



HAL
open science

Régulation des voies de signalisation des lymphocytes T par la protéine SAP et ses partenaires

Richard Proust

► **To cite this version:**

Richard Proust. Régulation des voies de signalisation des lymphocytes T par la protéine SAP et ses partenaires. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T089 . tel-00914177

HAL Id: tel-00914177

<https://theses.hal.science/tel-00914177v1>

Submitted on 5 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE de Cancérologie : Biologie - Médecine - Santé

DISCIPLINE : Cancérologie

THÈSE DE DOCTORAT
Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

soutenue le 21 décembre 2012

par

Richard PROUST

Régulation des voies de signalisation des lymphocytes T par la protéine SAP et ses partenaires

Directeur de thèse : Jacques BERTOGLIO

Directeur de recherche, Inserm U749

Composition du jury :

Président du jury : Karim BENIHOUD
Rapporteurs : Sylvain LATOUR
Vincenzo DI-BARTOLO
Examineur : Alain TRAUTMANN
Membre invité : Franck GESBERT

Professeur, Université Paris Sud
Directeur de recherche, Inserm U768
Chargé de recherche, Institut Pasteur
Directeur de recherche, Institut Cochin
Maître de conférences, Université Paris Sud

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Messieurs Latour, Di Bartolo, Trautmann et Benihoud, pour m'avoir fait l'honneur de lire et juger mon travail de thèse.

Je voudrais exprimer ma plus profonde gratitude à mon encadrant, le Dr Franck Gesbert. Merci Franck d'avoir supervisé tout mon projet de thèse, ton intégrité nous a permis de mener à bien tous ces projets initiés pendant mon M2. Ta pédagogie a permis, je pense, de développer mon indépendance scientifique, ma capacité à discuter et à remettre en cause mes résultats et surtout, à penser à tous les contrôles nécessaires pour une manip ! Merci encore pour ta présence, ton investissement, tes explications claires dès que j'avais une question et pour ton écoute.

Je voudrais également remercier mon directeur de thèse, le Dr Jacques Bertoglio. Merci Jacques de m'avoir accueilli au sein de l'unité Inserm 749 à Châtenay-Malabry et de m'avoir donné les moyens d'effectuer ma thèse. Je me souviens encore, étudiant de M1 tout timide, de mes premiers pas dans la recherche. Merci pour m'avoir initié au monde de la recherche, mais la prochaine fois évite le double hybride comme première manip à tes futurs étudiants ! Je tiens également à remercier chaleureusement toutes les personnes passées et présentes de l'unité Inserm 749. Merci à Lylynn, Joël, Virginie, Aurélie, Perle, Cathy Nhim, Caro, Laeti, AST, Muriel, Martine, Alex, Diane, Philippe et tous les autres. Merci pour votre accueil à mon arrivée, votre aide, les soirées tardives au labo...

Je tiens à remercier également le Dr Eric Rubinstein, directeur de l'unité Inserm 1004. Merci Eric de m'avoir accueilli dans ton labo en plein milieu de ma thèse et de m'avoir donné les moyens de terminer de façon convenable mon travail de thèse sans mettre le mot tétraspanine dedans ! Je remercie également tous les membres de l'unité 1004, Claude, Martine, Stéphanie, Philippe, Jacqueline, Rosella, Clémentine, Joëlle pour les discussions productives ou leur aide lors des réunions de labo ou autour d'un café. J'ai une pensée pour Manu, Sabrina, Célia, Monica, Stèph, Lola, Sandy, Leslie, merci à tous pour votre soutien sans failles dans les bons (afters, barbecues...) ainsi que des les moments un peu plus difficiles.

Je voudrais remercier tous mes amis, tout d'abord les Dr Aline Chevallier et Vincent Oustric alias Pandi Panda, qui viennent récemment de me montrer la voie à suivre. Sans oublier bien sûr Gaël, Adeline, Alex, Chris, Laurent, Stèph, Mag, Vincent, Xav, Nico, Angie, JEF et tous les autres. Merci de votre soutien et de toutes les soirées qui m'ont fait oublier le quotidien.

Je voudrais remercier mes parents, mon frère et toutes ma famille qui ont stressé plus souvent que moi pendant ces quatre années. C'est grâce à vous si j'en suis arrivé jusque là, merci pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apporté.

Sommaire

Sommaire	2
Liste des figures	4
Liste des abréviations	5
Résumé	7
Abstract	8
Introduction bibliographique	9
I. Généralités sur les cellules T	12
1. Développement des lymphocytes T	12
2. Développement des cellules NKT	14
3. Fonctions biologiques des cellules T	16
a. Les lymphocytes T CD4+	16
i. Les lymphocytes Th1	17
i. Les lymphocytes Th2	17
ii. Les lymphocytes Th17	19
iii. Les lymphocytes Treg	20
b. Les lymphocytes T CD8+	21
c. Les cellules NKT	24
II. Mécanismes d'activation des lymphocytes T	26
1. Le récepteur des lymphocytes T (TCR)	26
a. Structure du TCR	26
b. Organisation des loci tcra et tcrb	27
c. Structure des chaînes α et β du TCR	28
2. Reconnaissance de l'antigène par le TCR	29
a. Les molécules du CMH	29
b. Structure des molécules du CMH	30
c. Rôle des co-récepteurs CD4 et CD8	31
3. Le complexe de signalisation TCR-CD3	32
4. Mécanismes généraux d'activation du récepteur à l'antigène	34
a. Le modèle d'agrégation	35
b. Le modèle de changement de conformation	36
c. Le modèle de ségrégation ou de redistribution	38
5. La synapse immunologique	39
6. Signalisation précoce induite par l'engagement du TCR	42
a. Mécanismes d'activation de la tyrosine kinase Lck	42
b. Lck est constitutivement associée à CD4 ou CD8	43
c. La protéine adaptatrice LAT orchestre la cascade de signalisation	44
i. Activation de la phospholipase C gamma (PLC- γ)	45
ii. Association des membres de la famille Grb2 sur LAT	46
iii. Slp-76 est la molécule centrale d'activation de la signalisation	47
7. Voies de signalisation activées par les seconds messagers	49
a. Voies de signalisation médiées par le diacylglycérol (DAG)	49
b. Voies de signalisation médiées par le calcium Ca^{2+}	51
8. L'engagement des récepteurs co-activateurs est nécessaire à l'activation des lymphocytes T	54

III. Les récepteurs de la famