrin homology; DAG, diacylglycerol; Erk, extracellular signal-regulated kinase; HA, hemagglutinin; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; PTB, phosphotyrosine binding domain; RasGAP, Ras GTPase-activating protein; SH, Src homology; TK, thymidine kinase.

mAbs used included: anti-CD3 ϵ UCHT1 (IgG2a; kindly provided by A. Alcover, Institut Pasteur, Paris, France); anti-CD2 (anti-T11-2 and T11-3, kindly provided by E. Reinherz, Harvard Medical School, Boston, MA); anti-RasGAP (B4F8; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-phosphotyrosine (4G10; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY); and anti-PLC γ 1 (a mixture of mAbs; Upstate Biotechnology). Polyclonal Abs used included: anti-p62^{dok} PTB directed against p62^{dok} PTB domain (produced by immunizing rabbits with a GST fusion protein bearing residues 152–259); anti-p62^{dok} directed against aa residues 425–439 of p62^{dok} (kindly provided by B. Stillman, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY); phospho-specific anti-Erk1/2 (Promega, Madison, WI); and total anti-Erk1/2 (New England Biolabs, Beverly, MA).

Plasmids and transfections

The plasmid pSR α -dok was generated by cloning an EcoRI fragment corresponding to the human p62^{dok} cDNA (kindly provided by B. Stillman, Cold Spring Harbor, NY) into the plasmid pSR α puromycin. The hemagglutinin (HA)-p62^{dok} construct (pSR α -HA-dok) was generated as follows. The first methionine residue of p62^{dok} was deleted by PCR and cloned into the plasmid MT073 (kindly provided by M. Thome, Institut de Biochimie, Epalinges, Switzerland) in frame with the sequence encoding the HA epitope. The HA-p62^{dok} was then subcloned into the plasmid pSR α puromycin. J.77-6 cell line was transfected with 20 μ g of pSR α -HA-dok or pSR α -dok by electroporation using a Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA) set at 250 mV and 960 μ F. Drug-resistant cells were cloned by limited dilution in puromycin-containing medium. Expression levels of p62^{dok} were evaluated by immunoblotting of cell extracts with anti-p62^{dok}. Expression levels of CD2 and CD3 were evaluated by flow cytometric analysis with an EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Clones expressing similar levels of CD3 and CD2 compared with the parental Jurkat cells were kept for further studies. To quantify the amounts of p62^{dok} expressed in the transfectants, we performed serial dilution of p62^{dok} immunoprecipitates. After Western blotting with p62^{dok} Abs, the ECL signal was quantified using Kodak Image Station 440cf to acquire the image and the 1D Image Analysis software.

Measurement of intracellular Ca²⁺

Cells were washed twice with HBSS and incubated at 10⁷ cells/ml with 3 μ M Indo-1 (Molecular Probes, Eugene, OR) and 0.4 mg/ml Pluronic acid F-127 (Molecular Probes) for 25 min at room temperature. Cells were washed in HBSS and resuspended at 10⁶ cells/ml, and Ca²⁺ mobilization studies were conducted on an EPICS ELITE ESP cell sorter (Coulter Electronics). Cells were stimulated with anti-CD3 ϵ mAbs (UCHT1, 1/1000 dilution of ascites) or the anti-CD2 mAb pair T11-2 + T11-3 (1/1000 dilution of ascites). Successful loading with Indo-1 was confirmed by subsequently treating the cells with 1 μ M ionomycin. Violet/blue ratio signals were analyzed using the MultiTime software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

Immunoprecipitations and immunoblotting

Cells were washed twice in RPMI 1640 and resuspended at 5 $\times$ 10⁷ cells/ml in RPMI 1640. Cells were left unstimulated or stimulated with anti-CD3 ϵ (UCHT1 at 1/500 dilution of ascites) or anti-CD2 (a combination of T11-2 and T11-3 at 1/1000 dilution of ascites) for the indicated times. Cells were harvested and solubilized for 30 min at 4°C in 1% Nonidet P-40 containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 1 mM EGTA in the presence of inhibitors of proteases and phosphatases (10 μ g/ml leupeptin and aprotinin, 1 mM Pefabloc-sc, 50 mM NaF, 10 mM Na₂P₂O₇, and 1 mM NaVO₄). Immunoprecipitations and immunoblotting were performed as described previously (10).

Subcellular fractionation

Cells were washed twice in RPMI 1640 and resuspended at 5 $\times$ 10⁷ cells/ml in RPMI 1640. Cells were left unstimulated or stimulated with anti-CD3 ϵ (UCHT1 at 1/500 dilution of ascites) or anti-CD2 (a combination of T11-2 and T11-3 at 1/1000 dilution of ascites) for the indicated times. To determine p62^{dok} and RasGAP cellular redistribution, cells were fractionated into cytosolic and membrane fractions, as described (16). Both fractions were immunoprecipitated with either anti-p62^{dok} or anti-RasGAP Abs.

Luciferase assays

Jurkat cells (10⁶ cells) were transfected with 2.5 μ g NF-AT-firefly luciferase (kindly provided by O. Acuto, Institut Pasteur) and 0.5 μ g thymidine kinase (TK)-Renilla luciferase constructs (Promega, Madison, WI) using Eugene transfection assays (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada).

For transient overexpression of p62^{dok}, 1 μ g of pSR α -dok or empty vector was used in combination with 1.5 μ g NF-AT-firefly luciferase and 0.5 μ g TK-Renilla luciferase constructs. After 24 h, 3 $\times$ 10⁵ cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 or soluble anti-CD2 Abs for 6 h in a 24-well plate. Maximal stimulation was obtained by a combination of PMA (10 ng/ml) and ionomycin (1 μ M). Cells were then lysed and assayed for luciferase activity using the dual luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI) and a luminometer (Berthold, LUMAT LB 9507). The NF-AT-firefly luciferase values were normalized based on the constitutive Renilla luciferase activity.

IL-2 assays

A total of 10⁵ Jurkat cells was stimulated by plate-bound anti-CD3 ϵ mAb (50 μ l of UCHT1 at 1/100 dilution of ascites in PBS), soluble anti-CD2 (a combination of T11-2 and T11-3 at 1/1000 dilution of ascites), or PMA (10 ng/ml) and ionomycin (1 μ M) for 20 h in 96-well plates. Fifty microliters of supernatant were assayed for IL-2 production using the IL-2 dependent cell line CTLL-2, as described previously (17). ³H incorporation was assessed on a liquid scintillation counter (MicroBeta Trilux).

Results

Overexpression of p62^{dok} does not affect CD2- or CD3-induced tyrosine phosphorylation

To evaluate the importance of p62^{dok} in T cell function, we stably transfected Jurkat cells with an expression vector containing an unmodified or an HA-tagged version of p62^{dok}. Drug-resistant clones overexpressing p62^{dok} were identified by immunoblotting of total cell lysates with anti-p62^{dok} Abs (data not shown). Clones were also tested for expression of CD2 and CD3 cell surface molecules, and those expressing levels comparable with that of the Jurkat parental cell line were kept for further study (data not shown). Three representative clones (clones 2, 74, and HA-1), shown in Fig. 1, that express at least 2.5 times more p62^{dok} than the parental Jurkat cells were subsequently characterized for their signaling capacity.

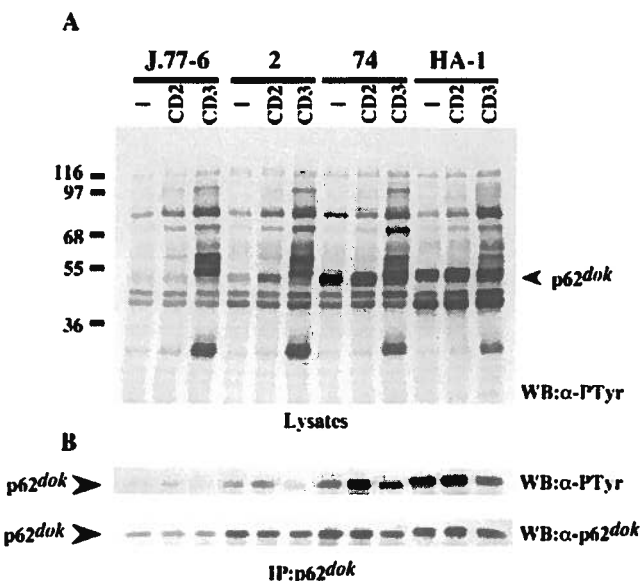


FIGURE 1. Effects of p62^{dok} overexpression on CD2- or CD3-induced tyrosine phosphorylation. *A*, Total cell lysates from the Jurkat T cell line, J.77-6, and from Jurkat cells overexpressing p62^{dok} (clones 2 and 74) or an HA-tagged version of p62^{dok} (HA-1) were analyzed by phosphotyrosine immunoblotting. Cells were left unstimulated (–) or stimulated with an anti-CD2 mAbs pair for 3 min or anti-CD3 mAbs for 1 min. *Left*, Positions of molecular mass markers are shown in kilodaltons. *B*, The indicated Jurkat cells were treated as above. The corresponding lysates were immunoprecipitated with anti-p62^{dok} PTB Abs and analyzed by immunoblotting with either anti-phosphotyrosine mAbs or anti-p62^{dok} Abs, as indicated.

We investigated whether overexpression of p62^{dok} altered the patterns of tyrosine phosphorylation of cellular proteins following either CD3 or CD2 cross-linking (Fig. 1A). Phosphorylation patterns remained unaffected in CD3-stimulated cells in clones overexpressing p62^{dok}, indicating that p62^{dok} overexpression did not noticeably prevent the activation of CD3-mediated tyrosine phosphorylation pathways. CD2 stimulation led to the phosphorylation of a similar set of proteins in all the clones, with the exception of a 62-kDa protein, which is hyperphosphorylated in clones overexpressing p62^{dok}. We have previously shown that CD2 stimulation of Jurkat cells induces tyrosine phosphorylation of p62^{dok} (10). To ascertain that the 62-kDa band corresponded to p62^{dok}, p62^{dok} immunoprecipitations were performed from the different Jurkat clones that were left unstimulated, CD2 stimulated, or CD3 stimulated, and were analyzed by anti-phosphotyrosine immunoblotting (Fig. 1B). As expected, CD2 stimulation of the parental Jurkat cell line and clones that overexpress p62^{dok} led to an increased phosphorylation of p62^{dok}. In contrast, CD3 stimulation did not induce p62^{dok} phosphorylation. It should be noted that there is a higher basal level of p62^{dok} phosphorylation in unstimulated clones overexpressing p62^{dok} compared with the parental Jurkat cells. The increase in constitutively phosphorylated p62^{dok} correlates with the levels of p62^{dok} expressed in these clones. Therefore, overexpression of p62^{dok} does not seem to affect the constitutive phosphorylation of p62^{dok}.

Effect of p62^{dok} overexpression on Ras signaling

To assess the role of p62^{dok} in the Ras signaling pathway, we examined whether p62^{dok} overexpression interferes with the activation of Erk1/2 following CD2 or CD3 engagement (Fig. 2A). To monitor the activation of Erk1/2, we used Abs specific for the phosphorylated form of Erk1/2. As shown in Fig. 2, phospho-Erk1/2 induction after CD3 stimulation was similar in all clones, indicating that CD3-induced Erk1/2 activation was not inhibited by p62^{dok} overexpression. In contrast, there was a decrease in CD2-mediated Erk1/2 activation in p62^{dok}-overexpressing clones. The intensity of this inhibitory effect correlated with the levels of p62^{dok} overexpression, as evidenced by a greater decrease in CD2-induced Erk1/2 phosphorylation in clone 74 and HA-1 when compared with clone 2. Moreover, the inhibition of CD2-induced Erk1/2 phosphorylation could be rescued by PMA (Fig. 2B). These results show that p62^{dok} overexpression selectively inhibits CD2- but not CD3-mediated activation of Erk1/2.

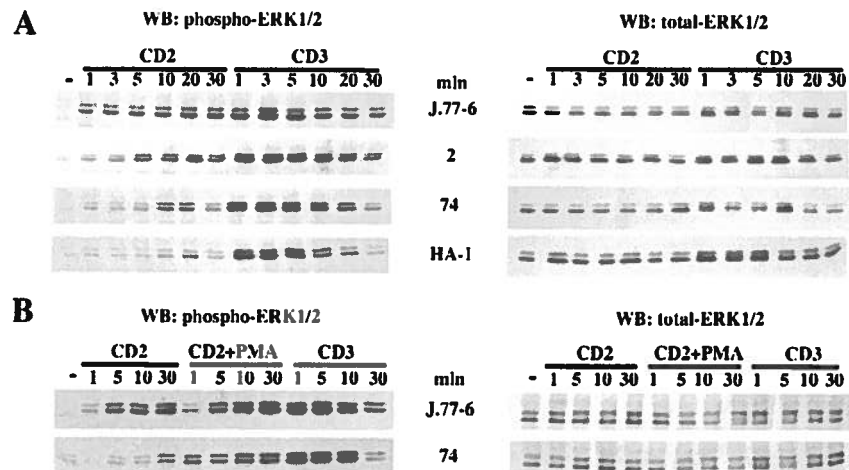
Overexpression of p62^{dok} inhibits CD2-induced Ca²⁺ mobilization

We evaluated the effect of p62^{dok} overexpression on Ca²⁺ mobilization after CD2 and CD3 stimulation. In Fig. 3, we show that Ca²⁺ mobilization after CD3 stimulation was unaltered in all cell lines, regardless of p62^{dok} expression levels. In contrast, the CD2-induced Ca²⁺ response was abolished or greatly diminished in clones overexpressing p62^{dok}. Inositol 3,4,5-triphosphate-mediated mobilization of Ca²⁺ requires the activation of PLCγ1. Since tyrosine phosphorylation of PLCγ1 contributes to the activation of the enzymatic activity of PLCγ1, we next investigated whether PLCγ1 tyrosine phosphorylation is affected by p62^{dok} overexpression after CD2 or CD3 stimulation (Fig. 4). After CD3 stimulation, PLCγ1 was highly phosphorylated in all cell lines tested. However, there was a slight decrease in the phosphorylation levels of PLCγ1 after CD2 stimulation when we compared clones 2 and 74 with the control J.77-6 cells. More importantly, PLCγ1 phosphorylation was abolished after CD2 stimulation of the HA-1 cell line. The decreased or absence of phosphorylation of PLCγ1 in p62^{dok}-overexpressing cells might be, at least in part, responsible for the diminished Ca²⁺ influx following CD2 stimulation.

p62^{dok} overexpression interferes with IL-2 gene expression

The activation of signaling pathways initiated by engagement of the CD3/TCR or the CD2 receptor leads to IL-2 production in Jurkat cells. We examined whether p62^{dok} overexpression would influence IL-2 production. Jurkat clones were left unstimulated or stimulated by anti-CD3, anti-CD2 Abs, or by PMA and ionomycin. After 24 h, the culture supernatants were assayed for IL-2 production (Fig. 5A). Activation of the different clones by PMA and ionomycin resulted in equivalent levels of IL-2 production, indicating that p62^{dok} overexpression did not alter the capacity of the cells to produce IL-2. CD2 stimulation of p62^{dok}-overexpressing clones led to significantly reduced levels of IL-2 production compared with the parental cell line. This result was expected given that IL-2 gene expression is dependent on Ca²⁺ mobilization and Erk1/2 activation. The inhibition of CD2-induced IL-2 secretion seems to correlate with the amount of p62^{dok} present in the cells. Surprisingly, PMA restored CD2-induced IL-2 secretion (Fig. 5A). In the clones 74 and HA-1, CD3-induced IL-2 secretion was decreased, whereas CD3-induced IL-2 production in the clone 2 was comparable with that of the parental cell line.

FIGURE 2. CD2-mediated Erk1/2 activation is inhibited by p62^{dok} overexpression. **A**, Jurkat cells (J.77-6) and p62^{dok}-overexpressing cells (clones 2, 74, and HA-1) were left unstimulated (–) or stimulated with an anti-CD2 mAbs pair or anti-CD3 mAbs for the indicated amounts of time. Total cell lysates were immunoblotted with anti-phospho Erk1/2 Abs (*left*). Equivalent levels of Erk1/2 protein in each lane were evaluated by probing the membranes with anti-total Erk1/2 Abs (*right*). **B**, Jurkat cells J.77-6 and clone 74 were left unstimulated (–) or stimulated with anti-CD2 or anti-CD3 mAbs, a combination of anti-CD2 mAbs and PMA (10 ng/ml), for the indicated amounts of time. Total cell lysates were immunoblotted as in **A**. WB, Western blot.



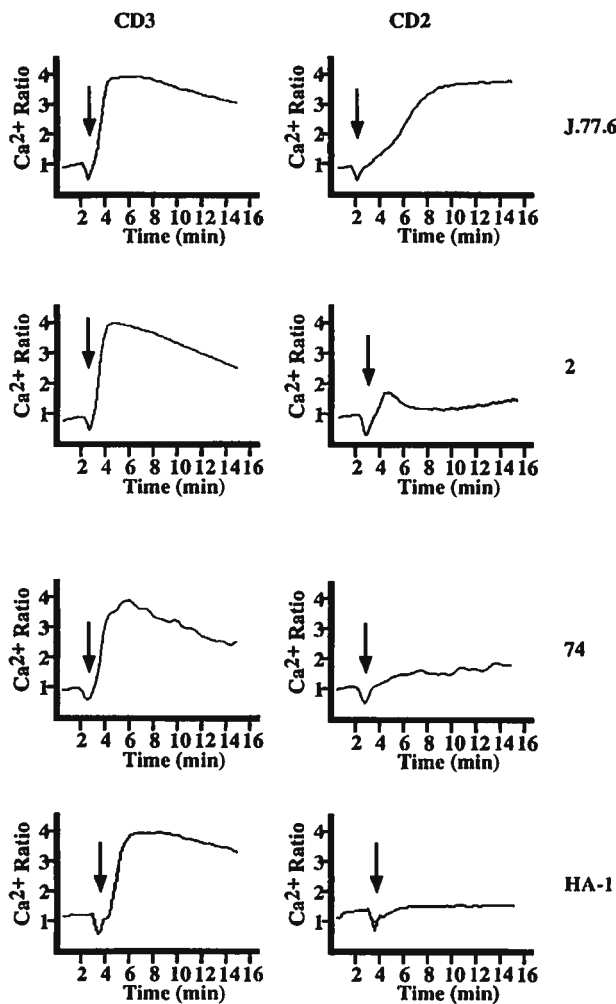


FIGURE 3. Calcium mobilization upon CD2 cross-linking is impaired in $p62^{dok}$ -overexpressing cells. Jurkat T cells (J.77-6) and the indicated $p62^{dok}$ -overexpressing cells were loaded with indo-1, and calcium mobilization was assessed following CD2 or CD3 stimulation of the cells at the times indicated by an arrow.

To study in greater detail the mechanisms involved in the inhibition of CD3- and CD2-induced IL-2 secretion in clones overexpressing $p62^{dok}$, we examined the effect of $p62^{dok}$ overexpression on the activation of transcription factors known to regulate IL-2 gene expression. The control Jurkat cell line as well as clones overexpressing $p62^{dok}$ were transiently transfected with luciferase reporter constructs under the control of NF-AT (Fig. 5B). Cells were left unstimulated, or stimulated by anti-CD3 or anti-CD2 Abs or PMA and ionomycin for 6 h. The activation of NF-AT was evaluated by a luciferase activity assay. $p62^{dok}$ overexpression inhibited CD2-induced activation of NF-AT (Fig. 5B). Moreover, the intensity of the inhibition correlates with the levels of $p62^{dok}$ expressed in the cells. We observed a 5- and 15-fold decrease in NF-AT activation for clones 2 and clones 74 and HA-1, respectively. These results were confirmed by performing transient transfection assays with plasmids containing $p62^{dok}$ cDNA and the NF-AT luciferase reporter construct. Transient overexpression of wild-type $p62^{dok}$ or HA-tagged $p62^{dok}$ inhibited (2- to 3-fold) CD2-induced NF-AT activation (Fig. 5C).

As shown in Fig. 5D, PMA increases NF-AT activity upon CD2 stimulation in both wild-type Jurkat cells and cells overexpressing $p62^{dok}$. However, overexpression of $p62^{dok}$ considerably inhibited

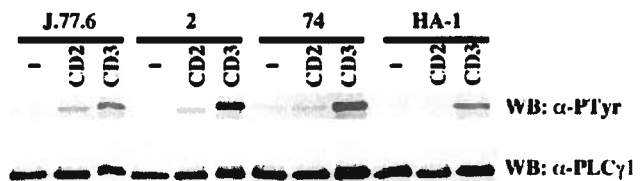


FIGURE 4. CD2-induced PLC γ 1 phosphorylation is reduced in $p62^{dok}$ -overexpressing cells. Jurkat cells (J.77-6) and the indicated $p62^{dok}$ -overexpressing cells were left unstimulated (–) or stimulated with an anti-CD2 mAb for 3 min or anti-CD3 mAbs for 1 min. Lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-PLC γ 1 mAbs and immunoblotted with anti-phosphotyrosine. The membrane was stripped and reprobed with anti-PLC γ 1 to evaluate total PLC γ 1 protein levels in the immunoprecipitates.

NF-AT activation in response to CD2 and PMA when compared with the parental cell line. The NF-AT activity in clone HA-1 following treatment with anti-CD2 and PMA is similar to the CD3-induced NF-AT activity in wild-type cells. This result might, at least partially, explain why CD2-induced IL-2 secretion is restored in presence of PMA in clones overexpressing $p62^{dok}$. NF-AT activation requires the cooperative binding between NF-AT and AP-1 to the IL-2 promoter NF-AT site. NF-AT nuclear translocation is mediated by the Ca^{2+} -regulated phosphatase calcineurin, whereas the synthesis and activation of Fos and Jun, components of the AP-1 family of transcription complexes, are mediated by the protein kinase C (PKC)/Ras pathway. Therefore, the inability of PMA treatment to rescue CD2-induced NF-AT activity is most likely due to the absence of Ca^{2+} mobilization in these clones. As expected, in cells overexpressing $p62^{dok}$, restoration of Ca^{2+} flux by treatment with ionomycin is not sufficient to rescue the CD2-induced NF-AT activation, which is partly dependent on Erk1/2 activation. In contrast, treatment with PMA and ionomycin restored CD2-mediated activation of NF-AT in these cells (Fig. 5E). This indicates that $p62^{dok}$ overexpression does not lead to nonspecific CD2-mediated inhibition of NF-AT activity.

We were surprised to find that $p62^{dok}$ overexpression interfered with CD3-induced NF-AT activation given that $p62^{dok}$ overexpression does not seem to affect Ca^{2+} response and Erk1/2 activation (Fig. 5B). The CD3-induced activation of NF-AT was only slightly reduced in clone 2, whereas there was a marked decrease in CD3-mediated NF-AT activation in clones 74 and HA-1 (2-, 6-, and 28-fold decrease in NF-AT activation for clones 2, 74, and HA-1, respectively). Therefore, as shown for CD2 stimulation, the $p62^{dok}$ -mediated inhibition of CD3-induced NF-AT activation is dependent on the level of Dok overexpression. The inhibition of CD3-induced NF-AT activation can be bypassed by treatment with PMA and calcium ionophore used in combination, but not alone. We have shown that the CD3-mediated Ca^{2+} response is not affected in clones overexpressing $p62^{dok}$ (Fig. 3). These data clearly suggest that there is a difference between anti-CD3 Abs and Ca^{2+} ionophore with respect to Ca^{2+} mobilization. Moreover, CD3-mediated activation of Erk1/2 activation seems normal in clones overexpressing $p62^{dok}$ (Fig. 2). Therefore, in these clones, PMA treatment most likely compensates for a defective component that is required in the NF-AT activation pathway and is downstream or independent of Erk1/2 activation. In addition, in wild-type Jurkat cells, CD3 stimulation or CD2 stimulation further increased NF-AT activity induced by the combination of PMA and ionomycin. Therefore, compared with antireceptor stimuli, the pharmacological stimuli PMA and ionomycin may utilize an additional Ras-independent pathway, which leads to NF-AT activation. These results underline the complexity of the regulation of NF-AT activation. Additional experiments will be required to elucidate the

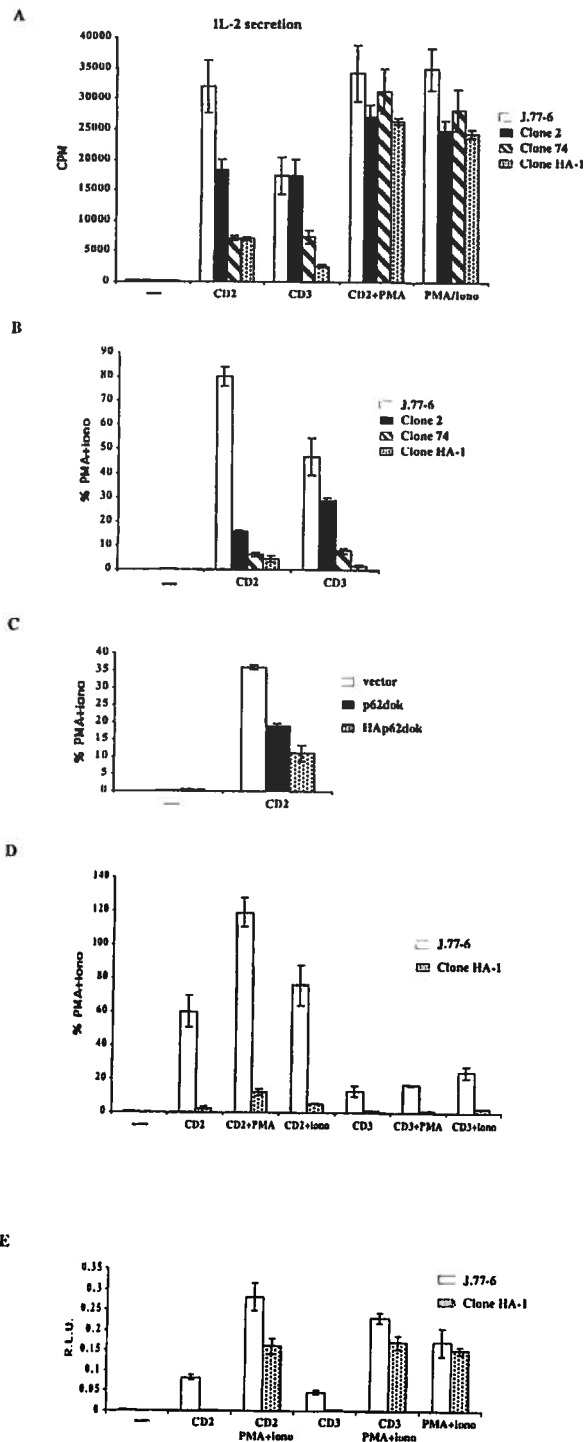


FIGURE 5. p62^{dok} overexpression inhibits IL-2 secretion and NF-AT induction. **A**, The indicated Jurkat cells were left unstimulated (—) or stimulated with anti-CD2 or anti-CD3 mAbs, a combination of anti-CD2 mAbs and PMA (10 ng/ml), or a combination of PMA (10 ng/ml) and ionomycin (iono; 1 μ M). Supernatants were collected after 20 h for determination of IL-2 titers, as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in at least three experiments. **B**, Jurkat cells were transfected with 2.5 μ g NF-AT-firefly luciferase and 0.5 μ g TK-*Renilla* luciferase constructs. After 24 h, cells were left unstimulated or stimulated with anti-CD2 or anti-CD3 mAbs. Cells were harvested and luciferase activity was measured. The results were expressed as a percentage of fold induction relative to maximal luciferase induction induced by treatment with PMA (10 ng/ml) and ionomycin (1 μ M). This experiment was repeated in triplicate in three independent experiments with similar results. **C**, Jurkat cells,

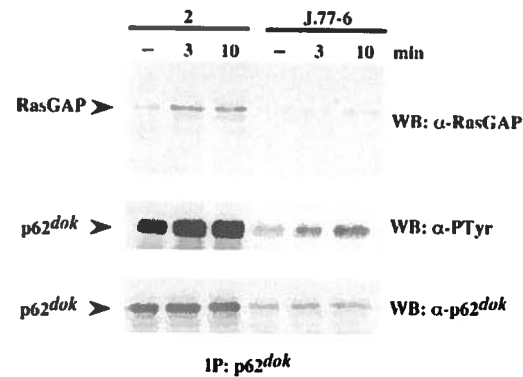


FIGURE 6. Amounts of RasGAP associated with p62^{dok}. Parental Jurkat cells (J.77-6) and cells overexpressing p62^{dok}, clone 2, were left unstimulated (—) or stimulated with an anti-CD2 mAbs pair for 3 min or 10 min, as indicated. Lysates were immunoprecipitated with anti-p62^{dok} and immunoblotted with anti-RasGAP mAbs, anti-phosphotyrosine mAbs, or anti-p62^{dok} Abs, as indicated. WB, Western blot.

mechanisms by which p62^{dok} mediates inhibition of CD3-induced activation of NF-AT.

Membrane localization and interaction of p62^{dok} with RasGAP following CD2 stimulation

p62^{dok} binding to the Src homology 2 (SH2) domain of RasGAP requires p62^{dok} phosphorylation, and RasGAP is known to be an important negative regulator of Ras. Therefore, Dok-mediated inhibition of Ras signaling might occur through its interaction with RasGAP. To test this hypothesis, we compared the amount of RasGAP associated with p62^{dok} in clones overexpressing p62^{dok} and in the parental cell line. Lysates from cells that were left unstimulated or stimulated with anti-CD2 mAbs for 3 and 10 min were immunoprecipitated with anti-p62^{dok} Abs. CD2 stimulation resulted in an increase in the amount of RasGAP associated with Dok in cells overexpressing Dok and in the parental cell line (Fig. 6). Importantly, the amount of RasGAP associated with p62^{dok} correlates with the amount of phosphorylated p62^{dok} in the cells (Fig. 6).

Several pieces of evidence suggest that p62^{dok} phosphorylation depends on its subcellular localization and occurs at the plasma membrane (12, 14). We therefore tested whether p62^{dok} overexpression would increase the amount of membrane-bound p62^{dok} and, consequently, would alter the subcellular localization of RasGAP. We performed subcellular fractionation on the parental Jurkat cells and cells overexpressing p62^{dok} that were left unstimulated, CD2 stimulated, or CD3 stimulated (Fig. 7). In all the cell lines, the majority of p62^{dok} was found in the soluble fraction (Fig.

J.77-6, were transfected with 1 μ g of pSR α -dok (p62^{dok}) or pSR α -HA-dok (HA-p62dok) or empty vector (vector) in combination with 1.5 μ g NF-AT-firefly luciferase and 0.5 μ g TK-*Renilla* luciferase constructs. Luciferase activity was measured as above and expressed as percentages of maximal stimulation (PMA plus ionomycin). **D** and **E**, The indicated Jurkat cells were left unstimulated (—) or stimulated with anti-CD2 or anti-CD3 mAbs or PMA (10 ng/ml) or ionomycin (1 μ M) used alone or in combination, as indicated. Luciferase assays were performed as in **B**. Luciferase activity after treatment of cells with PMA or ionomycin alone was comparable with luciferase activity in unstimulated cells. **D**, Data are expressed as percentages of maximal stimulation (PMA plus ionomycin). **E**, Data are normalized based on the constitutive *Renilla* luciferase activity and are presented as relative luminescence units (R.L.U.).

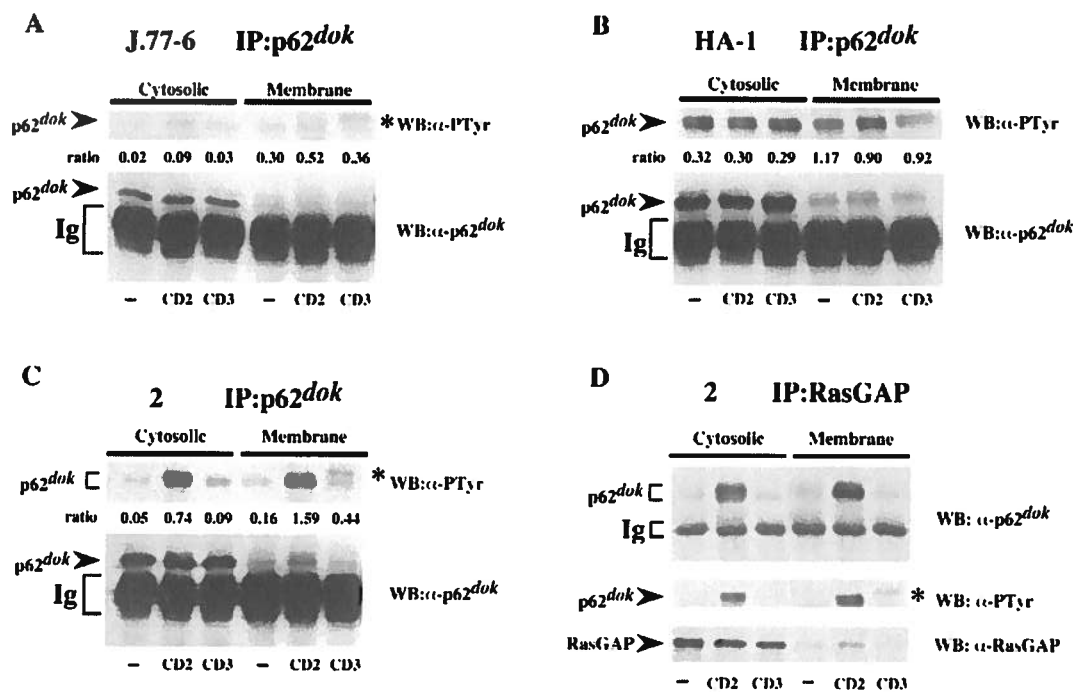


FIGURE 7. Phospho-p62^{dok} and RasGAP are recruited to the membrane following CD2 stimulation. Jurkat J.77-6 cells (**A**) or clone HA-1 cells (**B**) or clone 2 cells (**C**) were left unstimulated (–) or stimulated with an anti-CD2 mAbs pair for 3 min or anti-CD3 mAbs for 1 min. Cells were lysed in a hypotonic buffer using a Dounce homogenizer. Lysates were fractionated into cytosolic and membrane fractions and were immunoprecipitated with anti-p62^{dok} PTB. p62^{dok} immunoprecipitates were immunoblotted with either anti-phosphotyrosine mAbs or anti-p62 Abs, as indicated. The relative proportion of phosphorylated p62^{dok} at each stimulation condition and cytofraction was calculated by normalizing the phosphotyrosine signal to the amount of precipitated protein, and the ratio of these two signals is presented. Ratios in **A** and **B** were calculated from the same blots, whereas ratios presented in **C** were from a different experiment. **D**, Lysates from clone 2 cells were fractionated, as described above. RasGAP immunoprecipitates were subjected to anti-p62^{dok}, anti-phosphotyrosine, and anti-RasGAP immunoblotting, as indicated. The band indicated by an asterisk corresponds to phosphorylated ZAP-70 associated with CD3 and is due to stimulating CD3 mAbs that bind to protein A during the immunoprecipitation. WB, Western blot.

7A–C). The amount of membrane-bound p62^{dok} in clones overexpressing p62^{dok} was significantly higher than in the parental cell line. However, the percentage of total p62^{dok} present in the membrane fraction in unstimulated cells did not change significantly with varying levels of p62^{dok}. There was a slight increase in the total amount of p62^{dok} in the particulate fraction after CD2 stimulation, whereas CD3 stimulation did not alter the localization of p62^{dok}. The relative proportion of phosphorylated p62^{dok} at each stimulation condition and cytofraction was calculated by normalizing the phosphotyrosine signal to the amount of precipitated protein, and the ratio of these two signals is presented in Fig. 7. These data clearly show that in all the clones, the percentage of phosphorylated p62^{dok} was higher in the membrane fraction than in the cytosolic fraction at each stimulation condition. These results indicate that the phosphorylation of p62^{dok} is mainly occurring at the membrane or that once phosphorylated, p62^{dok} is preferentially recruited to the membrane.

To analyze the effect of CD2 stimulation on RasGAP subcellular distribution, we performed subcellular fractionation. As reported previously, we found that the majority of RasGAP was present in the cytosol (Fig. 7D). As shown for p62^{dok}, CD2 stimulation induced the translocation of RasGAP to the plasma membrane, whereas CD3 stimulation had no effect on RasGAP subcellular localization. Altogether, these results suggest that recruitment of RasGAP to the membrane following CD2 stimulation is mediated by tyrosine-phosphorylated Dok present at the membrane.

Discussion

In this study, we analyzed the effect of p62^{dok} overexpression on the signal transduction pathways initiated by CD2 or CD3 cross-linking. We showed that p62^{dok} overexpression interferes with

CD2- and CD3-induced IL-2 expression in Jurkat cells. In contrast, overexpression of p62^{dok} specifically inhibits CD2-mediated PLCγ1 phosphorylation, Erk1/2 activation, and Ca²⁺ mobilization, whereas these events remain unaffected when initiated via the CD3/TCR complex.

Our finding that overexpression of Dok affects PLCγ1 phosphorylation upon CD2 stimulation indicates that p62^{dok} functions early in the signal transduction cascade initiated via CD2. Activation of PLCγ1 requires several targeting signals for its recruitment to the plasma membrane, where its substrate, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, is found. SH2-mediated interaction of PLCγ1 with linker for activation of T cells (18) and binding of its PH domain to the phosphoinositide 3-kinase products, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate molecules in the membrane, represent two important steps for PLCγ1 activation (19, 20). In addition, tyrosine phosphorylation of PLCγ1 is required for complete stimulation of its enzymatic activity and is most likely mediated by the tyrosine kinase Itk (21, 22). The Gads/SLP-76 complex recruited by linker for activation of T cells also plays an important role for PLCγ1 activation (23, 24). p62^{dok} overexpression may interfere with the formation of any of these signaling complexes. Additional experiments are required to define the molecular basis of p62^{dok} involvement in PLCγ1 activation.

Importantly, we found that Dok-mediated inhibition of PLCγ1 phosphorylation, Erk1/2 activation, and Ca²⁺ mobilization correlates with phosphorylation of specific tyrosine residues that are phosphorylated upon CD2 cross-linking. Indeed, although the amount of tyrosine-phosphorylated p62^{dok} is higher in unstimulated or CD3-stimulated clones 74 and HA-1 than in CD2-stimulated clone 2, there is no inhibition of CD3-mediated PLCγ1

phosphorylation, Erk1/2 activation, and Ca²⁺ mobilization in these clones. Therefore, if phosphotyrosine residues are involved in CD2-mediated inhibition of PLC γ 1, Erk1/2, and/or Ca²⁺ mobilization, these tyrosine residues are specifically phosphorylated upon CD2 stimulation and are different from those that are constitutively phosphorylated.

Since PLC γ 1 is a critical regulator of Ca²⁺ mobilization, defect in PLC γ 1 activation is a likely cause of the impaired Ca²⁺ response in clones overexpressing p62^{dok}. However, we cannot exclude the possibility that overexpression of Dok may directly interfere with Ca²⁺ mobilization downstream of inositol 3,4,5-triphosphate production.

The inhibition of Erk1/2 activation following CD2 stimulation in clones overexpressing p62^{dok} may also be secondary to defective induction of PLC γ 1 activation and diacylglycerol (DAG) production. DAG, a product of PLC γ 1, activates PKC, which in turn stimulates Erk1/2 via the Ras/Raf pathways (25). Consistent with a role of PKC-mediated Erk1/2 activation, PMA rescued CD2-induced IL-2 secretion and Erk1/2 activation in clones overexpressing Dok (Figs. 5A and 2A). Since the contribution of PKC activation in the CD2 regulation of Erk1/2 activity has not been studied, it is not possible to discriminate whether p62^{dok} acts in CD2 signaling upstream of PKC or acts on a CD2-induced Erk1/2-activating pathway independent of PKC.

The recently described Ras-guanine nucleotide exchange factor, RasGRP, has been shown to be involved in CD3-induced Ras activation (26, 27). DAG binding to RasGRP can recruit RasGRP to the membrane and thereby promote Ras signaling. Although the importance of RasGRP in the regulation of CD2-induced Ras activation is unknown, impaired production of DAG in clones overexpressing p62^{dok} might be in part responsible for the decrease in Ras-mediated Erk1/2 activation.

Ras function is negatively regulated by RasGAP, which stimulates the GTPase activity of Ras (28). In addition, RasGAP binds to tyrosine-phosphorylated p62^{dok} via an SH2-mediated interaction (2, 3). Therefore, RasGAP was a good candidate for mediating the negative effect conducted by p62^{dok} in the Ras/Erk1/2 signaling pathway. We have shown that there is a specific recruitment of RasGAP to the plasma membrane following CD2 stimulation and not CD3 stimulation. Moreover, the relocalization of RasGAP is mediated by phosphorylated p62^{dok}. Although it was recently reported using an in vitro assay that p62^{dok} binding to RasGAP diminished its catalytic activity (29), recruitment of RasGAP in the proximity of Ras is likely to have a global negative effect on Ras function. In addition, binding of p62^{dok} to RasGAP might induce a conformational change that exposes domains of RasGAP (such as SH3) to binding partners. This would allow RasGAP to undergo additional protein interactions that might be important in Dok-mediated functions.

Surprisingly, we find that IL-2 secretion and NF-AT activation induced by CD3 cross-linking are inhibited by p62^{dok} overexpression. The level of inhibition correlates with the amount of p62^{dok} overexpression. The inhibition of CD3-induced IL-2 expression might be related to the increased amount of tyrosine-phosphorylated p62^{dok} present in clones overexpressing p62^{dok}. Alternatively, but not exclusively, other structural elements of p62^{dok} might be responsible for Dok-mediated effects on CD3-induced IL-2 secretion. Activation of Erk1/2 is required, but not sufficient for NF-AT induction (30). Since we have shown that CD3-induced Erk1/2 activation is not affected by overexpression of p62^{dok}, p62^{dok} may inhibit the Rac-regulated pathway involved in the regulation of NF-AT induction (31). In unstimulated cells, the amount of membrane-bound p62^{dok} in clones overexpressing p62^{dok} is significantly higher than in the parental cell line. Our current data do

not allow us to distinguish whether CD3-mediated inhibition of NF-AT activation takes place in the cytosol or/and in the membrane. In any case, it is important to point out that CD2 stimulation, and not CD3 stimulation, specifically increases tyrosine phosphorylation and induces membrane translocation of p62^{dok}. Therefore, the involvement of p62^{dok} in the signaling cascade initiated by CD2 is likely to be different from that initiated by CD3.

Our data support a model in which phosphorylation of p62^{dok} following CD2 engagement enables its translocation from the cytosolic to the membrane compartment. Activation of phosphoinositide 3-kinase upon CD2 stimulation (32, 33) is likely to be involved in the PH domain-dependent recruitment of p62^{dok} to the membrane (12). Recently identified CD2-binding proteins (34–36) might also regulate CD2-mediated p62^{dok} membrane localization. Once at the membrane, p62^{dok} is in the proximity of various protein tyrosine kinases, such as Lck, thereby allowing phosphorylation of tyrosine sites that act as SH2 acceptor sites for downstream signaling molecules such as RasGAP. p62^{dok}-mediated RasGAP recruitment to the proximity of Ras leads to the accumulation of RasGDP and consequently to the down-regulation of CD2-mediated Erk1/2 activation. Although this model takes into account the p62^{dok}-mediated Ras inhibition, other molecules are likely to be recruited by p62^{dok} and involved in Dok-mediated inhibition of PLC γ 1. To identify such molecules, we have tested the co-association of p62^{dok} with inhibitory molecules such as Csk, SH2-containing inositol 5'-phosphatase-1, or -2, but were not able to detect any significant interactions (data not shown).

Maximal phosphorylation of p62^{dok} occurred 10 min following CD2 stimulation and remained high for 30 min (data not shown). This slow time course supports a model in which p62^{dok} could be considered a hinge molecule that comes into play to down-regulate CD2-mediated activation signals. Although originally described as a receptor delivering stimulatory signals to the cell upon ligand binding (37), CD2 has also been described as a molecule capable of transducing inhibitory signals (38–40). Since p62^{dok} is clearly involved in the negative regulation of B cell signaling mediated by Fc γ RIIB (13, 14), p62^{dok} might be considered as a key molecule involved in the modulation of the response mediated by the TCR and the B cell receptor.

In conclusion, p62^{dok} is a multifunctional adaptor protein that most likely plays a negative role at multiple steps in the CD2 signaling pathway. Better insight into the molecules recruited by p62^{dok} will help to identify the molecular mechanisms involved in Dok-mediated inhibition of T cell signaling.

Acknowledgments

We thank Drs. O. Acuto, A. Alcover, B. Stillman, M. Thome, and E. Reinherz for providing reagents. We also thank Dr. K. Gehring for critical reading of this manuscript.

References

- Ellis, C., M. Moran, F. McCormick, and T. Pawson. 1990. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 343:377.
- 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.
- Yamanashi, Y., and D. Baltimore. 1997. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell* 88:205.
- Jones, N., and D. J. Dumont. 1998. The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R. *Oncogene* 17:1097.
- Nelms, K., A. L. Snow, L. J. Hu, and W. E. Paul. 1998. FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation. *Immunity* 9:13.
- 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.

7. Lock, P., F. Casagrande, and A. R. Dunn. 1999. Independent SH2-binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase-activating protein and Nck. *J. Biol. Chem.* 274:22775.
8. Cong, P., 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.
9. 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.
10. Nemorin, J. G., and P. Duplay. 2000. Evidence that *lck*-mediated phosphorylation of p56d_{ok} and p62d_{ok} may play a role in CD2 signaling. *J. Biol. Chem.* 275:14590.
11. Yang, W. C., M. Ghiotto, B. Barbarat, and D. Olive. 1999. The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling. *J. Biol. Chem.* 274:607.
12. Noguchi, T., T. Matozaki, K. Inagaki, M. Tsuda, K. Fukunaga, Y. Kitamura, T. Kitamura, K. Shii, Y. Yamanashi, and M. Kasuga. 1999. Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. *EMBO J.* 18:1748.
13. 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.
14. Tamir, I., J. C. Stolpa, C. D. Helgason, K. Nakamura, P. Bruhns, M. Daeron, and J. C. Cambier. 2000. The RasGAP-binding protein p62d_{ok} is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity* 12:347.
15. Yoshida, K., Y. Yamashita, A. Miyazato, K. Ohya, A. Kitanaka, U. Ikeda, K. Shimada, T. Yamanaka, K. Ozawa, and H. Mano. 2000. Mediation by the protein tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1. *J. Biol. Chem.* 275:24945.
16. Park, S., and R. Jove. 1993. Tyrosine phosphorylation of Ras GTPase activating protein stabilizes its association with p62 at membranes of v-Src transformed cells. *J. Biol. Chem.* 268:25728.
17. Eivovold, B. D., S. G. Williams, B. L. Hsu, S. Buus, and P. M. Allen. 1992. Complete dissection of the IIB(64–76) determinant using T helper 1, T helper 2 clones, and T cell hybridomas. *J. Immunol.* 148:347.
18. Bubeck-Wardenburg, J., R. Pappu, J. Y. Bu, B. Mayer, J. Chernoff, D. Straus, and A. C. Chan. 1998. Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 9:607.
19. Falasca, M., S. K. Logan, V. P. Lehto, G. Baccante, M. A. Lemmon, and J. Schlessinger. 1998. Activation of phospholipase Cγ by PI 3-kinase-induced PII domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* 17:414.
20. Bae, Y. S., L. G. Cantley, C. S. Chen, S. R. Kim, K. S. Kwon, and S. G. Rhee. 1998. Activation of phospholipase C-γ by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273:4465.
21. Tanaka, N., H. Abe, H. Yagita, K. Okumura, M. Nakamura, and K. Sugamura. 1997. Itk, a T cell-specific tyrosine kinase, is required for CD2-mediated interleukin-2 promoter activation in the human T cell line Jurkat. *Eur. J. Immunol.* 27:834.
22. Schaeffer, E. M., J. Debnath, G. Yap, D. McVicar, X. C. Liao, D. R. Littman, A. Sher, H. E. Varmus, M. J. Lenardo, and P. L. Schwartzberg. 1999. Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. *Science* 284:638.
23. Clements, J. L., N. J. Boerth, J. R. Lee, and G. A. Koretzky. 1999. Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 17:89.
24. Liu, S. K., N. Tang, G. A. Koretzky, and C. J. McGlade. 1999. The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr. Biol.* 9:67.
25. Cantrell, D. 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 14:259.
26. Ebinu, J. O., S. L. Stang, C. Teixeira, D. A. Bottorff, J. Hooton, P. M. Blumberg, M. Barry, R. C. Bleakley, H. L. Ostergaard, and J. C. Stone. 2000. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 95:3199.
27. Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, H. Y. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn, and J. C. Stone. 1998. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280:1082.
28. Henning, S. W., and D. A. Cantrell. 1998. GTPases in antigen receptor signalling. *Curr. Opin. Immunol.* 10:322.
29. Kashige, N., N. Carpino, and R. Kobayashi. 2000. Tyrosine phosphorylation of p62d_{ok} by p210^{bcr-abl} inhibits RasGAP activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2093.
30. Genot, E., S. Cleverley, S. Henning, and D. Cantrell. 1996. Multiple p21^{ras} effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells. *EMBO J.* 15:3923.
31. Genot, E., and D. A. Cantrell. 2000. Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 12:289.
32. Hutchcroft, J. E., J. M. Slavik, H. Lin, T. Watanabe, and B. E. Bierer. 1998. Uncoupling activation-dependent IIS1 phosphorylation from nuclear factor of activated T cells transcriptional activation in Jurkat T cells: differential signaling through CD3 and the costimulatory receptors CD2 and CD28. *J. Immunol.* 161:4506.
33. Shimizu, Y., J. L. Mobley, L. D. Finkelstein, and A. S. Chan. 1995. A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of β₁ integrin activity by the CD2 antigen. *J. Cell Biol.* 131:1867.
34. Nishizawa, K., C. Freund, J. Li, G. Wagner, and E. L. Reinherz. 1998. Identification of a proline binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14897.
35. Li, J., K. Nishizawa, W. An, R. E. Hussey, F. E. Lialios, R. Salgia, P. R. Sunder, and E. L. Reinherz. 1998. A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. *EMBO J.* 17:7320.
36. Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94:667.
37. Meuer, S. C., R. E. Hussey, M. Fabbi, D. Fox, O. Acuto, K. A. Fitzgerald, J. C. Hodgdon, J. P. Protentis, S. F. Schlossman, and E. L. Reinherz. 1984. An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36:897.
38. Miller, G. T., P. S. Hochman, W. Meier, R. Tizard, S. A. Bixler, M. D. Rosa, and B. P. Wallner. 1993. Specific interaction of lymphocyte function-associated antigen 3 with CD2 can inhibit T cell responses. *J. Exp. Med.* 178:211.
39. Qin, L., K. D. Chavin, J. Lin, H. Yagita, and J. S. Bromberg. 1994. Anti-CD2 receptor and anti-CD2 ligand (CD48) antibodies synergize to prolong allograft survival. *J. Exp. Med.* 179:341.
40. Guckel, B., C. Berek, M. Lutz, P. Altevogt, V. Schirmacher, and B. A. Kyewski. 1991. Anti-CD2 antibodies induce T cell unresponsiveness in vivo. *J. Exp. Med.* 174:957.

4 FUNCTIONAL INTERACTION OF RasGAP-BINDING PROTEINS dok-1 AND dok-2 WITH THE TEC PROTEIN TYROSINE KINASE

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Gérard A, Favre C, Garçon F, Némorin JG, Duplay P, Pastor S, Collette Y, Olive D, Nunès JA. Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase. *Oncogene*. 2004 Feb 26;23(8):1594-8. PubMed PMID: 14647425.

4.1 Mise en contexte de l'article III

Tel que décrit dans les sections traitant des protéines de la famille dok, la phosphorylation sur tyrosine des protéines dok-1 et dok-2 permet leur interaction avec différents récepteurs tyrosine kinases (RPTKs) et différentes PTKs. Notamment, dok-1 interagit avec le domaine SH2 de la p56Lck chez les lymphocytes T et avec Bcr-Abl dans des cellules myéloïdes (Yamanashi, Y. et Baltimore, D., 1997; Bhat, A., Johnson, K. J. *et al.*, 1998; Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000). Ces observations indiquent entre autres que les kinases impliquées dans la phosphorylation de dok-1 peuvent interagir directement avec la protéine dok-1. Dans cette optique, la PTK Tee peut induire la phosphorylation de dok-1 suite à la ligation du co-récepteur CD28 chez les lymphocytes T ou suite à la ligation du BCR chez des lymphocytes B (Yoshida, K., Yamashita, Y. *et al.*, 2000). Sachant que l'interaction entre dok-1 et la kinase Tee a déjà été détectée dans des cellules myéloïdes (van Dijk, T. B., van Den Akker, E. *et al.*, 2000; Yoshida, K., Yamashita, Y. *et al.*, 2000), nous avons déterminé si les protéines Tee et dok-1 interagissent ensemble dans les lymphocytes T. Puisque la protéine dok-1 contribue aux mécanismes de régulation négative de l'activation de la cellule T stimulée par CD2 (Nemorin, J. G., Laporte, P. *et al.*, 2001), nous avons aussi évalué l'impact de dok-1 sur l'activité de Tee dans des cellules T.

Les objectifs du troisième article :

- i) Déterminer si les protéines dok-1 et dok-2 peuvent s'associer à la kinase Tee dans des cellules T et identifier le mécanisme d'interaction.
- ii) Évaluer l'impact de dok-1 sur la signalisation Tee-dépendante.

ARTICLE III:

FUNCTIONAL INTERACTION OF RasGAP-BINDING PROTEINS dok-1 AND dok-2 WITH THE TEC PROTEIN TYROSINE KINASE.

Audrey Gérard^{1,3}, Cédric Favre^{1,3}, Fabien Garçon¹, Jean-Guy Némorin², Pascale Duplay², Sonia Pastor¹, Yves Colette¹, Daniel Olive¹ et Jacques A. Nunès¹.

¹U119 INSERM, Institut de Cancérologie et d'Immunologie de Marseille, Université de la Méditerranée, Marseille, F-13009, France.

²Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

³ont contribué de manière équivalente à cet article.

Dok-1 et dok-2 sont des membres de la famille de protéines adaptatrices dok. Ces protéines sont des régulateurs importants de la prolifération cellulaire et sont des substrats de différentes protéines tyrosine kinases considérées comme des oncoprotéines. Nous démontrons que les molécules dok-1 et dok-2 phosphorylées sur tyrosine représentent les protéines majeures associées à la kinase Tee, une protéine tyrosine kinase exprimée dans les cellules T. Nous évaluons ensuite l'impact de dok-1 et dok-2 sur les cascades de signalisation médiées par Tee dans les cellules T. Nos résultats indiquent que les protéines dok-1 et dok-2 sont impliquées dans le rétrocontrôle négatif de l'activité de Tee via l'inhibition de sa phosphorylation et de la signalisation Tee-dépendante. Dok-1 ou dok-2 représentent donc des candidats potentiels pour exercer le rétrocontrôle de la signalisation phospho-dépendante des protéines et par conséquent, sont possiblement impliquées dans le développement des tumeurs.

Article publié dans : *Oncogene*, 2004 23 :1594-1598

5 RÉSULTATS ADDITIONNELS

La protéine dok-1 possède plusieurs tyrosines qui, lorsque phosphorylées, sont reconnues par les domaines SH2 de différentes molécules de signalisation (voir tableau I). Nous avons montré que l'effet inhibiteur de dok-1 sur la voie de signalisation CD2 corrèle avec son niveau de phosphorylation sur tyrosine dans les cellules T. Nous avons donc choisi de modifier les motifs centrés autour de certaines de ces tyrosines en mutant la tyrosine (Y) pour une phénylalanine (F) afin d'évaluer leur importance dans la fonction régulatrice de dok-1. Ce type de mutation empêche la phosphorylation du motif et sa reconnaissance par un domaine d'interaction approprié. 5 des 15 tyrosines présentes dans la molécule ont été mutées, il s'agit des résidus 146, 315, 337, 398 et 449 (figure 8).

Résidus impliqués dans l'interaction avec la p56Lck (Y337 et Y449)

Nos observations, présentées dans le Chapitre 2, indiquent que le domaine SH2 de la PTK p56Lck peut reconnaître la protéine dok-1 phosphorylée sur tyrosine suite à une stimulation via le co-récepteur CD2 (Nemurin, J. G. et Duplay, P., 2000). Les motifs reconnus par le domaine SH2 de p56Lck contiennent des tyrosines comprises dans la séquence YxxI/L/V. Seulement 3 motifs semblables se trouvent dans la molécule dok-1 (Y203, Y337 et Y449) et seuls les 2 motifs centrés autour des tyrosines 337 et 449 sont inclus dans la portion C-terminale de la molécule. Nous avons donc choisi de muter ces 2 motifs. La tyrosine 337 correspond aussi à un site potentiellement reconnu par les domaines SH2 de la tyrosine phosphatase SHPTP-1 et de la protéine adaptatrice IRS-1. La tyrosine 449, quant à elle, est aussi potentiellement reconnue par les domaines SH2 de la phosphatase SHP-2, de la kinase Csk et de la molécule SAP (Yamanashi, Y. et Baltimore, D., 1997).

Résidus impliqués dans l'interaction avec la p120RasGAP (Y315 et Y398)

L'association entre la protéine dok-1 phosphorylée sur tyrosine et la p120RasGAP a été observée dans plusieurs systèmes cellulaires ainsi que dans nos travaux (Yamanashi, Y. et Baltimore, D., 1997; Nemurin, J. G., Laporte, P. *et al.*, 2001; Gugasyan, R., Quilici, C. *et al.*, 2002). La séquence de dok-1 comprend 6 tyrosines contenues dans la séquence d'acides aminés YxxP laquelle est reconnue par les

domaines SH2 de la p120RasGAP, il s'agit des résidus 296, 315, 362, 377, 398 et 409. L'importance relative de ces tyrosines a été évaluée dans une série d'expériences *in vitro* réalisée par le groupe de Kobayashi R. (Kashige, N., Carpino, N. *et al.*, 2000). Leurs observations indiquent clairement que toutes ces tyrosines, à l'exception du résidu 377, sont impliquées dans l'interaction entre la p120RasGAP et dok-1. Nous avons décidé de ne muter que les 2 motifs d'interaction centrés sur les tyrosines 315 et 398. Les tyrosines 296 et 315 se distinguent des autres tyrosines reconnues par les domaines SH2 de la p120RasGAP parce qu'elles forment un tandem de tyrosines séparées par 19 acides aminés. Cette séparation permettrait l'interaction simultanée des tyrosines avec les 2 domaines SH2 de la p120RasGAP. Ce type d'interaction est aussi observé entre la p120RasGAP et la p190RhoGAP (Hu, K. Q. et Settleman, J., 1997). La mutation de la tyrosine 315 devrait donc détruire ce tandem alors que la mutation de la tyrosine 398 pourrait inhiber, au moins partiellement, l'interaction entre la molécule dok-1 et la p120RasGAP.

Résidu Y146

La tyrosine 146 est contenue dans la séquence Y/MxxNxLpY₁₄₆ et est reconnue par le domaine PTB de dok-1 (Songyang, Z., Yamanashi, Y. *et al.*, 2001). Ce motif particulier est présent dans la séquence des protéines dok-1, dok-2 et dok-3 et suggère que les protéines de la famille dok puissent former des homodimères et des hétérodimères. Nous avons donc muté cette tyrosine dans le but d'évaluer son importance dans la fonction de dok-1.

Domaine PTB de dok-1 (RA207/208)

La protéine dok-1 possède aussi un domaine PTB qui lui permet de reconnaître des tyrosines dans la séquence Y/MxxNxLpY. Afin d'évaluer l'importance de ce domaine dans la fonction de dok-1 et aussi d'identifier des partenaires de liaison potentiellement reconnus par dok-1 via ce domaine, nous avons inactivé le domaine PTB de dok-1 en mutant les résidus arginines (R) 207 et 208 en alanines (A). Ces résidus forment, avec les arginines 222 et 223, un tandem essentiel à la fonction du domaine PTB de dok-1. La présence d'arginines en tandem qui coordonnent l'association aux tyrosines phosphorylées est aussi observée dans le domaine PTB des molécules de la famille IRS-1 (Yamanashi, Y. et Baltimore, D., 1997). Ce type de mutation a déjà été effectué par d'autres groupes de recherche dans le but d'inactiver

le domaine PTB de dok-1 et de dok-2 (Jones, N. et Dumont, D. J., 1999; Songyang, Z., Yamanashi, Y. *et al.*, 2001). Pour vérifier la fonction du domaine PTB, nous avons produit des protéines de fusion GST qui contiennent le domaine PTB intact ou muté de dok-1. Nous avons vérifié la fonction de ces protéines de fusion en évaluant leur capacité à retenir des protéines phosphorylées sur tyrosine suite à la stimulation CD2 de cellules Jurkat qui surexpriment HAdok-1 (figure 12). Ceci nous a permis de confirmer que la mutation des arginines 207 et 208 parvient à inactiver le domaine PTB de dok-1. Cette expérience nous a aussi permis de confirmer que le domaine PTB de dok-1 parvient à reconnaître les protéines dok-1 et dok-2 phosphorylées sur tyrosine suite à une stimulation CD2 (figure 12).

Pour étudier l'impact de chaque mutation sur la fonction de dok-1 suite à une stimulation CD2, nous avons opté pour la surexpression stable de la protéine de fusion HAdok-1 mutée dans des cellules T Jurkat. Lors de nos études, nous nous sommes assurés de n'utiliser que les clones générés qui exprimaient des niveaux semblables des marqueurs cellulaires CD2 et CD3 de même que des niveaux semblables de HAdok-1 (muté ou non). Une partie des résultats est présentée dans le tableau II et les figures 8, 9 et 10.

Tableau II : Effet des mutations de dok-1 sur sa fonction

HAdok-1	Stimulation CD2		
	Phosphorylation HAdok-1	Phosphorylation ERK 1/2	Activation NF-AT
Parentale [£]	+	+	+
WT	+	↓	↓
YF146	-	+	↑
RA207/8	-	+	+
YF315	+/-	+	↑
YF398	+	+	+
YF337	+/-	?	↓
YF449	+	?	+

(sauf indications contraires, les résultats présentés dans le tableau sont représentatifs de plusieurs clones)

£ : indique qu'il s'agit de la lignée parentale de Jurkat qui n'exprime que la forme endogène de dok-1.
ERK ½ et NF-AT : ↑ indique une augmentation et ↓ indique une diminution par rapport à la lignée parentale;

Phosphorylation : + indique qu'il y a phosphorylation, - indique une perte de phosphorylation et +/- indique une phosphorylation partielle; ? : indique qu'il n'y a pas suffisamment de résultats pour conclure.

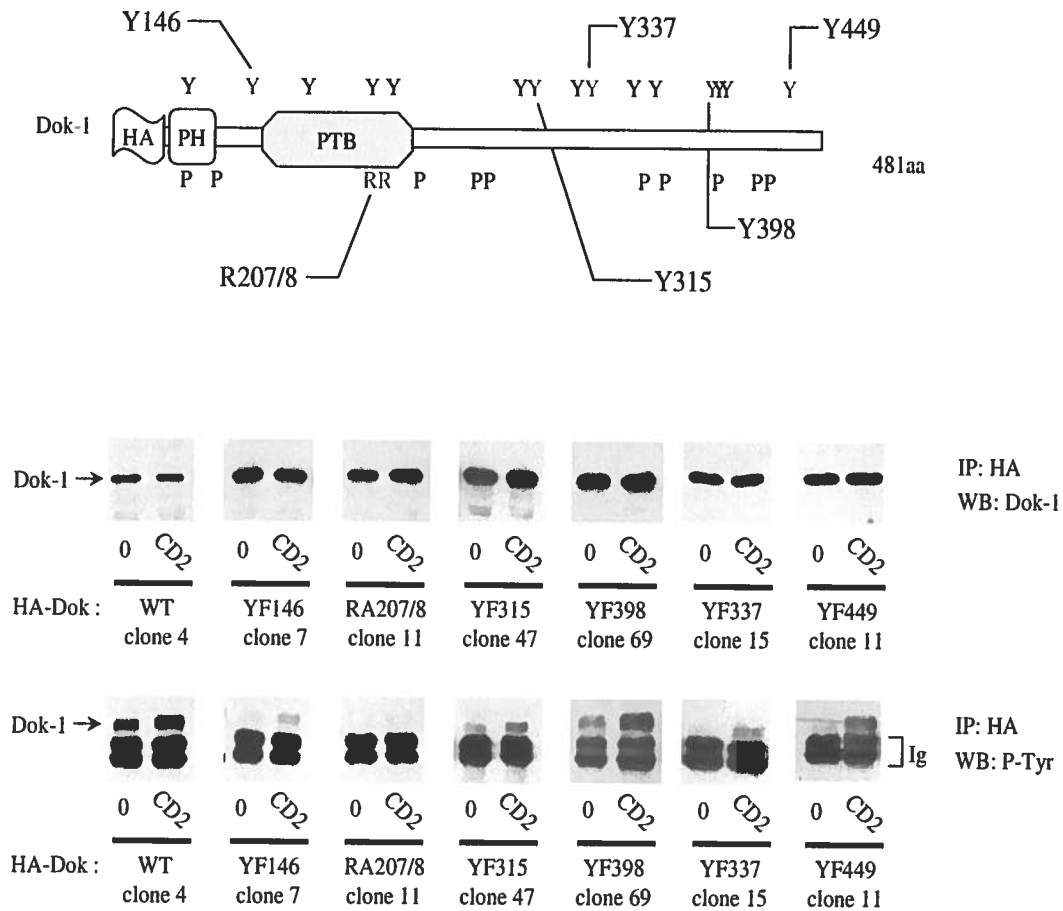


Figure 8 *Niveaux d'expression et de phosphorylation des versions mutées de dok-1.* Des clones Jurkat qui surexpriment différentes versions mutées de dok-1 ont été générés et laissés non-activés ou stimulés avec des anticorps dirigés contre CD2 pendant 10 min. Les extraits totaux correspondants sont immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre HAdok-1. Les extraits sont ensuite migrés sur un gel SDS-PAGE et les niveaux de HAdok-1 sont évalués par immunobuvardage de type Western avec un anticorps dirigé contre dok-1. Les niveaux de phosphorylation de HAdok-1 sont évalués en utilisant un anti-P-Tyr.

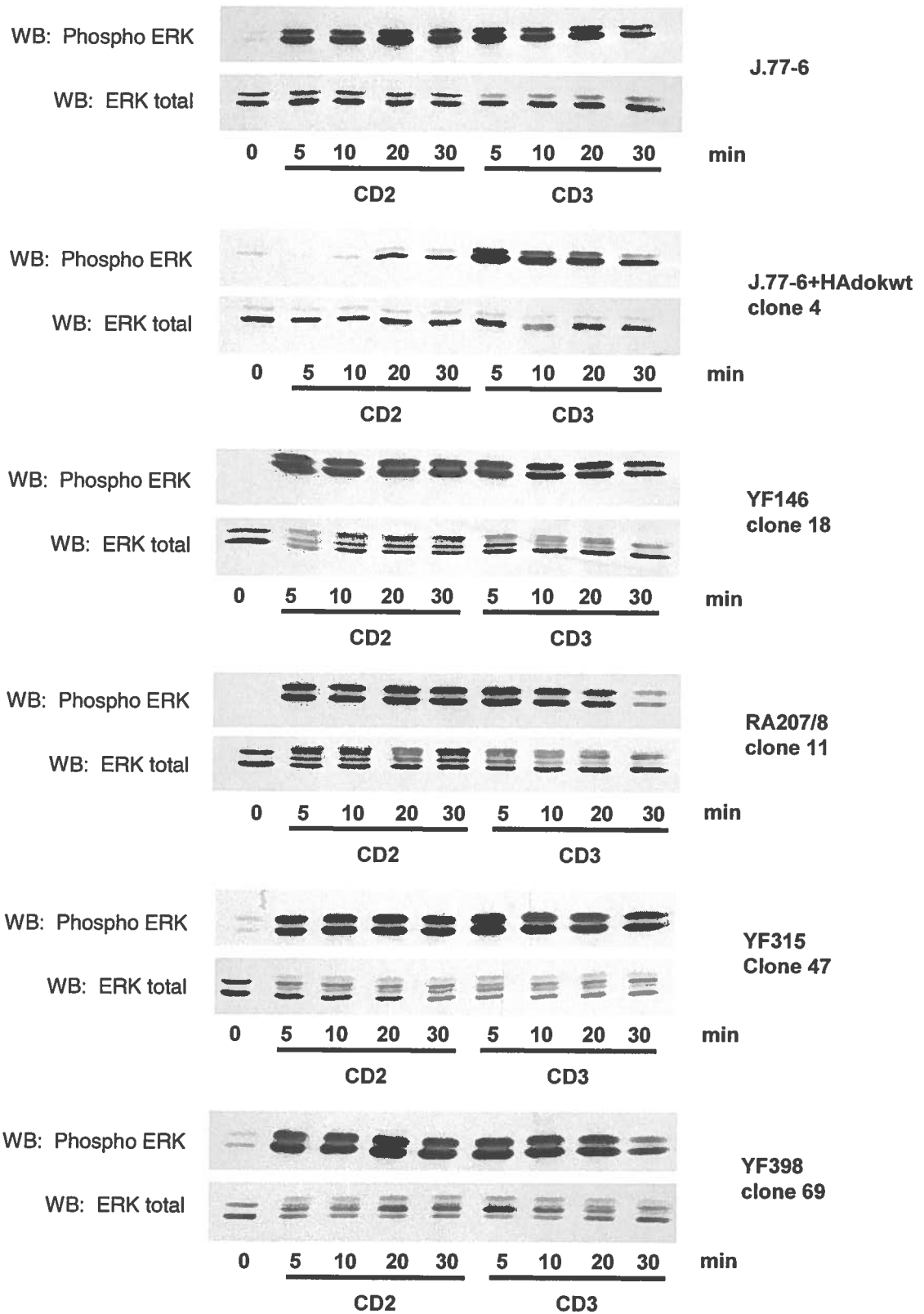


Figure 9 **Activation des MAPKs.** Des clones Jurkat qui surexpriment différentes versions mutées de HAdok-1 sont laissés non-activés ou stimulés avec des anticorps dirigés contre CD2 ou CD3 pendant les intervalles de temps spécifiés. Les extraits totaux correspondants sont migrés sur SDS-PAGE et l'induction de phosphorylation des isoformes p42 et p44 de ERK est évaluée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps qui reconnaît la forme phosphorylée des isoformes de ERK. Les niveaux totaux de ERK sont évalués avec un anticorps qui reconnaît toutes les formes de ERK.

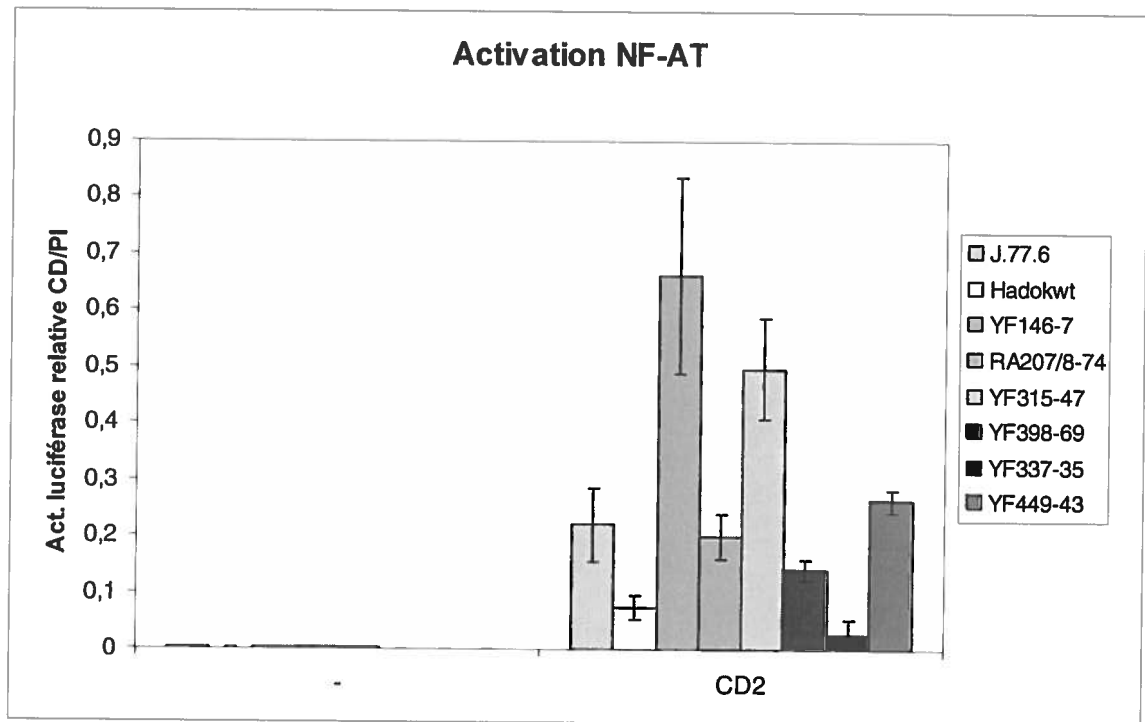


Figure 10 *Activation du facteur de transcription NF-AT. Des cellules Jurkat contrôles et des clones qui surexpriment différentes versions de HAdok-1 ont été transfectées avec un plasmide qui contient le gène rapporteur luciférase sous le contrôle du facteur de transcription NF-AT. Les cellules sont non stimulées ou stimulées avec des anticorps dirigés contre CD2 ou par la combinaison PMA et ionomycine pendant 6 heures. L'activité de NF-AT est calculée sous la forme d'un ratio entre la valeur obtenue pour l'activité luciférase dépendante de NF-AT et un contrôle interne (rénilla luciférase) sous le contrôle du promoteur constitutif thymidine kinase. L'activité relative est calculée en divisant l'activité luciférase obtenue suite à une stimulation CD2 sur la valeur obtenue en stimulant la cellule par la combinaison PMA et ionomycine.*

Il est possible de catégoriser l'impact des mutations réalisées sur dok-1 selon 2 critères :

- 1) L'importance du motif vis-à-vis la phosphorylation globale de la molécule suite à une stimulation CD2.
- 2) L'effet de cette mutation sur la fonction de dok-1 suite à une stimulation CD2.

La phosphorylation des formes mutées de HAdok-1 est vérifiée en réalisant des immunoprécipitations avec des anticorps dirigés contre l'épitope HA des protéines de fusion afin de ne récupérer que la forme mutée de dok-1 pour ensuite évaluer leur niveau de phosphorylation suite à une stimulation CD2. L'impact fonctionnel des mutations est déterminé en évaluant l'activité des MAPKs de même que l'activité du facteur de transcription NF-AT suite à une stimulation par CD2. De cette façon, il est possible de distinguer 3 catégories de motifs mutés.

- 1- Les mutations qui s'avèrent importantes pour la phosphorylation globale de dok-1 mais pour lesquelles on ne décèle aucun impact sur la fonction de dok-1 suite à une stimulation CD2.** C'est le cas de la mutation qui touche la tyrosine 337. En effet, la mutation de la tyrosine 337 corrèle avec une diminution du degré de phosphorylation de dok-1 dans les cellules au repos et suite à une stimulation CD2 (figure 8). Cependant, malgré la diminution de la phosphorylation de HAdok-1 cette version mutée de dok-1 se comporte comme la protéine HAdok-1 sauvage. Nous observons donc une diminution de l'activité du facteur de transcription NF-AT suite à une stimulation CD2 (figure 10). Ceci suggère, à tout le moins, que cet aspect de l'activité régulatrice de dok-1 suite à une stimulation CD2 ne dépend pas directement de la phosphorylation de la tyrosine 337. L'impact de la mutation YF337 sur l'activité des MAPKs n'est pas présenté parce que les données expérimentales sont insuffisantes pour émettre une conclusion valable.
- 2- Les mutations importantes vis-à-vis la phosphorylation globale de dok-1 et sa fonction suite à une stimulation CD2.** C'est le cas des mutations qui touchent les tyrosines 146 et 315 de même que les arginines en position 207 et 208 lesquelles coordonnent la fonction du domaine PTB de dok-1. Ces

mutations influencent à divers degrés le niveau de phosphorylation de dok-1 suite à une stimulation CD2 (figure 8). La mutation de la tyrosine 315 corrèle avec une diminution partielle de la phosphorylation de dok-1. Parallèlement, nous observons que la phosphorylation des MAPKs est rétablie (figure 9). Toutefois, l'activité de NF-AT est augmentée par rapport aux cellules parentales (figure 10). L'effet sur l'activité de NF-AT suggère que la version YF315 de HAdok-1 interfère avec la fonction de dok-1 endogène et agit comme un dominant négatif. Il est à noter que l'on s'attendait aussi à un effet de dominant négatif vis-à-vis l'activité des MAPKs mais ce n'est pas le cas. L'absence de cet effet dominant négatif reflète possiblement la plus grande sensibilité du test pour l'activité de NF-AT. La mutation de cette tyrosine empêche aussi l'association entre la p120RasGAP et HAdok-1 mutée suite à une stimulation CD2, confirmant l'importance de la phosphorylation de ce motif dans l'interaction entre ces 2 molécules (figure 2/article III).

La mutation de la tyrosine 146 abolit presque complètement la phosphorylation de HAdok-1 (figure 8). Cette diminution de phosphorylation concorde avec la perte de la fonction régulatrice de dok-1 puisque l'on observe que l'activité des MAPKs est rétablie (figure 9). Toutefois, comme observé pour la version YF315 de HAdok-1, la mutation YF146 corrèle avec une augmentation marquée de l'activité de NF-AT suite à une stimulation CD2 (figure 10). Ceci indique que la version HAdok-1 YF146 interfère avec la fonction régulatrice de dok-1 endogène et, comme c'est le cas pour la version HAdok-1 YF315, agit comme un dominant négatif. Ici encore, l'absence d'un effet dominant négatif vis-à-vis l'activité des MAPKs reflète possiblement la sensibilité des tests effectués. D'autre part, l'absence quasi totale de phosphorylation et l'effet dominant négatif encore plus marqué de HAdok-1 YF146 sur la fonction de dok-1 endogène suggère que la perte de fonction de dok-1 soit due à l'absence de phosphorylation de plusieurs tyrosines, dont la tyrosine 315, situées dans la portion C-terminale de dok-1. Dans cette optique, la phosphorylation de la tyrosine 146 deviendrait nécessaire pour permettre la phosphorylation subséquente de la molécule. Ceci sera discuté plus en détail lors de la discussion.

L'inactivation du domaine PTB abolit la phosphorylation de HAdok-1 (figure 8). Ceci suggère que la phosphorylation de HAdok-1 dépend aussi de la présence d'un domaine PTB intact. L'inactivation du domaine PTB de HAdok-1 et la perte de phosphorylation subséquente concorde avec la perte de la fonction régulatrice de dok-1 puisque l'activité des MAPKs de même que l'activité de NF-AT sont rétablies suite à une stimulation CD2 (figures 8 et 9). Les cellules qui expriment HAdok-1 RA207/8 se comportent donc comme des cellules parentales.

- 3- **Les mutations qui n'affectent pas le degré de phosphorylation de dok-1 mais qui sont importantes pour sa fonction suite à une stimulation CD2.** C'est le cas des mutations qui touchent les tyrosines 398 et 449. Les mutations qui touchent les résidus 398 et 449 n'affectent pas le niveau de phosphorylation de dok-1 suite à une stimulation via CD2 (figure 8) mais semblent compromettre au moins un des aspects étudiés de la fonction régulatrice de dok-1 (figures 9 et 10). En effet, la mutation YF398 affecte la fonction régulatrice de HAdok-1 vis-à-vis l'activité de NF-AT (i.e. se comporte comme la cellule parentale) ainsi que l'activité des MAPKs suite à une stimulation CD2 (figures 9 et 10). Quant à elle, la mutation YF449 affecte la fonction régulatrice de HAdok-1 vis-à-vis l'activité de NF-AT (figure 10). L'impact de la mutation YF449 sur l'activité des MAPKs n'est pas présenté parce que les données expérimentales sont insuffisantes pour émettre une conclusion valable. Ces sites détiennent donc une importance fonctionnelle. Il se pourrait que ces sites ne soient phosphorylés que dans une fraction mineure de dok-1 ou encore que les tyrosines 398 et 449 fassent partie de sites de reconnaissance indispensables à la fonction de la protéine.

6 DISCUSSION

Des 5 membres de la famille dok, seules les protéines dok-1 et dok-2 sont exprimées chez les lymphocytes T. Néanmoins, les ARNm qui codent pour les protéines dok-4 et dok-5 ont été détectés chez les lymphocytes T humains (Favre, C., Gerard, A. *et al.*, 2003). Les résultats obtenus jusqu'à présent confirment que les protéines dok-1 et dok-2 jouent des rôles spécifiques dans la transduction des signaux initiés par la ligation des co-récepteurs CD2 et CD28 chez le lymphocyte T. Nous avons démontré que la protéine dok-1 est phosphorylée sur tyrosine suite à une stimulation CD2 alors qu'une stimulation via le complexe TCR/CD3 n'induit aucune phosphorylation de la protéine (Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000). De plus, nous avons observé que la phosphorylation de dok-1 corrèle avec son recrutement à la membrane. En surexprimant la protéine dok-1 dans des cellules T, nous avons été en mesure de déterminer la fonction de dok-1 dans le cadre d'une stimulation CD2 du lymphocyte T. Nous avons démontré que la surexpression de dok-1 corrèle avec une diminution de l'activité des MAPKs, de la mobilisation de calcium et de la phosphorylation de la PLC γ -1 suite à une stimulation CD2. Ces résultats nous suggèrent que dok-1 est impliquée dans la régulation négative de l'activation de la cellule T dans le cadre d'une stimulation via CD2 (Nemorin, J. G., Laporte, P. *et al.*, 2001). La phosphorylation de dok-1 suite à la ligation de CD28 a aussi été répertoriée (Klasen, S., Pages, F. *et al.*, 1998). À l'heure actuelle, peu d'informations sont disponibles sur la fonction de dok-1 suite à une stimulation CD28. Cependant, une co-stimulation CD28 et TCR/CD3 corrèle avec une diminution de la phosphorylation de dok-1 (Michel, F., Attal-Bonnefoy, G. *et al.*, 2001) tout comme c'est le cas suite à une co-stimulation CD2 et TCR/CD3 (résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que dok-1 puisse jouer un rôle semblable de régulation négative suite à une stimulation via CD28.

6.1 Phosphorylation de dok-1

6.1.1 Identité des kinases qui phosphorylent dok-1

La phosphorylation de dok-1 représente une étape critique dans sa fonction de régulation de l'activité du lymphocyte T. Cependant, nous ne connaissons toujours pas l'identité de la kinase ou des kinases responsables de cette phosphorylation. Nous avons néanmoins démontré que la phosphorylation de dok-1 dépend de la présence de p56Lck sans toutefois déterminer si cette dépendance est directe ou indirecte (Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000). Selon des études réalisées avec les domaines SH2 de plusieurs PTKs, il a été déterminé que les PTKs cytosoliques phosphorylent de manière préférentielle les peptides qui sont reconnus par leur propre domaine SH2 (Songyang, Z., Carraway, K. L., 3rd *et al.*, 1995). Avec ceci en tête, nous avons démontré que le domaine SH2 de Lck peut reconnaître spécifiquement les protéines dok-1 et dok-2 phosphorylées sur tyrosine suite à une stimulation CD2 (Nemorin, J. G. et Duplay, P., 2000). La molécule dok-1 contient 3 tyrosines situées dans un motif YxxI/L/V potentiellement reconnu par le domaine SH2 des PTKs de la famille Src. En mutant 2 de ses tyrosines, les motifs centrés autour des tyrosines 337 et 449, nous avons pu déterminer que la phosphorylation complète de dok-1 ne dépend pas directement de l'existence de ces sites. En effet, suite à une stimulation CD2, la protéine dok-1 mutée sur la tyrosine 337 demeure partiellement phosphorylée alors que la mutation de la tyrosine 449 ne semble pas affecter la phosphorylation de dok-1 (figure 8). La p56Lck pourrait donc phosphoryler d'autres tyrosines ou alors d'autres kinases sont impliquées dans la phosphorylation de dok-1. Comme mentionné dans l'introduction, deux protéines de la famille de kinases Tec, Tec et Itk, représentent des candidates potentiellement impliquées dans la phosphorylation de dok-1 puisqu'elles sont activées suite à une stimulation CD2 ou CD28. Cependant dans des cellules T, dok-1 est phosphorylée par Tec et non par Itk (Yang, W. C., Ghiotto, M. *et al.*, 1999). De plus, suite à l'activation de la cellule T par un traitement avec du pervanadate nous démontrons que dok-1 phosphorylée sur tyrosine s'associe avec la PTK Tec phosphorylée (Chapitre 4). Cette interaction implique la portion C-terminale de dok-1. Tec pourrait donc être impliquée dans la signalisation qui passe par dok. Il reste néanmoins à démontrer si une stimulation via CD2 active Tec. Nos résultats suggèrent donc que la phosphorylation de dok-1 dépend de l'activité d'au moins 2

PTKs différentes, soit les kinases Tec et p56Lck. L'importance d'une kinase par rapport à l'autre dépend vraisemblablement de la cascade de signalisation utilisée suite à la ligation du co-récepteur CD2 ou CD28 de la cellule T. Il est aussi possible que ces kinases puissent se relayer dans le temps pour réaliser la phosphorylation complète de dok-1.

6.1.2 Phosphorylation à la membrane

Suite à l'activation du lymphocyte T par la ligation du co-récepteur CD2, la protéine dok-1 est recrutée à la membrane. En étudiant la localisation de dok-1, nous avons déterminé qu'une petite proportion de la totalité des protéines dok-1 est relocalisée à la membrane après la ligation de CD2. Cependant, cette faible quantité de dok-1 membranaire est fortement phosphorylée sur tyrosine (figure 7/ article II). Ceci suggère que la majorité des kinases responsables de la phosphorylation de dok-1 sont localisées à la membrane et, par conséquent, que la phosphorylation de dok-1 s'effectue à la membrane. Les PTKs p56Lck et Tec sont toutes 2 localisées à la membrane en permanence ou suite à l'activation du lymphocyte T, p56Lck via un site de myristoylation et un site de palmitoylation et Tec via une interaction qui implique son domaine PH avec le PIP3 produit par la PI3K après l'activation cellulaire (Resh, M. D., 1994; Kosugi, A., Hayashi, F. *et al.*, 2001; Lewis, C. M., Broussard, C. *et al.*, 2001). Le domaine PH de dok-1 est aussi essentiel pour son recrutement à la membrane. La délétion de ce domaine empêche entre autres le recrutement membranaire et la phosphorylation de la molécule normalement observés en réponse à l'insuline dans des cellules CHO-IR (Noguchi, T., Matozaki, T. *et al.*, 1999). De plus, chez des lymphocytes T stimulés par CD28, nos résultats indiquent que l'absence du domaine PH de dok-1 corrèle avec une perte de fonction de la molécule et une diminution significative de sa phosphorylation (résultats non publiés). Outre le domaine PH, le domaine PTB des protéines de la famille dok est aussi impliqué dans la localisation appropriée de la molécule. En effet, il a été démontré que le domaine PTB intact de dok-2 permet son recrutement membranaire à proximité du récepteur à l'EGF. Dans cette série d'études, il a aussi été démontré que l'absence des domaines PH et PTB de dok-2 résulte en une diminution drastique des niveaux de phosphorylation induits suite à une stimulation via EGFR (Jones, N. et Dumont, D. J., 1999). Nos résultats indiquent aussi qu'un domaine PTB fonctionnel est nécessaire

pour la phosphorylation de dok-1 (figure 8) donc probablement sont recrutement à la membrane. D'autre part, la mutation de la tyrosine 146 empêche la phosphorylation subséquente des autres tyrosines contenues dans la portion C-terminale de dok-1 (figure 8). Nous avons donc proposé un modèle où suite à la ligation de CD2, dok-1 serait recrutée à la membrane via ses domaines PH et PTB (figure 11).

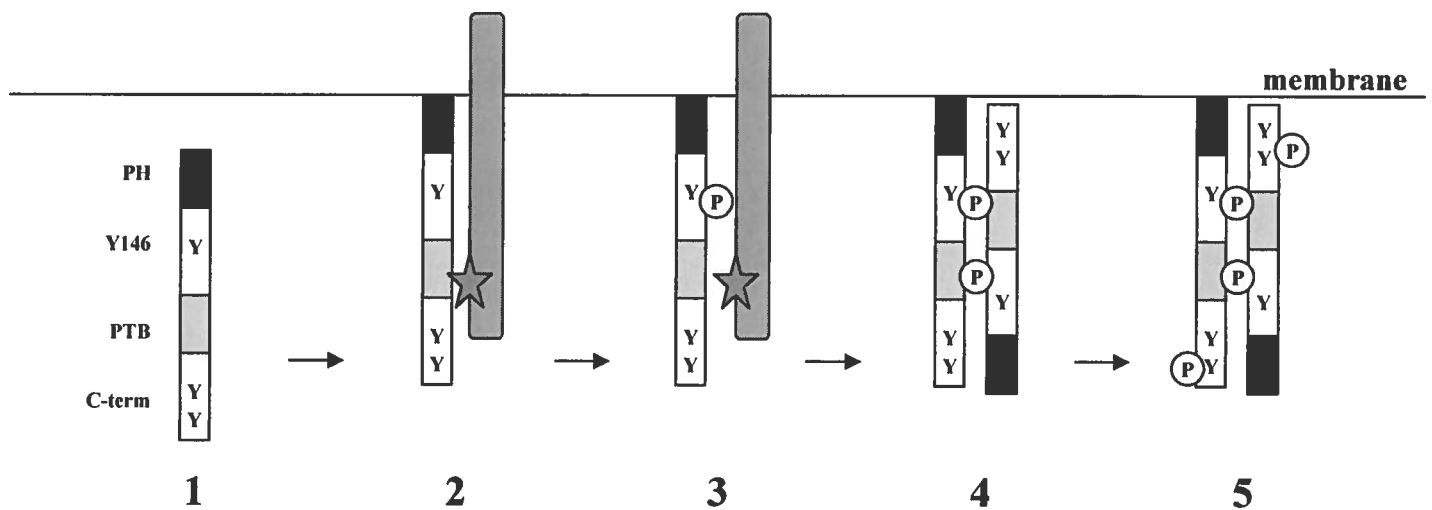


Figure 11 *Modèle de phosphorylation de dok-1. (1) La protéine dok-1 est présente dans le cytoplasme de la cellule T non-activée. (2) Via ses domaines PH et PTB, dok-1 est recrutée à proximité d'un récepteur de surface activé. (3) Des PTKs à proximité du complexe récepteur-dok1 phosphorylent la tyrosine 146 de dok-1. (4) Le domaine PTB de dok-1 reconnaît la tyrosine 146 phosphorylée et forme des dimères dok-1. (5) La dimérisation de dok-1 permet la phosphorylation sur tyrosine subséquente de dok-1 par d'autres PTKs.*

Le domaine PH de dok-1, via son interaction avec des phospholipides, contribuerait vraisemblablement à recruter et stabiliser la protéine à la membrane. Pour sa part, le domaine PTB de dok-1 servirait d'abord à interagir avec des protéines déjà localisées à la membrane. Dok-1 serait ainsi maintenue à proximité d'un complexe de protéines qui contient une ou plusieurs kinases qui catalysent la phosphorylation de la molécule. La tyrosine 146 est vraisemblablement la première tyrosine phosphorylée ou l'une des premières tyrosines phosphorylées puisque la mutation de la tyrosine 146 résulte en l'absence quasi totale de phosphorylation de HAdok-1 (figure 8). Comme nous l'avons mentionné, la version de HAdok-1 mutée à la tyrosine 146 agit comme un dominant négatif sur la fonction de dok-1 dans la régulation de la signalisation via CD2 (tableau II; figures 9 et 10). Un moyen d'expliquer l'effet dominant négatif de HAdok-1 YF146 est d'envisager que la forme mutée de HAdok-1 puisse interférer avec la fonction et/ou la phosphorylation de la forme endogène de dok-1. Ainsi, comme illustré dans la figure 11, après le recrutement membranaire de dok-1 et sa phosphorylation sur la tyrosine 146, d'autres protéines dok-1 aussi phosphorylées sur la tyrosine 146 pourraient reconnaître la molécule dok-1 membranaire via leur domaine PTB afin de former des dimères de dok-1 à la membrane (Songyang, Z., Yamanashi, Y. *et al.*, 2001). La formation de dimères pourrait permettre aux molécules dok-1 d'adopter une configuration qui faciliterait la phosphorylation additionnelle de dok-1 en favorisant l'accès à une kinase particulière ou encore en exposant des sites de phosphorylation normalement masqués. L'adoption d'une nouvelle configuration pourrait aussi moduler l'interaction de la queue C-terminale de dok-1 avec des molécules impliquées dans la signalisation, favorisant ou défavorisant l'interaction selon le cas. Ainsi, selon le modèle présenté à la figure 11, HAdok-1 YF146 agit comme un dominant négatif parce que le processus de phosphorylation est bloqué après le recrutement initial de la molécule à la membrane. Dans ce cas, l'effet dominant négatif existe aussi parce que la quantité excédentaire de HAdok-1 YF146 compétitionne pour les sites de recrutement membranaire normalement occupés par les molécules dok-1 endogènes. Quant à elle, la version HAdok-1 RA207/8 n'affecte pas la fonction de dok-1 endogène parce qu'elle ne se rend jamais à la membrane. Cependant, l'absence de recrutement membranaire signifie aussi l'absence de phosphorylation de la molécule HAdok-1 RA207/8.

Alternativement, rien ne prouve que les résultats observés suite à la stimulation CD2 des cellules T qui expriment des versions de dok-1 mutées au domaine PTB ou à la tyrosine 146 reflète bel et bien l'absence de dimérisation de dok-1. En effet, il est possible que ces mutations affectent plutôt la capacité de dok-1 à interagir avec d'autres molécules. Par exemple, comme prévu par le modèle, le domaine PTB de dok-1 devrait interagir avec plusieurs molécules lors du recrutement de dok-1 à la membrane. Par exemple, l'interaction entre le domaine PTB de dok-1 et l'inositol phosphatase SHIP1 a déjà été répertoriée (Sattler, M., Verma, S. *et al.*, 2001). De son côté, la tyrosine 146 située dans le motif Y/MxxNxLpY₁₄₆ de dok-1 pourrait vraisemblablement être reconnue par les domaines d'interaction PTB ou SH2 présents sur d'autres protéines. Dans les deux cas, ces mutations pourraient altérer ou empêcher l'association de dok-1 avec une ou plusieurs kinases particulières et par conséquent, contribuer à la diminution du niveau de phosphorylation de dok-1.

6.1.3 Dok-1 et dok-2 : rôles respectifs

Les cellules T expriment deux membres de la famille dok, dok-1 et dok-2. Ces 2 molécules ont une structure semblable mais présentent des différences au niveau de leurs séquences respectives (figure 7). La portion C-terminale représente la région où l'on retrouve la plus grande divergence de séquence entre les 2 membres de la famille dok. Des souris déficientes pour l'expression de dok-1 ont été générées par 2 groupes (Yamanashi, Y., Tamura, T. *et al.*, 2000; Di Cristofano, A., Niki, M. *et al.*, 2001). L'absence de dok-1 dans les cellules T ne donne pas lieu à des défauts évidents ni dans la fonction ni dans le développement des cellules T. Nous avons aussi montré que la surexpression de dok-2 tout comme celle de dok-1 inhibe l'activation des MAPKs et NF-AT (résultats non publiés). L'expression de dok-2 dans des cellules T dok-1^{-/-} pourrait donc compenser pour l'absence de dok-1. Cependant il serait hâtif de conclure que dok-1 et dok-2 détiennent des rôles redondants. En effet, des études de prolifération en réponse à la ConA sur des thymocytes dok-1^{-/-} indique que ces thymocytes prolifèrent davantage que des thymocytes qui proviennent de souris sauvages (Di Cristofano, A., Niki, M. *et al.*, 2001). De plus, la surexpression de dok-1 mais pas celle de dok-2 dans des lymphocytes T affecte la réponse calcique (résultats non publiés).

Nous pouvons proposer au moins 2 modèles, non exclusifs, qui tiennent compte des propriétés connues à ce jour pour les 2 membres de la famille dok :

Les protéines dok possèdent des caractéristiques similaires et peuvent former des homodimères ainsi que des hétérodimères. La fonction de ces dimères pourrait être coopérative et promouvoir la fonction régulatrice des protéines dok dans la cellule T. Le domaine PTB de dok-1 semble jouer un rôle central dans le bon fonctionnement de la molécule au niveau des voies de signalisations induites par CD2. Dans le cas de dok-1, ce domaine permet la reconnaissance de la tyrosine 146 contenue dans le motif particulier : Y/MxxNxLpY₁₄₆. Ceci indique que la molécule dok-1 peut potentiellement former des dimères. Pour dok-2, cette même capacité de dimérisation existe grâce à la présence d'un domaine PTB et de cette même séquence spécifique entourant le résidu tyrosine 139 de dok-2. Bien que l'homologie de séquence entre les domaines PTB de dok-1 et de dok-2 ne soit que de 56%, la formation potentielle de complexes entre les 2 molécules dok est tout à fait possible puisque la séquence d'acides aminés qui entoure les tyrosines 146 et 139 pour dok-1 et dok-2 respectivement est pratiquement identique. De plus, nos résultats indiquent que le PTB de dok-1 peut reconnaître dok-2 phosphorylée sur tyrosine *in vitro* (figure 12). En supposant que les protéines associées à dok-2 soient différentes de celles qui s'associent à dok-1, nous pouvons supposer que les complexes dok-1/dok-2 fonctionnent ensemble pour orchestrer le recrutement, l'interaction et l'activité de différentes protéines impliquées dans les voies de signalisation induites lors de la stimulation CD2 du lymphocyte T.

Les deux protéines sont impliquées dans des voies de signalisation qui se chevauchent mais dok-1 et dok-2 jouent tout de même des rôles distincts. Il a été démontré que l'expression du gène qui code pour dok-2 est augmentée suite à la stimulation des macrophages par certaines cytokines (Suzu, S., Tanaka-Douzono, M. *et al.*, 2000). Dans ce modèle d'étude, l'expression augmentée de dok-2 corrèle avec une inhibition plus marquée des voies de signalisation induites par ces mêmes cytokines. De cette façon, les auteurs suggèrent que dok-2 puisse agir comme une molécule qui régule négativement l'activation du macrophage par un système de rétrocontrôle. Une augmentation semblable peut aussi être envisagée suite à l'activation de la cellule T par différents stimuli.

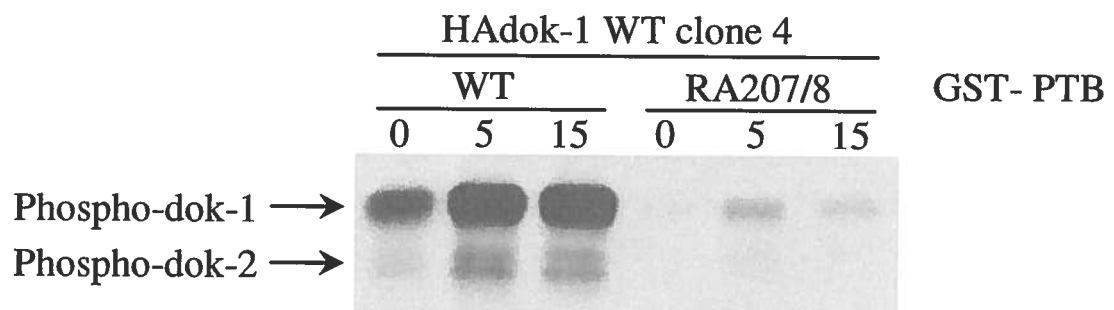


Figure 12 *Inactivation du domaine PTB.* Des cellules Jurkat qui surexpriment HAdok-1 sont laissées non-activées ou stimulées avec des anticorps dirigés contre CD2 pendant 5 ou 15 min. Les extraits totaux recueillis sont incubés avec les protéines de fusion GST-PTBdok-1 WT ou mutée (RA207/8). Les extraits sont ensuite migrés sur un gel SDS-PAGE et les niveaux de phospho-dok associés aux protéines GST sont évalués par immunobuvardage de type Western avec un anti-P-Tyr.

Du point de vue fonctionnel, dok-1 pourrait remplir sa fonction dès les moments initiaux de l'activation cellulaire et par la suite, une augmentation de l'expression de dok-2 permettrait à dok-2 de déplacer dok-1 et effectivement prendre sa relève. De plus, il est possible d'envisager que les jeux de protéines associées à dok-1 et à dok-2 respectivement, soient suffisamment différents pour solliciter des voies de signalisation ou initier des fonctions cellulaires différentes. Dans cet ordre d'idées, les portions C-terminales de dok-1 et dok-2 ne montrent que peu de similarité sans oublier que dok-1 possède 5 résidus tyrosines et 2 motifs PXXP absents de la séquence peptidique de dok-2. Les motifs d'interaction additionnels chez dok-1 contribuent vraisemblablement à la formation de complexes de signalisation impliqués dans des aspects différents de l'activation de la cellule T. Ainsi, cette variation au niveau du jeu de protéines recrutées à la membrane par les membres de la famille dok pourrait contribuer à la réorientation ou au contrôle fin de la signalisation ou de la réponse cellulaire suite à une stimulation spécifique.

6.2 Voies de signalisation affectées par dok-1.

6.2.1 dok-1 dans la voie ras

Les résultats rapportés au Chapitre 3 indiquent que l'effet régulateur de dok-1 sur l'activation induite par CD2 passe par la régulation de la voie Ras-MAPK et possiblement via une interaction avec la p120RasGAP. Ainsi, nous observons une diminution de l'activité des MAPKs et une augmentation de l'association de dok-1 avec la p120RasGAP de même qu'une augmentation du recrutement membranaire de ces deux molécules suivant une stimulation CD2 des cellules Jurkat qui surexpriment dok-1 (figures 2 et 6/ article II). La mutation de la tyrosine 315 de dok-1 pour une phénylalanine confirme que la fonction régulatrice de dok-1 passe par son association avec la p120RasGAP. En effet, il y a une corrélation entre l'inhibition de la voie Ras-MAPK par la p120RasGAP et l'association observée entre dok-1 et la p120RasGAP. Ces observations nous permettent de suggérer au moins 2 rôles différents pour dok-1, du moins dans la régulation de la voie Ras-MAPK par la p120RasGAP (figure 13).

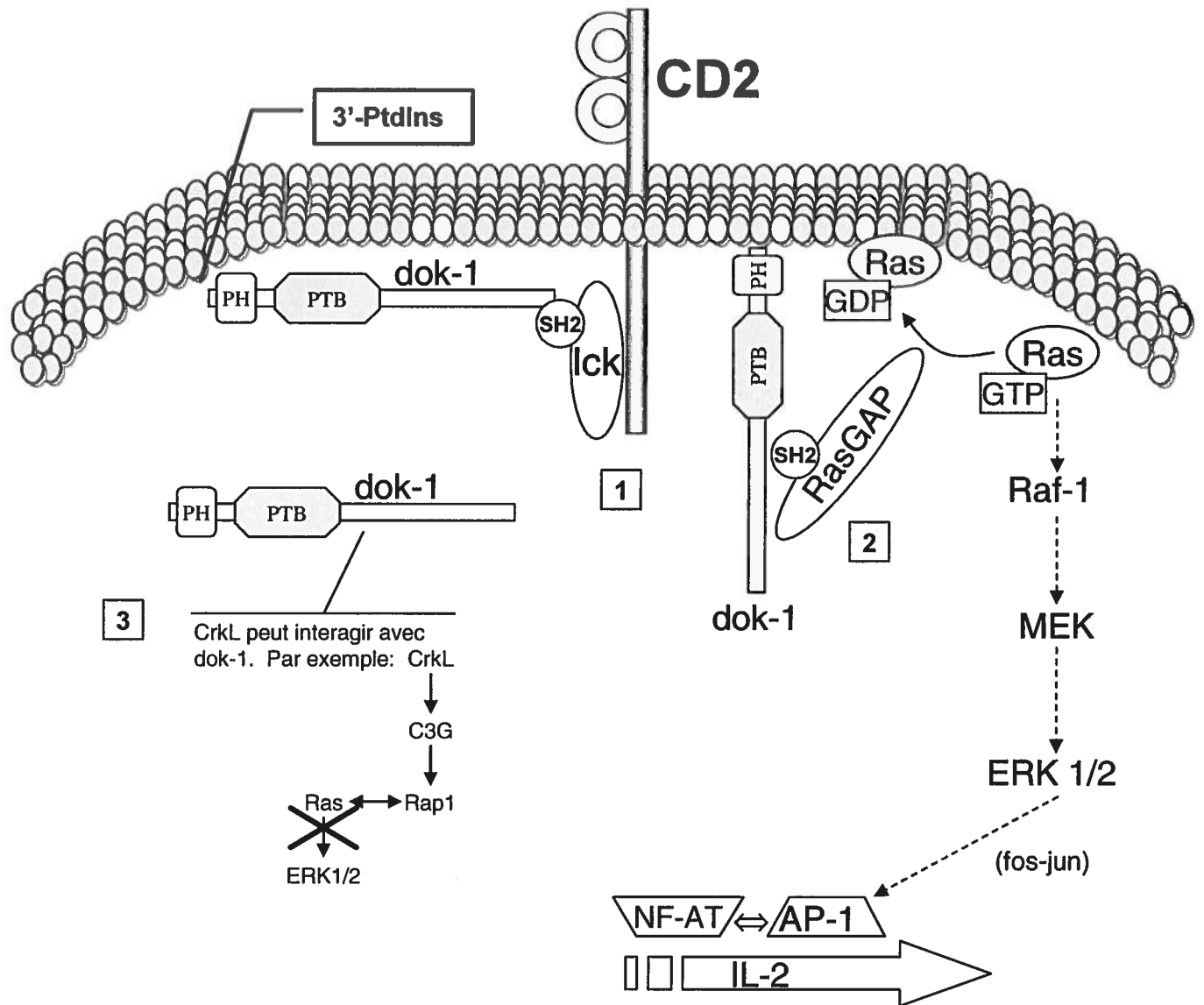


Figure 13 *Dok-1 et la p120RasGAP.* (1) La ligation de CD2 induit l'association SH2-dépendante de Lck avec dok-1. La phosphorylation additionnelle de dok-1 par Lck génère à son tour d'autres sites d'interaction de type SH2. (2) La p120RasGAP est recrutée à la membrane par dok-1. Une fois à la membrane, la p120RasGAP catalyse le passage de RasGTP à RasGDP afin de contribuer à l'inactivation de la voie Ras-MAPK. (3) Dans le lymphocyte T, l'interaction entre dok-1 et CrkL a aussi été répertoriée. Voir tableau II. Par exemple, CrkL laquelle interagit avec C3G, laquelle pourrait contribuer à l'inactivation de la voie Ras-MAPK via son interaction avec Rap1 qui antagonise l'association de Ras à Raf1.

1) dok-1 recrute la p120RasGAP à la membrane.

Dok-1 interagit avec la p120RasGAP via les domaines SH2 de celle-ci (Lock, P., Casagrande, F. *et al.*, 1999). En recrutant la p120RasGAP à la membrane, dok-1 permettrait le rapprochement de la p120RasGAP avec les différentes molécules sur lesquelles elle exerce un contrôle c.-à-d. les protéines p21ras, R-ras et Rab5 (Donovan, S., Shannon, K. M. *et al.*, 2002). Tel qu'attendu, la mutation de dok-1 au niveau de la tyrosine 315, laquelle est reconnue par les domaines SH2 de la p120RasGAP, lève l'inhibition de la voie Ras-MAPK (figure 9). Dans des cellules T Jurkat, nous observons aussi une corrélation entre la surexpression de dok-1 et la diminution de l'activation de la voie Ras-MAPK. La surexpression de dok-1 augmenterait donc la quantité de p120RasGAP recrutée à la membrane. De cette façon, la plus grande quantité de p120RasGAP à la membrane permettrait une augmentation du taux d'hydrolyse de Ras-GTP et une inactivation subséquente de la voie Ras-MAPK (figure 6/ article II).

2) dok-1 est une molécule régulatrice de la p120RasGAP.

Il est aussi possible que l'interaction entre ces 2 protéines augmente l'activité enzymatique de la p120RasGAP envers ses substrats. Dans cet ordre d'idées, il a été démontré que la p120RasGAP peut s'associer aux PTKs de la famille *Src* et que celles-ci peuvent médier la phosphorylation de la p120RasGAP (Brott, B. K., Decker, S. *et al.*, 1991). Cette association dépend d'une interaction entre le domaine SH3 des kinases et une région riche en prolines située dans la portion N-terminale de la p120RasGAP (Briggs, S. D., Bryant, S. S. *et al.*, 1995). Sachant que la protéine dok-1 interagit aussi avec le domaine SH2 de la p56Lck (Nemolin, J. G. et Duplay, P., 2000), on peut supposer que la protéine dok-1 rapproche physiquement la kinase de la p120RasGAP afin de permettre l'interaction entre le domaine SH3 de p56Lck et la région poly-proline de la p120RasGAP, possiblement dans le but de phosphoryler la p120RasGAP et induire son activité. Dans ce modèle, la protéine adaptatrice dok-1 agirait en coordonnant l'interaction entre 2 protéines afin de coupler l'activation des PTKs de la famille *Src* avec la phosphorylation de la p120RasGAP.

L'activité de la p120RasGAP n'est pas limitée à son activité envers les petites protéines G. En effet, le domaine N-terminal de la p120RasGAP semble impliqué dans la régulation du cytosquelette (McGlade, J., Brunkhorst, B. *et al.*, 1993). Ainsi,

sachant que la protéine dok-1 interagit aussi avec d'autres molécules impliquées dans la régulation du cytosquelette, comme CrkL et Nck, il est possible que dok-1 coordonne la formation d'un complexe de protéines, incluant la p120RasGAP, impliquées dans la régulation du cytosquelette. Il est toutefois possible que la régulation négative qu'exerce dok-1 sur l'activation de la voie Ras-MAPK reflète l'association de dok-1 à une autre molécule que la p120RasGAP. En effet, la protéine CrkL possède un domaine SH2 qui reconnaît aussi les tyrosines phosphorylées dans des motifs YxxP (Feller, S. M., 2001). De plus, l'association entre dok-1 et CrkL suite à une stimulation via le co-récepteur CD2 a déjà été observée (Martelli, M. P., Boomer, J. *et al.*, 2001). Via son interaction avec C3G, un activateur de Rap1 (lui-même un antagoniste potentiel de Ras), les complexes CrkL-C3G-Rap1 pourraient aussi moduler l'activité de Ras (Hu, C. D., Kariya, K. *et al.*, 1997).

6.2.2 dok-1 dans la régulation du calcium

Dok-1 semble aussi impliquée dans la régulation négative de la mobilisation de calcium dans le contexte d'une stimulation CD2. Dok-1 pourrait agir à différents endroits dans la mobilisation de calcium cependant, le rôle de dok-1 dans la régulation calcique implique vraisemblablement un contrôle au niveau de l'activation de la PLC γ -1. En effet, nous observons une diminution de la phosphorylation de l'enzyme suite à une stimulation CD2 dans des cellules qui surexpriment dok-1 (figure 4/article II). Bien que d'autres groupes aient mis en évidence l'association entre la PLC γ -1 et dok-1 dans des fibroblastes transformés par v-Src (Maa, M. C., Leu, T. H. *et al.*, 1994), nous n'avons observé aucune association entre ces 2 molécules suite à la stimulation CD2 du lymphocyte T. Plusieurs étapes sont nécessaires pour l'activation de la PLC γ -1. Dok-1 pourrait agir sur l'une ou plusieurs de ces étapes. Les PTKs ZAP-70 et Itk sont responsables de la phosphorylation de PLC γ -1 (Veri, M. C., DeBell, K. E. *et al.*, 2001). Dok-1 pourrait réguler directement ces enzymes ou encore les séquestrer suite à une stimulation via CD2. Le recrutement de PLC γ -1 à la membrane nécessite la phosphorylation de LAT et l'interaction du domaine PH de PLC γ -1 avec les produits de la PI3K (Finco, T. S., Kadlecsek, T. *et al.*, 1998). Dok-1 pourrait interférer avec la kinase responsable de la phosphorylation de LAT (i.e. ZAP-70) ou encore interférer avec l'activation de la PI3K suite à une stimulation CD2. Alternativement, il serait aussi possible que dok-1 agissent en séquestrant la PLC γ -1

nuisant ainsi à la production d'IP3 et ultimement à la mobilisation de calcium. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour permettre l'identification des protéines qui s'associent à dok-1 pour permettre d'identifier les bases moléculaires de l'inhibition de la mobilisation de calcium par dok-1.

6.2.3 Effet de dok-1 sur l'activation de NF-AT

L'activité du facteur de transcription NF-AT dépend entre autres de la mobilisation de calcium et de l'activité des MAPKs. Ainsi, la régulation négative qu'exerce dok-1 sur l'activité des MAPKs via son interaction avec la p120RasGAP et sur la mobilisation du calcium contribue à la diminution de l'activation du facteur de transcription NF-AT. Cette dernière composante de régulation dépend vraisemblablement de l'effet de dok-1 sur l'activité de la PLC γ -1 (détaillé ci-haut) et possiblement sur l'effet de dok-1 sur la fonction de Tec (détaillé plus bas).

6.2.4 Effet de dok-1 sur la fonction de Tec

Comme nous l'avons présenté dans le Chapitre 4, la phosphorylation de la portion c-terminale de la protéine dok-1 permet son association avec la PTK Tec (figure 1/article III). En particulier, cette interaction empêche l'autophosphorylation de Tec et inhibe son activité catalytique (figure 2/article III). Sachant qu'il a été déterminé que la PTK Tec peut catalyser la phosphorylation de dok-1 (Yang, W. C., Ghiotto, M. *et al.*, 1999), nos résultats suggèrent que dok-1 régule négativement l'activité de Tec dans une boucle de rétrocontrôle négatif. Dans des cellules T Jurkat, la surexpression de Tec correspond à une augmentation de la production d'IL-2 via son effet sur la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-AT (Yang, W. C., Ghiotto, M. *et al.*, 2000). L'activité kinase de Tec est critique à cet effet puisque la surexpression d'une version catalytiquement inactive de Tec n'affecte pas l'activité de NF-AT et la production d'IL-2. Par opposition, la surexpression de dok-1 dans des cellules Jurkat inhibe la production d'IL-2 et l'activité du facteur de transcription NF-AT (Chapitre 3). Puisque l'interaction entre dok-1 et Tec inhibe l'activité de celle-ci, il est possible que la régulation négative observée lorsque l'on surexprime dok-1 reflète l'inhibition des voies de signalisation en aval de l'activité Tec. Les bases moléculaires de cette inhibition demeurent inconnues mais il est possible que l'interaction entre dok-1 et Tec inactive l'enzyme en agissant directement sur Tec soit en induisant des

changements de conformation qui rendent l'enzyme inactive ou en masquant certains sites fonctionnels de l'enzyme suite à l'association des 2 protéines. Alternativement, dok-1 pourrait aussi médier l'inhibition d'un activateur de Tec. Dans cet ordre d'idées, il a été démontré que les PTKs de la famille *Src* peuvent phosphoryler et activer les kinases de la famille *Tec* (Miller, A. T. et Berg, L. J., 2002). Sachant que la kinase Csk (régulateur négatif des kinases *Src*) peut s'associer à dok-1, il est possible que dok-1 recrute Csk à proximité des kinases de la famille *Src* (Neet, K. et Hunter, T., 1995; Catipovic, B., Schneck, J. P. *et al.*, 1996). Csk phosphoryle ensuite la tyrosine régulatrice des kinases de la famille *Src* de sorte que celles-ci deviennent catalytiquement inactives. Les kinases *Src* inactives ne peuvent donc plus phosphoryler et activer la kinase Tec.

6.3 *dok-1* dans un modèle d'activation

À ce jour, la majorité des travaux effectués sur la signalisation induite par la ligation du co-récepteur CD2 indique que cette voie de stimulation régule positivement l'activation du lymphocyte T. Cependant, nous montrons clairement que la ligation du co-récepteur CD2 induit la phosphorylation de dok-1, une molécule qui régule négativement certains aspects de la signalisation cellulaire. La phosphorylation de dok-1 est aussi observable suite à la ligation du co-récepteur CD28, une molécule aussi impliquée dans l'activation cellulaire. Pour expliquer le rôle négatif joué par dok-1 dans le cadre d'une co-stimulation via CD2 ou CD28, il faut d'abord envisager dok-1 comme une molécule qui intervient dans différentes étapes de l'activation cellulaire. Dok-1 pourrait agir lors du contact initial entre la cellule T et la CPA afin d'empêcher le déclenchement d'une réponse cellulaire. En effet, la molécule CD2 est exprimée constitutivement sur les lymphocytes T et son ligand (CD58) est exprimée de manière ubiquiste. Il est donc nécessaire que les voies d'activation déclenchées par ce co-récepteur soient sous un contrôle strict. Advenant le contraire, les cellules T seraient activées en permanence. Une autre possibilité, non exclusive, serait que dok-1 intervienne plus tard dans la cascade de signalisation pour atténuer la réponse cellulaire (figure 14).

6.3.1 dok-1 dans la génération d'un seuil d'activation

Lorsque la cellule T rencontre une CPA, l'interaction entre CD2 et CD58 contribue à la formation d'une zone de contact entre les 2 cellules afin de favoriser l'interaction entre le TCR et les complexes peptides/CMH. Toutefois, afin d'assurer l'activation spécifique du lymphocyte T, il est essentiel que toute stimulation partielle due à des agonistes partiels ou une reconnaissance partielle entre le complexe peptide/CMH et le TCR soit rapidement étouffée. Comme nous l'avons vu, la ligation de CD2 induit aussi la phosphorylation et le recrutement membranaire de dok-1 laquelle est impliquée dans la régulation négative des voies de signalisation induites par la ligation du complexe TCR/CD3.

Nous proposons donc que la présence de dok-1 au niveau des zones de contact entre la cellule T et la CPA lors de l'étape de balayage soit à la base d'un système de régulation qui permettrait de contrebalancer les activations partielles déclenchées lors de l'initiation de l'activation de la cellule T. Parallèlement, la co-stimulation de la cellule T via CD28 servirait aussi à empêcher l'activation de la cellule T tant et aussi longtemps que le signal généré par le complexe TCR/peptide/CMH ne soit pas suffisamment puissant pour interrompre la phosphorylation de dok-1 (figure 14-1).

6.3.2 dok-1 et la stimulation via le TCR

L'activation de la cellule T se produirait lorsque l'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH induirait un signal suffisamment puissant pour briser l'inhibition du signal généré par la présence de dok-1 phosphorylée sur tyrosine. En effet, nous avons noté qu'une stimulation double CD3 et CD2 du lymphocyte T diminue considérablement le degré de phosphorylation de dok-1 (résultats non publiés). Le même phénomène est observé suite à une stimulation double CD3 et CD28 (Michel, F., Attal-Bonnefoy, G. *et al.*, 2001). De plus, dans des cellules T qui surexpriment des niveaux élevés de dok-1, la phosphorylation de dok-1 est constitutive. Cependant, une stimulation via CD3 de ces cellules T parvient à diminuer le degré de phosphorylation de dok-1 (figure 1/article II). L'inhibition de la phosphorylation de dok-1 pourrait être médiée par l'activation d'une phosphatase, l'inactivation d'une kinase spécifique, l'inhibition du recrutement membranaire de dok-1 ou encore l'inhibition de sa phosphorylation à la membrane. Ainsi, l'absence

de phosphorylation de dok-1 corrèlerait avec la perte de la régulation négative de la cellule T et l'activation cellulaire due à la ligation du TCR (figure 14-2).

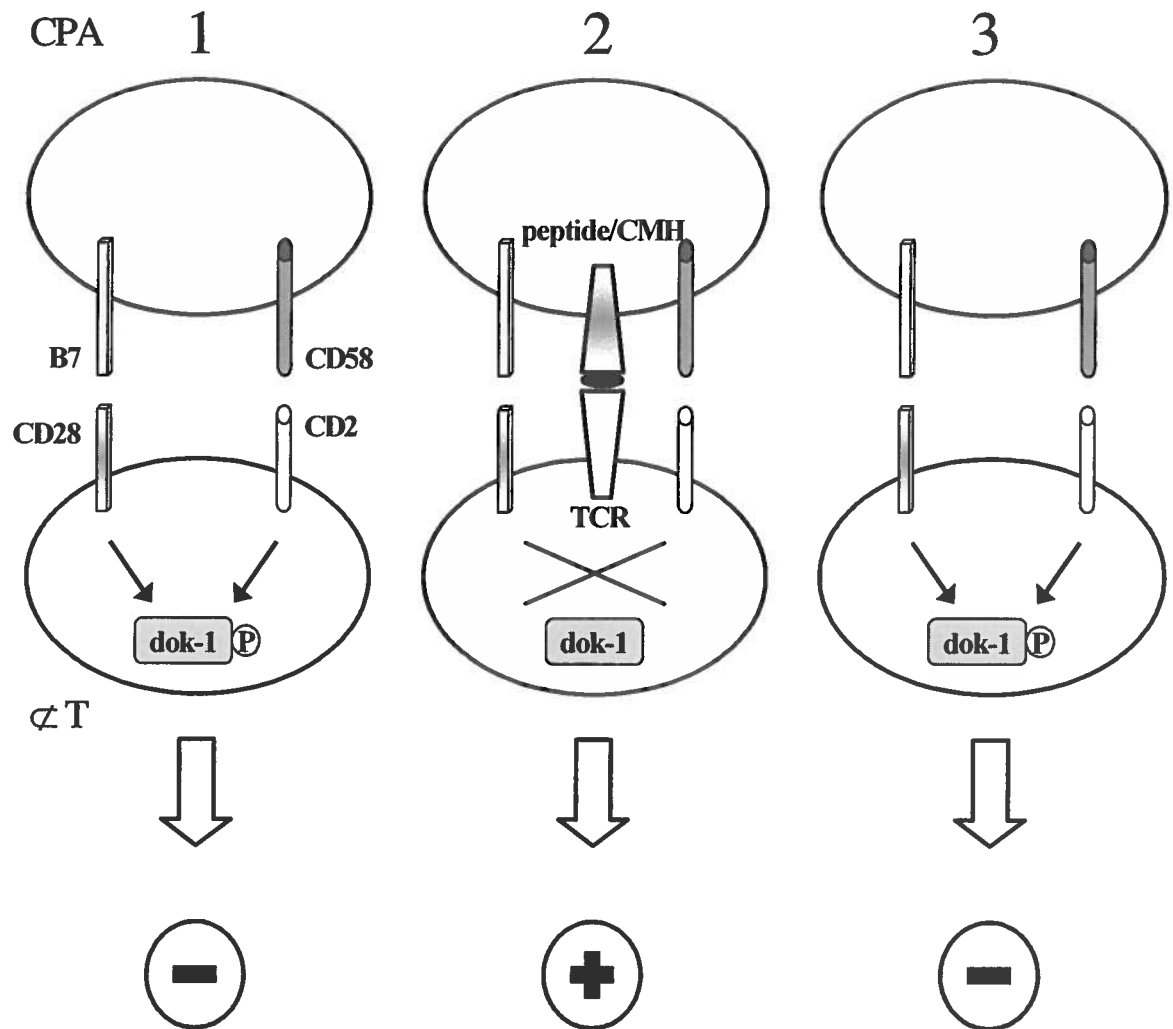


Figure 14 *Dok-1 dans un modèle d'activation.*

1. Initiation du contact.
2. Activation via le TCR.
3. Terminaison du signal d'activation.

6.3.3 dok-1 dans la terminaison du signal

Le signal généré par la stimulation de la cellule T via le TCR/CD3 doit être régulé à la baisse pour permettre à la cellule de retourner à son stade basal d'activation. La diminution du signal généré par le TCR suite à la diminution du contact peptide/CMH ou suite à l'expression de récepteurs d'inhibition tel CTLA-4 permettrait de nouveau la phosphorylation de dok-1. Par la suite, les mécanismes de régulation négative orchestrés par dok-1 seraient sollicités à nouveau pour permettre la terminaison du signal. De cette façon, la signalisation via CD2 et CD28, plus précisément la phosphorylation de dok-1 et son recrutement à la membrane dans ces conditions, pourrait aussi représenter un type de régulation utilisé par la cellule T lors de la terminaison du signal alors qu'il y a toujours contact entre la CPA et le lymphocyte T (figure 14-3).

6.4 *dok-1 dans le réarrangement du cytosquelette*

Le contact cellulaire observé entre la CPA et le lymphocyte T est en partie médié par l'interaction entre le co-récepteur CD2 et la molécule CD58. L'interaction entre ces deux protéines donne lieu au phénomène de balayage. Brièvement, les multiples interactions CD2/CD58 contribuent à maintenir le contact entre le lymphocyte et la CPA. La zone de contact entre les deux cellules permet ainsi aux TCRs du lymphocyte T de balayer la surface du CPA dans le but d'établir un contact productif avec un complexe peptide/CMH. Par la suite, l'augmentation de la concentration locale des complexes TCR/peptide/CMH induit l'activation du lymphocyte T. Nous avons observé que la ligation du co-récepteur CD2 par des anticorps induit la phosphorylation de dok-1 et surtout l'augmentation de la quantité de dok-1 recrutée à la membrane. Comme nous en avons préalablement discuté, la phosphorylation sur tyrosine de dok-1 est cruciale pour la fonction adaptatrice de la molécule. Une fois phosphorylée, la protéine dok-1 peut s'associer à différentes protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette comme Nck, RasGAP, CrkL et Cas (Bhat, A., Johnson, K. J. *et al.*, 1998; Noguchi, T., Matozaki, T. *et al.*, 1999; Wick, M. J., Dong, L. Q. *et al.*, 2001; Abramson, J., Rozenblum, G. *et al.*, 2003). C'est pourquoi, le recrutement de dok-1 à la membrane pourrait aussi servir à recruter ces protéines chargées de réguler le réarrangement du cytosquelette. Dok-1 pourrait donc

coordonner l'activité de ces protéines pour contrôler le cytosquelette dans le but de maintenir le contact entre le lymphocyte et la CPA tout en permettant aux molécules du TCR de diffuser à travers la zone de contact afin d'effectuer le balayage de la surface de la CPA.

La molécule dok-1 agirait donc à deux endroits lors du déclenchement de l'activation du lymphocyte T. Le premier volet concerne la réorganisation du cytosquelette de manière à orchestrer le mouvement des molécules de surface du lymphocyte T. Ceci dans le but de permettre le balayage de la surface de la CPA afin d'atteindre la qualité du signal nécessaire pour induire l'activation du lymphocyte T suite à la formation des complexes TCR/peptide/CMH spécifiques. Dok-1 pourrait aussi être impliquée dans le maintien de la zone de contact entre le lymphocyte T et la CPA. Le recrutement à la membrane de la protéine dok-1 phosphorylée fournit un système de contrôle qui atténue la transduction des signaux déclenchée par le contact du lymphocyte T avec la CPA. Ceci constitue le deuxième volet de la fonction de dok-1 et à pour effet d'optimiser l'étape de balayage en limitant le nombre de faux signaux induits lors de la formation de complexes TCR/peptide/CMH non productifs.

7 CONCLUSION

Les travaux présentés dans cet ouvrage ont permis de caractériser, du moins en partie, la fonction de dok-1 dans les cellules T. Ceci dans le but d'éclaircir les mécanismes d'activation de la cellule T lorsqu'elle entre en contact avec un antigène spécifique. Nous avons donc déterminé que la phosphorylation de dok-1 suite à une stimulation CD2 représente une composante de la régulation négative du signal d'activation cellulaire. De plus, dok-1 agit possiblement au niveau de la régulation du cytosquelette du lymphocyte T. À l'aide des mutations de dok-1 au niveau du domaine PTB et de la tyrosine 146, nous pouvons suggérer que la dimérisation de dok-1 et possiblement son oligomérisation avec dok-2 représente une étape critique à la fonction régulatrice des protéines dok dans le lymphocyte T. De plus, la grande quantité de sites d'interaction protéine : protéine présents sur ces molécules en font des candidates idéales pour orchestrer la formation de complexes de protéines impliqués dans divers aspects de la signalisation. Cependant, avant d'attribuer un rôle

central à dok-1 dans la formation de ces complexes lors d'une stimulation CD2, beaucoup de questions restent encore sans réponse.

Quelle est la localisation de dok-1 dans le lymphocyte T?

Pour mieux définir le rôle de dok-1, il serait avantageux de déterminer la localisation subcellulaire de dok-1 dans le temps suite à la ligation du co-récepteur CD2 du lymphocyte T. Par exemple, l'identification de la localisation de dok-1 au niveau de la synapse confirmerait le rôle important de dok-1 dans la régulation de l'activité de la cellule T lors de son activation. Une telle relocalisation de dok-1 confirmerait le rôle de dok-1 dans la régulation négative de l'activation, dans la réorganisation et le maintien du cytosquelette au point de contact et enfin dans l'établissement d'un seuil d'activation chez le lymphocyte T. Suite à la ligation du co-récepteur CD2, il serait aussi intéressant de déterminer si dok-1 est recrutée à proximité de CD2 ou encore s'il y a une interaction directe entre ces 2 molécules.

Existe-t-il une interaction entre les protéines recrutées au co-récepteur CD2 et les molécules de la famille dok?

Les protéines CD2BP1 et CD2AP sont toutes deux des protéines qui peuvent moduler la réorganisation du cytosquelette en réponse à la ligation de CD2. Compte tenu que dok-1 agit aussi sur le cytosquelette et que ces 3 protéines sont recrutées à la membrane suite à une stimulation CD2, il est possible que ces protéines interagissent ensembles pour former un complexe protéique ou encore que leurs fonctions respectives se complètent afin de participer au réarrangement du cytosquelette. Alternativement, CD2BP1 et CD2AP pourraient être recrutées à proximité de CD2 via une interaction avec la molécule dok-1 phosphorylée sur tyrosine. En effet, dok-1 possède un domaine PH susceptible de permettre le recrutement de complexes incluant dok-1 à la membrane.

Quelle est l'importance des autres motifs d'interactions basés sur des tyrosines dans la fonction de dok-1?

Nous n'avons muté que 5 des 15 tyrosines présentes dans la séquence de dok-1, la protéine possède donc 10 autres tyrosines potentiellement impliquées dans des interactions de type SH2 avec des molécules de signalisation présentes dans le lymphocyte T. Il serait intéressant de poursuivre la série de mutations débutée durant

ma thèse afin de mesurer l'importance de chaque site dans la fonction de dok-1 suite à la ligation du co-récepteur CD2. Alternativement, des analyses biochimiques et protéomiques plus poussées basées sur le « phosphopeptide mapping » des formes sauvages et mutantes de dok-1 pourraient contribuer à déterminer les sites primaires de phosphorylation de dok-1 suite à une stimulation via CD2. L'identification de ces sites pourrait à son tour indiquer les protéines de signalisation vraisemblablement associées à dok-1 dans ces conditions d'activation. On pourrait ensuite envisager une démonstration formelle des ces interactions à l'aide de « pulldown assays » lesquels pourraient-être soumis à des études de spectrométrie de masse afin d'identifier de nouveaux partenaires de liaison de dok-1.

Quelle est l'importance des sites PxxP de dok-1 reconnus par les domaines SH3?

La protéine dok-1 possède aussi plusieurs séquences riches en prolines reconnues par les domaines d'interaction de type SH3. Dans cette optique, il devient intéressant d'envisager que la phosphorylation de dok-1 ne signifie pas nécessairement l'association de dok-1 avec une molécule. À ce sujet, rappelons que l'interaction entre dok-1 et les protéines de la famille Smad dans des cellules B est indépendante de la phosphorylation de dok-1 (Yamakawa, N., Tsuchida, K. *et al.*, 2002). Dans un même ordre d'idées, une étude qui explore les détails de l'interaction entre la kinase p50Csk et dok-1 dans des fibroblastes transformés par v-Src confirment une association phospho-indépendante entre ces 2 molécules (Catipovic, B., Schneck, J. P. *et al.*, 1996). Il en va de même avec une étude réalisée dans les macrophages qui indique que l'association entre la PTPase SHP1 et dok-1 ne dépend pas de la phosphorylation de cette dernière (Berg, K. L., Siminovitch, K. A. *et al.*, 1999). Alternativement, il serait aussi possible de considérer que la phosphorylation de dok-1 cause un changement dans la conformation de dok-1 afin d'exposer des sites reconnus par des domaines d'interaction de type SH3.

Est-ce que dok-1 est uniquement impliquée dans les voies de stimulation via CD2?

Il est injuste de prétendre que dok-1 n'a un effet que sur les voies d'activation déclenchées par la ligation de CD2 puisque la surexpression de dok-1 diminue aussi l'activité du facteur de transcription NF-AT de même que la production d'IL-2 suite à la ligation de CD3 (article II/figure5). Ceci pourrait-être relié à la diminution partielle

de la mobilisation de calcium tel qu'observé suite à une stimulation via CD3 (article II/figure3). En effet, en comparant la mobilisation de calcium chez la cellule parentale et la cellule qui surexprime dok-1, on observe que le plateau observé lors de la mobilisation de calcium n'est pas maintenu aussi longtemps dans un clone qui surexprime dok-1. L'absence d'un signal calcique prolongé engendrerait ainsi la diminution de l'activation du facteur de transcription NF-AT laquelle se répercuterait sur la production d'IL-2. Alternativement, la présence de dok-1 pourrait inhiber d'autres composantes de la signalisation mise en branle lors d'une stimulation via CD3. L'effet direct se répercuterait sur le taux de transcription du gène d'IL-2 lequel dépend de l'activité de multiples facteurs de transcription.

Dok-1 est-elle impliquée dans la signalisation induite par d'autres molécules de la famille CD2?

Dok-1 pourrait aussi représenter une molécule dont la fonction est impliquée dans les voies de signalisation déclenchées par la ligation des récepteurs de surface de la famille CD2. En effet, la phosphorylation de dok-1 est aussi observable suite à la stimulation du récepteur SLAM, une molécule d'activation impliquée dans la polarisation de la réponse T vers un phénotype Th1 (Latour, S., Gish, G. *et al.*, 2001). Il faudrait vérifier si la phosphorylation de dok-1 est observable suite à la ligation des récepteurs de la famille CD2 dans différents types cellulaires. Par exemple, la ligation de CD2 ou de 2B4 sur les cellules NK ou encore la ligation des Ly-9 et CD84 sur les cellules B. La ligation des récepteurs 2B4 et Ly-9 chez les lymphocytes T pourrait représenter des voies additionnelles qui induisent la phosphorylation de dok-1.

Enfin, l'étude de souris déficientes pour dok-1 ou dok-2 devrait permettre de mieux définir le rôle de la régulation négative par les molécules de la famille dok dans le contrôle des réponses immunitaires et inflammatoires.

8 RÉFÉRENCES

- Abramson, J. et I. Pecht. 2002. «Clustering the mast cell function-associated antigen (MAFA) leads to tyrosine phosphorylation of p62Dok and SHIP and affects RBL-2H3 cell cycle». Immunol Lett, vol. 82, no. 1-2, p. 23-28.
- Abramson, J., G. Rozenblum et I. Pecht. 2003. «Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor». Eur J Immunol, vol. 33, no. 1, p. 85-91.
- Alcover, A., C. Alberini, O. Acuto, L. K. Clayton, C. Transy, G. C. Spagnoli, P. Moingeon, P. Lopez et E. L. Reinherz. 1988. «Interdependence of CD3-Ti and CD2 activation pathways in human T lymphocytes». Embo J, vol. 7, no. 7, p. 1973-1977.
- Alexandropoulos, K., G. Cheng et D. Baltimore. 1995. «Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92, no. 8, p. 3110-3114.
- Alexandropoulos, K., L. T. Donlin, L. Xing et A. G. Regelmann. 2003. «Sin: good or bad? A T lymphocyte perspective». Immunol Rev, vol. 192, p. 181-195.
- Anton van der Merwe, P., S. J. Davis, A. S. Shaw et M. L. Dustin. 2000. «Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition». Semin Immunol, vol. 12, no. 1, p. 5-21.
- Appleby, M. W., J. A. Gross, M. P. Cooke, S. D. Levin, X. Qian et R. M. Perlmutter. 1992. «Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn». Cell, vol. 70, no. 5, p. 751-763.
- Appleman, L. J. et V. A. Boussiotis. 2003. «T cell anergy and costimulation». Immunol Rev, vol. 192, p. 161-180.

Arulanandam, A. R., P. Moingeon, M. F. Concino, M. A. Recny, K. Kato, H. Yagita, S. Koyasu et E. L. Reinherz. 1993. «A soluble multimeric recombinant CD2 protein identifies CD48 as a low affinity ligand for human CD2: divergence of CD2 ligands during the evolution of humans and mice». J Exp Med, vol. 177, no. 5, p. 1439-1450.

Ashwell, J. D. et R. D. Klusner. 1990. «Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor». Annu Rev Immunol, vol. 8, p. 139-167.

August, A. et B. Dupont. 1994. «Activation of src family kinase lck following CD28 crosslinking in the Jurkat leukemic cell line». Biochem Biophys Res Commun, vol. 199, no. 3, p. 1466-1473.

August, A. et B. Dupont. 1994. «CD28 of T lymphocytes associates with phosphatidylinositol 3-kinase». Int Immunol, vol. 6, no. 5, p. 769-774.

August, A., S. Gibson, Y. Kawakami, T. Kawakami, G. B. Mills et B. Dupont. 1994. «CD28 is associated with and induces the immediate tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase ITK/EMT in the human Jurkat leukemic T-cell line». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 91, no. 20, p. 9347-9351.

Bachmann, M. F., M. Barner et M. Kopf. 1999. «CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation». J Exp Med, vol. 190, no. 10, p. 1383-1392.

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, no. 5308, p. 1930-1934.

Bell, G. M., J. B. Bolen et J. B. Imboden. 1992. «Association of Src-like protein tyrosine kinases with the CD2 cell surface molecule in rat T lymphocytes and natural killer cells». Mol Cell Biol, vol. 12, no. 12, p. 5548-5554.

- Bell, G. M., J. Fargnoli, J. B. Bolen, L. Kish et J. B. Imboden. 1996. «The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2». J Exp Med, vol. 183, no. 1, p. 169-178.
- Berg, K. L., K. A. Siminovitch et E. R. Stanley. 1999. «SHP-1 regulation of p62(DOK) tyrosine phosphorylation in macrophages». J Biol Chem, vol. 274, no. 50, p. 35855-35865.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman et P. Lipp. 1998. «Calcium--a life and death signal». Nature, vol. 395, no. 6703, p. 645-648.
- Bhat, A., K. J. Johnson, T. Oda, A. S. Corbin et B. J. Druker. 1998. «Interactions of p62(dok) with p210(bcr-abl) and Bcr-Abl-associated proteins». J Biol Chem, vol. 273, no. 48, p. 32360-32368.
- Bi, K., Y. Tanaka, N. Coudronniere, K. Sugie, S. Hong, M. J. van Stipdonk et A. Altman. 2001. «Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation». Nat Immunol, vol. 2, no. 6, p. 556-563.
- 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, no. 1, p. 87-98.
- Borner, C. 2003. «The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions». Mol Immunol, vol. 39, no. 11, p. 615-647.
- Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, J. D. Griffin, G. S. Gray, J. G. Gribben et L. M. Nadler. 1994. «CD2 is involved in maintenance and reversal of human alloantigen-specific clonal anergy». J Exp Med, vol. 180, no. 5, p. 1665-1673.
- Bradshaw, J. D., P. Lu, G. Leytze, J. Rodgers, G. L. Schieven, K. L. Bennett, P. S. Linsley et S. E. Kurtz. 1997. «Interaction of the cytoplasmic tail of CTLA-4 (CD152)

with a clathrin-associated protein is negatively regulated by tyrosine phosphorylation». Biochemistry, vol. 36, no. 50, p. 15975-15982.

Brauweiler, A. M., I. Tamir et J. C. Cambier. 2000. «Bilevel control of B-cell activation by the inositol 5-phosphatase SHIP». Immunol Rev, vol. 176, p. 69-74.

Brdicka, T., D. Pavlistova, A. Leo, E. Bruyns, V. Korinek, P. Angelisova, J. Scherer, A. Shevchenko, I. Hilgert, J. Cerny, K. Drbal, Y. Kuramitsu, B. Kornacker, V. Horejsi et B. Schraven. 2000. «Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation». J Exp Med, vol. 191, no. 9, p. 1591-1604.

Briggs, S. D., S. S. Bryant, R. Jove, S. D. Sanderson et T. E. Smithgall. 1995. «The Ras GTPase-activating protein (GAP) is an SH3 domain-binding protein and substrate for the Src-related tyrosine kinase, Hck». J Biol Chem, vol. 270, no. 24, p. 14718-14724.

Bromley, S. K., A. Iaboni, S. J. Davis, A. Whitty, J. M. Green, A. S. Shaw, A. Weiss et M. L. Dustin. 2001. «The immunological synapse and CD28-CD80 interactions». Nat Immunol, vol. 2, no. 12, p. 1159-1166.

Brondello, J. M., A. Brunet, J. Pouyssegur et F. R. McKenzie. 1997. «The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade». J Biol Chem, vol. 272, no. 2, p. 1368-1376.

Brott, B. K., S. Decker, J. Shafer, J. B. Gibbs et R. Jove. 1991. «GTPase-activating protein interactions with the viral and cellular Src kinases». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 88, no. 3, p. 755-759.

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». J Immunol, vol. 162, no. 10, p. 5813-5820.

Bullens, D. M., K. Rafiq, L. Charitidou, X. Peng, A. Kasran, P. A. Warmerdam, S. W. Van Gool et J. L. Ceuppens. 2001. «Effects of co-stimulation by CD58 on human T cell cytokine production: a selective cytokine pattern with induction of high IL-10 production». Int Immunol, vol. 13, no. 2, p. 181-191.

Bunnell, S. C., M. Diehn, M. B. Yaffe, P. R. Findell, L. C. Cantley et L. J. Berg. 2000. «Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade». J Biol Chem, vol. 275, no. 3, p. 2219-2230.

Burack, W. R., A. M. Cheng et A. S. Shaw. 2002. «Scaffolds, adaptors and linkers of TCR signaling: theory and practice». Curr Opin Immunol, vol. 14, no. 3, p. 312-316.

Burack, W. R., K. H. Lee, A. D. Holdorf, M. L. Dustin et A. S. Shaw. 2002. «Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse». J Immunol, vol. 169, no. 6, p. 2837-2841.

Burkhard, P., J. Stetefeld et S. V. Strelkov. 2001. «Coiled coils: a highly versatile protein folding motif». Trends Cell Biol, vol. 11, no. 2, p. 82-88.

Burns, L. A., L. M. Karnitz, S. L. Sutor et R. T. Abraham. 1993. «Interleukin-2-induced tyrosine phosphorylation of p52shc in T lymphocytes». J Biol Chem, vol. 268, no. 24, p. 17659-17661.

Carmo, A. M., D. W. Mason et A. D. Beyers. 1993. «Physical association of the cytoplasmic domain of CD2 with the tyrosine kinases p56lck and p59fyn». Eur J Immunol, vol. 23, no. 9, p. 2196-2201.

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, no. 2, p. 197-204.

Cary, L. A. et J. A. Cooper. 2000. «Molecular switches in lipid rafts». Nature, vol. 404, no. 6781, p. 945, 947.

Catipovic, B., J. P. Schneck, M. E. Brummet, D. G. Marsh et T. Rafnar. 1996. «Csk is constitutively associated with a 60-kDa tyrosine-phosphorylated protein in human T cells». J Biol Chem, vol. 271, no. 16, p. 9698-9703.

Chambers, C. A., M. S. Kuhns, J. G. Egen et J. P. Allison. 2001. «CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy». Annu Rev Immunol, vol. 19, p. 565-594.

Chinenov, Y. et T. K. Kerppola. 2001. «Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity». Oncogene, vol. 20, no. 19, p. 2438-2452.

Chow, L. M., M. Fournel, D. Davidson et A. Veillette. 1993. «Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk». Nature, vol. 365, no. 6442, p. 156-160.

Chu, D. H., C. T. Morita et A. Weiss. 1998. «The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development». Immunol Rev, vol. 165, p. 167-180.

Chu, D. H., H. Spits, J. F. Peyron, R. B. Rowley, J. B. Bolen et A. Weiss. 1996. «The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling». Embo J, vol. 15, no. 22, p. 6251-6261.

Chu, Y., P. A. Soliski, R. Khosravi-Far, C. J. Der et K. Kelly. 1996. «The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation». J Biol Chem, vol. 271, no. 11, p. 6497-6501.

Chuang, E., T. S. Fisher, R. W. Morgan, M. D. Robbins, J. M. Duerr, M. G. Vander Heiden, J. P. Gardner, J. E. Hambor, M. J. Neveu et C. B. Thompson. 2000. «The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A». Immunity, vol. 13, no. 3, p. 313-322.

Cloutier, J. F. et A. Veillette. 1999. «Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase». J Exp Med, vol. 189, no. 1, p. 111-121.

Cong, F., B. Yuan et S. P. Goff. 1999. «Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling». Mol Cell Biol, vol. 19, no. 12, p. 8314-8325.

Corr, M., A. E. Slanetz, L. F. Boyd, M. T. Jelonek, S. Khilko, B. K. al-Ramadi, Y. S. Kim, S. E. Maher, A. L. Bothwell et D. H. Margulies. 1994. «T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity». Science, vol. 265, no. 5174, p. 946-949.

Crabtree, G. R. 1999. «Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT». Cell, vol. 96, no. 5, p. 611-614.

Crabtree, G. R. et E. N. Olson. 2002. «NFAT signaling: choreographing the social lives of cells». Cell, vol. 109 Suppl, p. S67-79.

Crawley, J. B., L. Rawlinson, F. V. Lali, T. H. Page, J. Saklatvala et B. M. Foxwell. 1997. «T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation». J Biol Chem, vol. 272, no. 23, p. 15023-15027.

Czar, M. J., J. Debnath, E. M. Schaeffer, C. M. Lewis et P. L. Schwartzberg. 2001. «Biochemical and genetic analyses of the Tec kinases Itk and Rlk/Txk». Biochem Soc Trans, vol. 29, no. Pt 6, p. 863-867.

Danielian, S., A. Alcover, L. Polissard, M. Stefanescu, O. Acuto, S. Fischer et R. Fagard. 1992. «Both T cell receptor (TcR)-CD3 complex and CD2 increase the tyrosine kinase activity of p56lck. CD2 can mediate TcR-CD3-independent and CD45-dependent activation of p56lck». Eur J Immunol, vol. 22, no. 11, p. 2915-2921.

Danielian, S., R. Fagard, A. Alcover, O. Acuto et S. Fischer. 1991. «The tyrosine kinase activity of p56lck is increased in human T cells activated via CD2». Eur J Immunol, vol. 21, no. 8, p. 1967-1970.

Dasso, M. 2002. «The Ran GTPase: theme and variations». Curr Biol, vol. 12, no. 14, p. R502-508.

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». Mol Cell Biol, vol. 23, no. 6, p. 2017-2028.

Davidson, D. et A. Veillette. 2001. «PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates». Embo J, vol. 20, no. 13, p. 3414-3426.

Davis, S. J., S. Ikemizu, M. K. Wild et P. A. van der Merwe. 1998. «CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition». Immunol Rev, vol. 163, p. 217-236.

Deckert, M., S. Tartare-Deckert, C. Couture, T. Mustelin et A. Altman. 1996. «Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product». Immunity, vol. 5, no. 6, p. 591-604.

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». J Biol Chem, vol. 273, no. 9, p. 4827-4830.

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)». J Exp Med, vol. 194, no. 3, p. 275-284.

Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, C. C. Goodnow et J. I. Healy. 1997. «Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration». Nature, vol. 386, no. 6627, p. 855-858.

Dong, C., D. D. Yang, M. Wisk, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis et R. A. Flavell. 1998. «Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1». Science, vol. 282, no. 5396, p. 2092-2095.

Donovan, S., K. M. Shannon et G. Bollag. 2002. «GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling». Biochim Biophys Acta, vol. 1602, no. 1, p. 23-45.

Drevot, P., C. Langlet, X. J. Guo, A. M. Bernard, O. Colard, J. P. Chauvin, R. Lasserre et H. T. He. 2002. «TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts». Embo J, vol. 21, no. 8, p. 1899-1908.

Dustin, M. L. et J. A. Cooper. 2000. «The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling». Nat Immunol, vol. 1, no. 1, p. 23-29.

Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen et A. S. Shaw. 1998. «A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts». Cell, vol. 94, no. 5, p. 667-677.

Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, E. Y. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn et J. C. Stone. 1998. «RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs». Science, vol. 280, no. 5366, p. 1082-1086.

Ebinu, J. O., S. L. Stang, C. Teixeira, D. A. Bottorff, J. Hooton, P. M. Blumberg, M. Barry, R. C. Bleakley, H. L. Ostergaard et J. C. Stone. 2000. «RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras». Blood, vol. 95, no. 10, p. 3199-3203.

Egen, J. G. et J. P. Allison. 2002. «Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength». Immunity, vol. 16, no. 1, p. 23-35.

Egen, J. G., M. S. Kuhns et J. P. Allison. 2002. «CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy». Nat Immunol, vol. 3, no. 7, p. 611-618.

Elder, M. E., D. Lin, J. Clever, A. C. Chan, T. J. Hope, A. Weiss et T. G. Parslow. 1994. «Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase». Science, vol. 264, no. 5165, p. 1596-1599.

Ellis, C., X. Q. Liu, D. Anderson, N. Abraham, A. Veillette et T. Pawson. 1991. «Tyrosine phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins in lymphoid and fibroblast cells expressing lck». Oncogene, vol. 6, no. 6, p. 895-901.

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, no. 6256, p. 377-381.

Ellmeier, W., S. Jung, M. J. Sunshine, F. Hatam, Y. Xu, D. Baltimore, H. Mano et D. R. Littman. 2000. «Severe B cell deficiency in mice lacking the tec kinase family members Tec and Btk». J Exp Med, vol. 192, no. 11, p. 1611-1624.

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, no. 1, p. 40-45.

Feller, S. M. 2001. «Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles». Oncogene, vol. 20, no. 44, p. 6348-6371.

Finco, T. S., T. Kadlecsek, W. Zhang, L. E. Samelson et A. Weiss. 1998. «LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway». Immunity, vol. 9, no. 5, p. 617-626.

Foletta, V. C., D. H. Segal et D. R. Cohen. 1998. «Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1». J Leukoc Biol, vol. 63, no. 2, p. 139-152.

Freund, C., R. Kuhne, H. Yang, S. Park, E. L. Reinherz et G. Wagner. 2002. «Dynamic interaction of CD2 with the GYF and the SH3 domain of compartmentalized effector molecules». Embo J, vol. 21, no. 22, p. 5985-5995.

Fukai, I., R. E. Hussey, R. Sunder-Plassmann et E. L. Reinherz. 2000. «A critical role for p59(fyn) in CD2-based signal transduction». Eur J Immunol, vol. 30, no. 12, p. 3507-3515.

Garcia, K. C., C. A. Scott et A. Brunmark. 1996. «CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes». nature, vol. 384, p. 577-581.

Garrity, P. A., D. Chen, E. V. Rothenberg et B. J. Wold. 1994. «Interleukine-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors». Mol Cell Biol, vol. 14, p. 2159-2169.

Gassmann, M., K. E. Amrein, N. A. Flint, B. Schraven et P. Burn. 1994. «Identification of a signaling complex involving CD2, zeta chain and p59fyn in T lymphocytes». Eur J Immunol, vol. 24, no. 1, p. 139-144.

- Germain, R. N. et I. Stefanova. 1999. «The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation». Annu Rev Immunol, vol. 17, p. 467-522.
- Gibson, S., A. August, D. Branch, B. Dupont et G. M. Mills. 1996. «Functional LCK Is required for optimal CD28-mediated activation of the TEC family tyrosine kinase EMT/ITK». J Biol Chem, vol. 271, no. 12, p. 7079-7083.
- Gibson, S., A. August, Y. Kawakami, T. Kawakami, B. Dupont et G. B. Mills. 1996. «The EMT/ITK/TSK (EMT) tyrosine kinase is activated during TCR signaling: LCK is required for optimal activation of EMT». J Immunol, vol. 156, no. 8, p. 2716-2722.
- Giurisato, E., D. P. McIntosh, M. Tassi, A. Gamberucci et A. Benedetti. 2003. «T cell receptor can be recruited to a subset of plasma membrane rafts, independently of cell signaling and attendant to raft clustering». J Biol Chem, vol. 278, no. 9, p. 6771-6778.
- Gjorloff-Wingren, A., M. Saxena, S. Williams, D. Hammi et T. Mustelin. 1999. «Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP». Eur J Immunol, vol. 29, no. 12, p. 3845-3854.
- Gollob, J. A., J. Li, H. Kawasaki, J. F. Daley, C. Groves, E. L. Reinherz et J. Ritz. 1996. «Molecular interaction between CD58 and CD2 counter-receptors mediates the ability of monocytes to augment T cell activation by IL-12». J Immunol, vol. 157, no. 5, p. 1886-1893.
- Gollob, J. A., J. Li, E. L. Reinherz et J. Ritz. 1995. «CD2 regulates responsiveness of activated T cells to interleukin 12». J Exp Med, vol. 182, no. 3, p. 721-731.

- Gollob, J. A. et J. Ritz. 1996. «CD2-CD58 interaction and the control of T-cell interleukin-12 responsiveness. Adhesion molecules link innate and acquired immunity». Ann N Y Acad Sci, vol. 795, p. 71-81.
- Gomez, J., A. Gonzalez, A. C. Martinez et A. Rebollo. 1998. «IL-2-induced cellular events». Crit Rev Immunol, vol. 18, no. 3, p. 185-220.
- Gomez, J., A. C. Martinez, A. Gonzalez, A. Garcia et A. Rebollo. 1998. «The Bcl-2 gene is differentially regulated by IL-2 and IL-4: role of the transcription factor NF-AT». Oncogene, vol. 17, no. 10, p. 1235-1243.
- Gould, K. L., J. R. Woodgett, J. A. Cooper, J. E. Buss, D. Shalloway et T. Hunter. 1985. «Protein kinase C phosphorylates pp60src at a novel site». Cell, vol. 42, no. 3, p. 849-857.
- Gout, I., G. Middleton, J. Adu, N. N. Ninkina, L. B. Drobot, V. Filonenko, G. Matsuka, A. M. Davies, M. Waterfield et V. L. Buchman. 2000. «Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein». Embo J, vol. 19, no. 15, p. 4015-4025.
- Green, J. M., V. Karpitskiy, S. L. Kimzey et A. S. Shaw. 2000. «Coordinate regulation of T cell activation by CD2 and CD28». J Immunol, vol. 164, no. 7, p. 3591-3595.
- 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». J Cell Biol, vol. 154, no. 2, p. 345-354.
- Guckel, B., C. Berek, M. Lutz, P. Altevogt, V. Schirmacher et B. A. Kyewski. 1991. «Anti-CD2 antibodies induce T cell unresponsiveness in vivo». J Exp Med, vol. 174, no. 5, p. 957-967.

- Guerini, D. 1997. «Calcineurin: not just a simple protein phosphatase». Biochem Biophys Res Commun, vol. 235, no. 2, p. 271-275.
- 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». J Cell Biol, vol. 158, no. 1, p. 115-125.
- Hahn, W. C. et B. E. Bierer. 1993. «Separable portions of the CD2 cytoplasmic domain involved in signaling and ligand avidity regulation». J Exp Med, vol. 178, no. 5, p. 1831-1836.
- Hahn, W. C., Y. Rosenstein, V. Calvo, S. J. Burakoff et B. E. Bierer. 1992. «A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T-cell responsiveness to antigen». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 89, no. 15, p. 7179-7183.
- Harriague, J., P. Debre, G. Bismuth et P. Hubert. 2000. «Priming of CD2-induced p62Dok tyrosine phosphorylation by CD3 in Jurkat T cells». Eur J Immunol, vol. 30, no. 11, p. 3319-3328.
- Hatada, M. H., X. Lu, E. R. Laird, J. Green, J. P. Morgenstern, M. Lou, C. S. Marr, T. B. Phillips, M. K. Ram, K. Theriault et et al. 1995. «Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor». Nature, vol. 377, no. 6544, p. 32-38.
- Hemmings, B. A. 1997. «PH domains--a universal membrane adapter». Science, vol. 275, no. 5308, p. 1899.
- Henning, G., M. S. Kraft, T. Derfuss, R. Pirzer, G. de Saint-Basile, G. Aversa, B. Fleckenstein et E. Meinl. 2001. «Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity». Eur J Immunol, vol. 31, no. 9, p. 2741-2750.

Heyeck, S. D., H. M. Wilcox, S. C. Bunnell et L. J. Berg. 1997. «Lck phosphorylates the activation loop tyrosine of the Itk kinase domain and activates Itk kinase activity». J Biol Chem, vol. 272, no. 40, p. 25401-25408.

Holdorf, A. D., J. M. Green, S. D. Levin, M. F. Denny, D. B. Straus, V. Link, P. S. Changelian, P. M. Allen et A. S. Shaw. 1999. «Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3 domain of Lck are required for T cell costimulation». J Exp Med, vol. 190, no. 3, p. 375-384.

Hosomi, Y., K. Shii, W. Ogawa, H. Matsuba, M. Yoshida, Y. Okada, K. Yokono, M. Kasuga, S. Baba et R. A. Roth. 1994. «Characterization of a 60-kilodalton substrate of the insulin receptor kinase». J Biol Chem, vol. 269, no. 15, p. 11498-11502.

Hu, C. D., K. Kariya, G. Kotani, M. Shirouzu, S. Yokoyama et T. Kataoka. 1997. «Coassociation of Rap1A and Ha-Ras with Raf-1 N-terminal region interferes with ras-dependent activation of Raf-1». J Biol Chem, vol. 272, no. 18, p. 11702-11705.

Hu, K. Q. et J. Settleman. 1997. «Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation». Embo J, vol. 16, no. 3, p. 473-483.

Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos et R. A. Kroczeck. 1999. «ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28». Nature, vol. 397, no. 6716, p. 263-266.

Ingham, R. J., M. Holgado-Madruga, C. Siu, A. J. Wong et M. R. Gold. 1998. «The Gab1 protein is a docking site for multiple proteins involved in signaling by the B cell antigen receptor». J Biol Chem, vol. 273, no. 46, p. 30630-30637.

Innocenti, M., P. Tenca, E. Frittoli, M. Fareta, A. Tocchetti, P. P. Di Fiore et G. Scita. 2002. «Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac». J Cell Biol, vol. 156, p. 125-136.

- Isakov, N. et A. Altman. 2002. «Protein kinase C(theta) in T cell activation». Annu Rev Immunol, vol. 20, p. 761-794.
- Isakov, N., R. L. Wange, W. H. Burgess, J. D. Watts, R. Aebersold et L. E. Samelson. 1995. «ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity». J Exp Med, vol. 181, no. 1, p. 375-380.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara et T. Honjo. 1992. «Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death». Embo J, vol. 11, no. 11, p. 3887-3895.
- Itoh, Y., B. Hemmer, R. Martin et R. N. Germain. 1999. «Serial TCR engagement and down-modulation by peptide:MHC molecule ligands: relationship to the quality of individual TCR signaling events». J Immunol, vol. 162, no. 4, p. 2073-2080.
- Jain, J., C. Loh et A. Rao. 1995. «Transcriptional regulation of the IL-2 gene». Curr Opin Immunol, vol. 7, no. 3, p. 333-342.
- Janes, P. W., S. C. Ley, A. I. Magee et P. S. Kabouridis. 2000. «The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling». Semin Immunol, vol. 12, no. 1, p. 23-34.
- Johnson, S. A., C. M. Pleiman, L. Pao, J. Schneringer, K. Hippen et J. C. Cambier. 1995. «Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases». J Immunol, vol. 155, no. 10, p. 4596-4603.
- Jones, N., S. H. Chen, C. Sturk, Z. Master, J. Tran, R. S. Kerbel et D. J. Dumont. 2003. «A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function». Mol Cell Biol, vol. 23, no. 8, p. 2658-2668.

- Jones, N. et D. J. Dumont. 1998. «The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R». Oncogene, vol. 17, no. 9, p. 1097-1108.
- 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». Curr Biol, vol. 9, no. 18, p. 1057-1060.
- Jordan, M. S., A. L. Singer et G. A. Koretzky. 2003. «Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells». Nat Immunol, vol. 4, no. 2, p. 110-116.
- Kabouridis, P. S., J. Janzen, A. L. Magee et S. C. Ley. 2000. «Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes». Eur J Immunol, vol. 30, no. 3, p. 954-963.
- Kadlecek, T. A., N. S. van Oers, L. Lefrancois, S. Olson, D. Finlay, D. H. Chu, K. Connolly, N. Killeen et A. Weiss. 1998. «Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development». J Immunol, vol. 161, no. 9, p. 4688-4694.
- Kanner, S. B., N. K. Damle, J. Blake, A. Aruffo et J. A. Ledbetter. 1992. «CD2/LFA-3 ligation induces phospholipase-C gamma 1 tyrosine phosphorylation and regulates CD3 signaling». J Immunol, vol. 148, no. 7, p. 2023-2029.
- Kashige, N., N. Carpino et R. Kobayashi. 2000. «Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 5, p. 2093-2098.
- Kato, K., M. Koyanagi et H. Okada. 1992. «CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation». J Exp Med, vol. 176, p. 1241.
- Kawabuchi, M., Y. Satomi, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Nada, K. Nagai, A. Tarakhovsky et M. Okada. 2000. «Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases». Nature, vol. 404, no. 6781, p. 999-1003.

Kawahara, A., Y. Minami, T. Miyazaki, J. N. Ihle et T. Taniguchi. 1995. «Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor gamma-chain-associated Jak3 in the IL-2-induced c-fos and c-myc, but not bcl-2, gene induction». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92, no. 19, p. 8724-8728.

Killeen, N., S. G. Stuart et D. R. Littman. 1992. «Development and function of T cells in mice with a disrupted CD2 gene». Embo J, vol. 11, no. 12, p. 4329-4336.

Kimura, T., H. Sakamoto, E. Appella et R. P. Siraganian. 1996. «Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides». Mol Cell Biol, vol. 16, no. 4, p. 1471-1478.

King, P. D., A. Sadra, A. Han, X. R. Liu, R. Sunder-Plassmann, E. L. Reinherz et B. Dupont. 1996. «CD2 signaling in T cells involves tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase, EMT/ITK/TSK». Int Immunol, vol. 8, no. 11, p. 1707-1714.

King, P. D., A. Sadra, J. M. Teng, G. M. Bell et B. Dupont. 1998. «CD2-mediated activation of the Tec-family tyrosine kinase ITK is controlled by proline-rich stretch-4 of the CD2 cytoplasmic tail». Int Immunol, vol. 10, no. 7, p. 1009-1016.

Kirsch, K. H., M. M. Georgescu, S. Ishimaru et H. Hanafusa. 1999. «CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 96, no. 11, p. 6211-6216.

Kirsch, K. H., M. M. Georgescu, T. Shishido, W. Y. Langdon, R. B. Birge et H. Hanafusa. 2001. «The adapter type protein CMS/CD2AP binds to the proto-oncogenic protein c-Cbl through a tyrosine phosphorylation-regulated Src homology 3 domain interaction». J Biol Chem, vol. 276, no. 7, p. 4957-4963.

Klasen, S., F. Pages, J. F. Peyron, D. A. Cantrell et D. Olive. 1998. «Two distinct regions of the CD28 intracytoplasmic domain are involved in the tyrosine phosphorylation of Vav and GTPase activating protein-associated p62 protein». Int Immunol, vol. 10, no. 4, p. 481-489.

Kolanus, W., C. Romeo et B. Seed. 1993. «T cell activation by clustered tyrosine kinases». Cell, vol. 74, no. 1, p. 171-183.

Kong, G., M. Dalton, J. B. Wardenburg, D. Straus, T. Kurosaki et A. C. Chan. 1996. «Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function». Mol Cell Biol, vol. 16, no. 9, p. 5026-5035.

Koretzky, G. A. et P. S. Myung. 2001. «Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins». Nat Rev Immunol, vol. 1, no. 2, p. 95-107.

Kosugi, A., F. Hayashi, D. R. Liddicoat, K. Yasuda, S. Saitoh et T. Hamaoka. 2001. «A pivotal role of cysteine 3 of Lck tyrosine kinase for localization to glycolipid-enriched microdomains and T cell activation». Immunol Lett, vol. 76, no. 2, p. 133-138.

Kouhara, H., Y. R. Hadari, T. Spivak-Kroizman, J. Schilling, D. Bar-Sagi, I. Lax et J. Schlessinger. 1997. «A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway». Cell, vol. 89, no. 5, p. 693-702.

Kundig, T. M., A. Shahinian, K. Kawai, H. W. Mittrucker, E. Sebzda, M. F. Bachmann, T. W. Mak et P. S. Ohashi. 1996. «Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells». Immunity, vol. 5, no. 1, p. 41-52.

Kupfer, H., C. R. Monks et A. Kupfer. 1994. «Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions». J Exp Med, vol. 179, no. 5, p. 1507-1515.

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». Nat Immunol, vol. 2, no. 8, p. 681-690.

Law, C. L., K. A. Chandran, S. P. Sidorenko et E. A. Clark. 1996. «Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk». Mol Cell Biol, vol. 16, no. 4, p. 1305-1315.

Le Guinier, S., E. Le Dréan et N. Labarrière. 1998. «LFA-3 co-stimulates cytokine secretion by cytotoxic activation». Eur J Immunol, vol. 22, p. 1467.

Lee, K. H., A. R. Dinner, C. Tu, G. Campi, S. Raychaudhuri, R. Varma, T. N. Sims, W. R. Burack, H. Wu, J. Wang, O. Kanagawa, M. Markiewicz, P. M. Allen, M. L. Dustin, A. K. Chakraborty et A. S. Shaw. 2003. «The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation». Science, vol. 302, no. 5648, p. 1218-1222.

Lee, K. H., A. D. Holdorf, M. L. Dustin, A. C. Chan, P. M. Allen et A. S. Shaw. 2002. «T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation». Science, vol. 295, no. 5559, p. 1539-1542.

Lemay, S., D. Davidson, S. Latour et A. Veillette. 2000. «Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling». Mol Cell Biol, vol. 20, no. 8, p. 2743-2754.

Lenschow, D. J., T. L. Walunas et J. A. Bluestone. 1996. «CD28/B7 system of T cell costimulation». Annu Rev Immunol, vol. 14, p. 233-258.

Letourneur, F. et R. D. Klausner. 1992. «Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon». Science, vol. 255, no. 5040, p. 79-82.

- Lewis, C. M., C. Broussard, M. J. Czar et P. L. Schwartzberg. 2001. «Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development». Curr Opin Immunol, vol. 13, no. 3, p. 317-325.
- Li, J., K. Nishizawa, W. An, R. E. Hussey, F. E. Lialios, R. Salgia, R. Sunder-Plassmann et E. L. Reinherz. 1998. «A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion». Embo J, vol. 17, no. 24, p. 7320-7336.
- Lin, H., J. E. Hutchcroft, C. E. Andoniou, M. Kamoun, H. Band et B. E. Bierer. 1998. «Association of p59(fyn) with the T lymphocyte costimulatory receptor CD2. Binding of the Fyn Src homology (SH) 3 domain is regulated by the Fyn SH2 domain». J Biol Chem, vol. 273, no. 31, p. 19914-19921.
- Lin, H., J. C. Rathmell, G. S. Gray, C. B. Thompson, J. M. Leiden et M. L. Alegre. 1998. «Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28». J Exp Med, vol. 188, no. 1, p. 199-204.
- Lin, J. et A. Weiss. 2001. «Identification of the minimal tyrosine residues required for linker for activation of T cell function». J Biol Chem, vol. 276, no. 31, p. 29588-29595.
- Liu, S. K., D. M. Berry et C. J. McGlade. 2001. «The role of Gads in hematopoietic cell signalling». Oncogene, vol. 20, no. 44, p. 6284-6290.
- Liu, S. K., N. Fang, G. A. Koretzky et C. J. McGlade. 1999. «The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors». Curr Biol, vol. 9, no. 2, p. 67-75.
- Liu, Y. et L. R. Rohrschneider. 2002. «The gift of Gab». FEBS Lett, vol. 515, no. 1-3, p. 1-7.

Lock, P., F. Casagrande et A. R. Dunn. 1999. «Independent SH2-binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase-activating protein and Nck». J Biol Chem, vol. 274, no. 32, p. 22775-22784.

Lucas, J. A., A. T. Miller, L. O. Atherly et L. J. Berg. 2003. «The role of Tec family kinases in T cell development and function». Immunol Rev, vol. 191, p. 119-138.

Lupher, M. L., Jr., K. A. Reedquist, S. Miyake, W. Y. Langdon et H. Band. 1996. «A novel phosphotyrosine-binding domain in the N-terminal transforming region of Cbl interacts directly and selectively with ZAP-70 in T cells». J Biol Chem, vol. 271, no. 39, p. 24063-24068.

Maa, M. C., T. H. Leu, B. J. Trandel, J. H. Chang et S. J. Parsons. 1994. «A protein that is highly related to GTPase-activating protein-associated p62 complexes with phospholipase C gamma». Mol Cell Biol, vol. 14, no. 8, p. 5466-5473.

Macian, F., C. Lopez-Rodriguez et A. Rao. 2001. «Partners in transcription: NFAT and AP-1». Oncogene, vol. 20, no. 19, p. 2476-2489.

Marie-Cardine, A., H. Kirchgessner, E. Bruyns, A. Shevchenko, M. Mann, F. Autschbach, S. Ratnofsky, S. Meuer et B. Schraven. 1999. «SHP2-interacting transmembrane adaptor protein (SIT), a novel disulfide-linked dimer regulating human T cell activation». J Exp Med, vol. 189, no. 8, p. 1181-1194.

Martelli, M. P., J. Boomer, M. Bu et B. E. Bierer. 2001. «T cell regulation of p62(dok) (Dok1) association with Crk-L». J Biol Chem, vol. 276, no. 49, p. 45654-45661.

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 J, vol. 20, no. 21, p. 5919-5928.

Mayer, B. J. et M. J. Eck. 1995. «SH3 domains. Minding your p's and q's». Curr Biol, vol. 5, no. 4, p. 364-367.

McGlade, J., B. Brunkhorst, D. Anderson, G. Mbamalu, J. Settleman, S. Dedhar, M. Rozakis-Adcock, L. B. Chen et T. Pawson. 1993. «The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion». Embo J, vol. 12, no. 8, p. 3073-3081.

McGuire, K. L. et M. Iacobelli. 1997. «Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells». J Immunol, vol. 159, no. 3, p. 1319-1327.

Meuer, S. C., R. E. Hussey, M. Fabbi, D. Fox, O. Acuto, K. A. Fitzgerald, J. C. Hodgdon, J. P. Protentis, S. F. Schlossman et E. L. Reinherz. 1984. «An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein». Cell, vol. 36, p. 897-906.

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, no. 6, p. 935-945.

Miletic, A. V., M. Swat, K. Fujikawa et W. Swat. 2003. «Cytoskeletal remodeling in lymphocyte activation». Curr Opin Immunol, vol. 15, no. 3, p. 261-268.

Miller, A. T. et L. J. Berg. 2002. «New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system». Curr Opin Immunol, vol. 14, no. 3, p. 331-340.

Miller, G. T., P. S. Hochman, W. Meier, R. Tizard, S. A. Bixler, M. D. Rosa et B. P. Wallner. 1993. «Specific interaction of lymphocyte function-associated antigen 3 with CD2 can inhibit T cell responses». J Exp Med, vol. 178, no. 1, p. 211-222.

Moarefi, I., M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C. H. Lee, J. Kuriyan et W. T. Miller. 1997. «Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement». Nature, vol. 385, no. 6617, p. 650-653.

Molina, T. J., K. Kishihara, D. P. Siderovski, W. van Ewijk, A. Narendran, E. Timms, A. Wakeham, C. J. Paige, K. U. Hartmann, A. Veillette et al. 1992. «Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck». Nature, vol. 357, no. 6374, p. 161-164.

Mollereau, B., M. Deckert, O. Deas, F. Rieux-Laucat, F. Hirsch, A. Bernard, A. Fischer, D. H. Lynch, B. Charpentier, F. Le Deist et A. Senik. 1996. «CD2-induced apoptosis in activated human peripheral T cells: a Fas-independent pathway that requires early protein tyrosine phosphorylation». J Immunol, vol. 156, no. 9, p. 3184-3190.

Montixi, C., C. Langlet, A. M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M. A. Wurbel, J. P. Chauvin, M. Pierres et H. T. He. 1998. «Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains». Embo J, vol. 17, no. 18, p. 5334-5348.

Motto, D. G., S. E. Ross, J. Wu, L. R. Hendricks-Taylor et G. A. Koretzky. 1996. «Implication of the GRB2-associated phosphoprotein SLP-76 in T cell receptor-mediated interleukin 2 production». J Exp Med, vol. 183, no. 4, p. 1937-1943.

Myung, P. S., G. S. Derimanov, M. S. Jordan, J. A. Punt, Q. H. Liu, B. A. Judd, E. E. Meyers, C. D. Sigmund, B. D. Freedman et G. A. Koretzky. 2001. «Differential requirement for SLP-76 domains in T cell development and function». Immunity, vol. 15, no. 6, p. 1011-1026.

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». Mol Cell Biol, vol. 15, no. 9, p. 4908-4920.

Nel, A. E., L. K. Taylor, G. P. Kumar, S. Gupta, S. C. Wang, K. Williams, O. Liao, K. Swanson et G. E. Landreth. 1994. «Activation of a novel serine/threonine kinase that

phosphorylates c-Fos upon stimulation of T and B lymphocytes via antigen and cytokine receptors». J Immunol, vol. 152, no. 9, p. 4347-4357.

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, no. 1, 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». J Biol Chem, vol. 275, no. 19, p. 14590-14597.

Nemorin, J. G., P. Laporte, G. Berube et P. Duplay. 2001. «p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells». J Immunol, vol. 166, no. 7, p. 4408-4415.

Nishida, K., Y. Yoshida, M. Itoh, T. Fukada, T. Ohtani, T. Shirogane, T. Atsumi, M. Takahashi-Tezuka, K. Ishihara, M. Hibi et T. Hirano. 1999. «Gab-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T- and B-cell antigen receptors». Blood, vol. 93, no. 6, p. 1809-1816.

Noguchi, 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 J, vol. 18, no. 7, p. 1748-1760.

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». J Biol Chem, vol. 271, no. 3, p. 1591-1598.

Ohno, H., C. Ushiyama, M. Taniguchi, R. N. Germain et T. Saito. 1991. «CD2 can mediate TCR/CD3-independent T cell activation». J Immunol, vol. 146, no. 11, p. 3742-3746.

Ojaniemi, M. et K. Vuori. 1997. «Epidermal growth factor modulates tyrosine phosphorylation of p130Cas. Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase and actin cytoskeleton». J Biol Chem, vol. 272, no. 41, p. 25993-25998.

Okamura, H., J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J. P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, X. Zhang, J. Qin, P. G. Hogan et A. Rao. 2000. «Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity». Mol Cell, vol. 6, no. 3, p. 539-550.

Otheki, T., M. Parsons, A. Zakarian, R. G. Jones, L. T. Nguyen, J. R. Woodgett et P. S. Ohashi. 2000. «Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3». J Exp Med, vol. 192, no. 11, p. 99-104.

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». J Immunol, vol. 168, no. 9, p. 4430-4439.

Paul, W. E., A. M. Silverstein, J. K. Frazer, J. D. Capra, J. A. Berzofsky, I. J. Berkower, S. L. Epstein, E. E. Max, F. Melchers, A. Rolink, A. L. DeFranco, D. H. Margulies, R. N. Germain, M. M. Davis, Y. H. Chien, C. Benoist, D. Mathis, A. Weiss, J. A. Bluestone, R. Khattri et G. A. van Seventer. 1998. Fundamental Immunology 4th edition. vol. electronic version 2.15, Lippincott Williams and Wilkin.

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». Biochem J, vol. 356, no. Pt 2, p. 461-471.

Petrelli, A., G. F. Gilestro, S. Lanzardo, P. M. Comoglio, N. Migone et S. Giordano. 2002. «The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met». Nature, vol. 416, no. 6877, p. 187-190.

Pfrepper, K. I., A. Marie-Cardine, L. Simeoni, Y. Kuramitsu, A. Leo, J. Spicka, I. Hilgert, J. Scherer et B. Schraven. 2001. «Structural and functional dissection of the cytoplasmic domain of the transmembrane adaptor protein SIT (SHP2-interacting transmembrane adaptor protein)». Eur J Immunol, vol. 31, no. 6, p. 1825-1836.

Pizzo, P. et A. Viola. 2003. «Lymphocyte lipid rafts: structure and function». Curr Opin Immunol, vol. 15, no. 3, p. 255-260.

Pratt, J. C., V. E. Igras, H. Maeda, S. Baksh, E. W. Gelfand, S. J. Burakoff, B. G. Neel et H. Gu. 2000. «Cutting edge: gab2 mediates an inhibitory phosphatidylinositol 3'-kinase pathway in T cell antigen receptor signaling». J Immunol, vol. 165, no. 8, p. 4158-4163.

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». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92, no. 19, p. 8891-8895.

Rao, A., C. Luo et P. G. Hogan. 1997. «Transcription factors of the NFAT family: regulation and function». Annu Rev Immunol, vol. 15, p. 707-747.

Ravichandran, K. S. et S. J. Burakoff. 1994. «The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation». J Biol Chem, vol. 269, no. 3, p. 1599-1602.

Resh, M. D. 1994. «Myristylation and palmitoylation of Src family members: The fats of the matter». Cell, vol. 76, p. 411-413.

Rudd, C. E. 1999. «Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling». Cell, vol. 96, no. 1, p. 5-8.

Rudd, C. E., E. K. Barber, K. E. Burgess, J. Y. Hahn, A. D. Odysseos, M. S. Sy et S. F. Schlossman. 1991. «Molecular analysis of the interaction of p56lck with the CD4 and CD8 antigens». Adv Exp Med Biol, vol. 292, p. 85-96.

Samelson, L. E., M. C. Fletcher, J. A. Ledbetter et C. H. June. 1990. «Activation of tyrosine phosphorylation in human T cells via the CD2 pathway. Regulation by the CD45 tyrosine phosphatase». J Immunol, vol. 145, p. 2448.

Sattler, M., S. Verma, Y. B. Pride, R. Salgia, L. R. Rohrschneider et J. D. Griffin. 2001. «SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL». J Biol Chem, vol. 276, no. 4, p. 2451-2458.

Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa et C. Terhorst. 1998. «The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM». Nature, vol. 395, no. 6701, p. 462-469.

Schaeffer, E. M., J. Debnath, G. Yap, D. McVicar, X. C. Liao, D. R. Littman, A. Sher, H. E. Varmus, M. J. Lenardo et P. L. Schwartzberg. 1999. «Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity». Science, vol. 284, no. 5414, p. 638-641.

Scott, J. E., V. A. Ruff et K. L. Leach. 1997. «Dynamic equilibrium between calcineurin and kinase activities regulates the phosphorylation state and localization of the nuclear factor of activated T-cells». Biochem J, vol. 324 (Pt 2), p. 597-603.

Selvaraj, P., M. L. Plunkett, M. L. Dustin, M. E. Sanders, S. Shaw et T. A. Springer. 1987. «The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3». Nature, vol. 326, p. 400.

Shahinian, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kundig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. S. Ohashi, C. B. Thompson et T. W. Mak. 1993. «Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice». Science, vol. 261, no. 5121, p. 609-612.

Shaulian, E. et M. Karin. 2001. «AP-1 in cell proliferation and survival». Oncogene, vol. 20, no. 19, p. 2390-2400.

Shaw, A. S. et M. L. Dustin. 1997. «Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation». Immunity, vol. 6, no. 4, p. 361-369.

Shimizu, Y., J. L. Mobley, L. D. Finkelstein et A. S. Chan. 1995. «A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of beta 1 integrin activity by the CD2 antigen». J Cell Biol, vol. 131, no. 6 Pt 2, p. 1867-1880.

Songyang, Z., K. L. Carraway, 3rd, M. J. Eck, S. C. Harrison, R. A. Feldman, M. Mohammadi, J. Schlessinger, S. R. Hubbard, D. P. Smith, C. Eng et et al. 1995. «Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling». Nature, vol. 373, no. 6514, p. 536-539.

Songyang, Z., S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider et et al. 1993. «SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences». Cell, vol. 72, no. 5, p. 767-778.

Songyang, Z., Y. Yamanashi, D. Liu et D. Baltimore. 2001. «Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signaling». J Biol Chem, vol. 276, no. 4, p. 2459-2465.

Soubeyran, P., K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W. Y. Langdon et I. Dikic. 2002. «Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors». Nature, vol. 416, no. 6877, p. 183-187.

Soula, M., B. Rothhut, L. Camoin, J. L. Guillaume, D. Strosberg, T. Vorherr, P. Burn, F. Meggio, S. Fischer et R. Fagard. 1993. «Anti-CD3 and phorbol ester induce distinct phosphorylated sites in the SH2 domain of p56lck». J Biol Chem, vol. 268, no. 36, p. 27420-27427.

Stefanova, I., B. Hemmer, M. Vergelli, R. Martin, W. E. Biddison et R. N. Germain. 2003. «TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways». Nat Immunol, vol. 4, no. 3, p. 248-254.

Stein, P. L., H. M. Lee, S. Rich et P. Soriano. 1992. «pp59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells». Cell, vol. 70, no. 5, p. 741-750.

Stinchcombe, J. C., G. Bossi, S. Booth et G. M. Griffiths. 2001. «The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges». Immunity, vol. 15, no. 5, p. 751-761.

Straus, D. B. et A. Weiss. 1992. «Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor». Cell, vol. 70, no. 4, p. 585-593.

Straus, D. B. et A. Weiss. 1993. «The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation». J Exp Med, vol. 178, no. 5, p. 1523-1530.

Su, B., M. Jacinto, M. Hibi, T. Kallunki, M. Karin et Y. Ben-Neriah. 1994. «JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes». Cell, vol. 77, p. 727-736.

Sudol, M., H. I. Chen, C. Bougeret, A. Einbond et P. Bork. 1995. «Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain». FEBS Lett, vol. 369, no. 1, p. 67-71.

Sun, X. J., P. Rothenberg, C. R. Kahn, J. M. Backer, E. Araki, P. A. Wilden, D. A. Cahill, B. J. Goldstein et M. F. White. 1991. «Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein». Nature, vol. 352, no. 6330, p. 73-77.

Suzu, S., M. Tanaka-Douzono, K. Nomaguchi, M. Yamada, H. Hayasawa, F. Kimura et K. Motoyoshi. 2000. «p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction». Embo J, vol. 19, no. 19, p. 5114-5122.

Sylla, B. S., K. Murphy, E. Cahir-McFarland, W. S. Lane, G. Mosialos et E. Kieff. 2000. «The X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SH2D1A associates with p62dok (Dok1) and activates NF-kappa B». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 13, p. 7470-7475.

Takai, Y., T. Sasaki et T. Matozaki. 2001. «Small GTP-binding proteins». Physiol Rev, vol. 81, no. 1, p. 153-208.

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 FcgammaRIIB signals in B cells». Immunity, vol. 12, no. 3, p. 347-358.

Tang, J., G. S. Feng et W. Li. 1997. «Induced direct binding of the adapter protein Nck to the GTPase-activating protein-associated protein p62 by epidermal growth factor». Oncogene, vol. 15, no. 15, p. 1823-1832.

Tangye, S. G., J. H. Phillips et L. L. Lanier. 2000. «The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells». Semin Immunol, vol. 12, no. 2, p. 149-157.

- Thompson, C. B., T. Lindsten, J. A. Ledbetter, S. L. Kunkel, H. A. Young, S. G. Emerson, J. M. Leiden et C. H. June. 1989. «CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 86, no. 4, p. 1333-1337.
- Tibaldi, E. V. et E. L. Reinherz. 2003. «CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities». Int Immunol, vol. 15, no. 3, p. 313-329.
- Timmerman, L. A., N. A. Clipstone, S. N. Ho, J. P. Northrop et G. R. Crabtree. 1996. «Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression». Nature, vol. 383, no. 6603, p. 837-840.
- Torgersen, K. M., T. Vang, H. Abrahamsen, S. Yaqub, V. Horejsi, B. Schraven, B. Rolstad, T. Mustelin et K. Tasken. 2001. «Release from tonic inhibition of T cell activation through transient displacement of C-terminal Src kinase (Csk) from lipid rafts». J Biol Chem, vol. 276, no. 31, p. 29313-29318.
- Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan et A. Lanzavecchia. 1995. «Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes». Nature, vol. 375, no. 6527, p. 148-151.
- 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, no. 10, p. 3406-3413.
- van Kooten, C. et J. Banchereau. 1997. «Immune regulation by cd40-cd40-l interactions». Front Biosci, vol. 2, p. d1-d11.
- Veri, M. C., K. E. DeBell, M. C. Seminarion, A. DiBaldassarre, I. Reischl, R. Rawat, L. Graham, C. Noviello, B. L. Rellahan et S. Miscia. 2001. «Membrane raft-

dependent regulation of phospholipase C gamma-1 activation in T lymphocytes». Mol Cell Biol, vol. 21, p. 6939-6950.

Verweij, C. L., M. Geerts et L. A. Aarden. 1991. «Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF-kB-like response element». J Biol Chem, vol. 266, no. 22, p. 14179-14182.

Vidal, M., V. Gigoux et C. Garbay. 2001. «SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents». Crit Rev Oncol Hematol, vol. 40, no. 2, p. 175-186.

Vuica, M., S. Desiderio et J. P. Schneck. 1997. «Differential effects of B cell receptor and B cell receptor-FcgammaRIIB1 engagement on docking of Csk to GTPase-activating protein (GAP)-associated p62». J Exp Med, vol. 186, no. 2, p. 259-267.

Vuori, K., H. Hirai, S. Aizawa et E. Ruoslahti. 1996. «Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases». Mol Cell Biol, vol. 16, no. 6, p. 2606-2613.

Vuori, K. et E. Ruoslahti. 1995. «Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix». J Biol Chem, vol. 270, no. 38, p. 22259-22262.

Wang, J. H., A. Smolyar, K. Tan, J. H. Liu, M. Kim, Z. Y. Sun, G. Wagner et E. L. Reinherz. 1999. «Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors». Cell, vol. 97, no. 6, p. 791-803.

Ward, S. G. et D. A. Cantrell. 2001. «Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation». Curr Opin Immunol, vol. 13, no. 3, p. 332-338.

Wardenburg, J. B., C. Fu, J. K. Jackman, H. Flotow, S. E. Wilkinson, D. H. Williams, R. Johnson, G. Kong, A. C. Chan et P. R. Findell. 1996. «Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function». J Biol Chem, vol. 271, no. 33, p. 19641-19644.

- Watanabe, S., H. Take, K. Takeda, Z. X. Yu, N. Iwata et S. Kajigaya. 2000. «Characterization of the CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes». Biochem Biophys Res Commun, vol. 278, no. 1, p. 167-174.
- Watts, J. D., J. S. Sanghera, S. L. Pelech et R. Aebersold. 1993. «Phosphorylation of serine 59 of p56lck in activated T cells». J Biol Chem, vol. 268, no. 31, p. 23275-23282.
- Weil, R., J. F. Cloutier, M. Fournel et A. Veillette. 1995. «Regulation of Zap-70 by Src family tyrosine protein kinases in an antigen-specific T-cell line». J Biol Chem, vol. 270, no. 6, p. 2791-2799.
- 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». J Biol Chem, vol. 276, no. 46, p. 42843-42850.
- Wild, M. K., A. Cambiaggi, M. H. Brown, E. A. Davies, H. Ohno, T. Saito et P. A. van der Merwe. 1999. «Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex». J Exp Med, vol. 190, no. 1, p. 31-41.
- Williams, B. L., K. L. Schreiber, W. Zhang, R. L. Wange, L. E. Samelson, P. J. Leibson et R. T. Abraham. 1998. «Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line». Mol Cell Biol, vol. 18, no. 3, p. 1388-1399.
- Winkler, D. G., I. Park, T. Kim, N. S. Payne, C. T. Walsh, J. L. Strominger et J. Shin. 1993. «Phosphorylation of Ser-42 and Ser-59 in the N-terminal region of the tyrosine kinase p56lck». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90, no. 11, p. 5176-5180.

Wolf, G., T. Trub, E. Ottinger, L. Groninga, A. Lynch, M. F. White, M. Miyazaki, J. Lee et S. E. Shoelson. 1995. «PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities». J Biol Chem, vol. 270, no. 46, p. 27407-27410.

Wolf, I., B. J. Jenkins, Y. Liu, M. Seiffert, J. M. Custodio, P. Young et L. R. Rohrschneider. 2002. «Gab3, a new DOS/Gab family member, facilitates macrophage differentiation». Mol Cell Biol, vol. 22, no. 1, p. 231-244.

Wong, J., D. Straus et A. C. Chan. 1998. «Genetic evidence of a role for Lck in T-cell receptor function independent or downstream of ZAP-70/Syk protein tyrosine kinases». Mol Cell Biol, vol. 18, no. 5, p. 2855-2866.

Wu, J., Q. Zhao, T. Kurosaki et A. Weiss. 1997. «The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction». J Exp Med, vol. 185, no. 10, p. 1877-1882.

Yablonski, D., T. Kadlecsek et A. Weiss. 2001. «Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT». Mol Cell Biol, vol. 21, no. 13, p. 4208-4218.

Yamakawa, N., K. Tsuchida et H. Sugino. 2002. «The rasGAP-binding protein, Dok-1, mediates activin signaling via serine/threonine kinase receptors». Embo J, vol. 21, no. 7, p. 1684-1694.

Yamanashi, Y. et D. Baltimore. 1997. «Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok». Cell, vol. 88, no. 2, p. 205-211.

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 Dev, vol. 14, no. 1, p. 11-16.

Yamasaki, S., K. Nishida, M. Hibi, M. Sakuma, R. Shiina, A. Takeuchi, H. Ohnishi, T. Hirano et T. Saito. 2001. «Docking protein Gab2 is phosphorylated by ZAP-70 and negatively regulates T cell receptor signaling by recruitment of inhibitory molecules». J Biol Chem, vol. 276, no. 48, p. 45175-45183.

Yamasaki, S., K. Nishida, M. Sakuma, D. Berry, C. J. McGlade, T. Hirano et T. Saito. 2003. «Gads/Grb2-mediated association with LAT is critical for the inhibitory function of Gab2 in T cells». Mol Cell Biol, vol. 23, no. 7, p. 2515-2529.

Yamasaki, S., M. Takamatsu et M. Iwashima. 1996. «The kinase, SH3, and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization». Mol Cell Biol, vol. 16, no. 12, p. 7151-7160.

Yang, H. et E. L. Reinherz. 2001. «Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction». J Biol Chem, vol. 276, no. 22, p. 18775-18785.

Yang, W. C., K. A. Ching, C. D. Tsoukas et L. J. Berg. 2001. «Tec kinase signaling in T cells is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and the Tec pleckstrin homology domain». J Immunol, vol. 166, no. 1, p. 387-395.

Yang, W. C., M. Ghiotto, B. Barbarat et D. Olive. 1999. «The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling». J Biol Chem, vol. 274, no. 2, p. 607-617.

Yang, W. C., M. Ghiotto, R. Castellano, Y. Collette, N. Auphan, J. A. Nunes et D. Olive. 2000. «Role of Tec kinase in nuclear factor of activated T cells signaling». Int Immunol, vol. 12, no. 11, p. 1547-1552.

Yang, W. C. et D. Olive. 1999. «Tec kinase is involved in transcriptional regulation of IL-2 and IL-4 in the CD28 pathway». Eur J Immunol, vol. 29, no. 6, p. 1842-1849.

Yasuda, K., A. Kosugi, F. Hayashi, S. Saitoh, M. Nagafuku, Y. Mori, M. Ogata et T. Hamaoka. 2000. «Serine 6 of Lck tyrosine kinase: a critical site for Lck

myristoylation, membrane localization, and function in T lymphocytes». J Immunol, vol. 165, no. 6, p. 3226-3231.

Yasuda, K., M. Nagafuku, T. Shima, M. Okada, T. Yagi, T. Yamada, Y. Minaki, A. Kato, S. Tani-Ichi, T. Hamaoka et A. Kosugi. 2002. «Cutting edge: Fyn is essential for tyrosine phosphorylation of Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glycolipid-enriched microdomains in lipid rafts in resting T cells». J Immunol, vol. 169, no. 6, p. 2813-2817.

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, no. 5510, p. 1987-1991.

Yoshida, K., Y. Yamashita, A. Miyazato, K. Ohya, A. Kitanaka, U. Ikeda, K. Shimada, T. Yamanaka, K. Ozawa et H. Mano. 2000. «Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1». J Biol Chem, vol. 275, no. 32, p. 24945-24952.

Zhang, W., B. J. Irvin, R. P. Tribble, R. T. Abraham et L. E. Samelson. 1999. «Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line». Int Immunol, vol. 11, no. 6, p. 943-950.

Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble et L. E. Samelson. 1998. «LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation». Cell, vol. 92, no. 1, p. 83-92.

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, no. 3, p. 323-332.

- Zhang, W., R. P. Tribble et L. E. Samelson. 1998. «LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation». Immunity, vol. 9, no. 2, p. 239-246.
- Zhang, W., R. P. Tribble, M. Zhu, S. K. Liu, C. J. McGlade et L. E. Samelson. 2000. «Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling». J Biol Chem, vol. 275, no. 30, p. 23355-23361.
- Zhao, C., D. H. Yu, R. Shen et G. S. Feng. 1999. «Gab2, a new pleckstrin homology domain-containing adapter protein, acts to uncouple signaling from ERK kinase to Elk-1». J Biol Chem, vol. 274, no. 28, p. 19649-19654.
- Zhu, M., E. Janssen, K. Leung et W. Zhang. 2002. «Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling». J Biol Chem, vol. 277, no. 48, p. 46151-46158.
- Zoller, K. E., I. A. MacNeil et J. S. Brugge. 1997. «Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction». J Immunol, vol. 158, no. 4, p. 1650-1659.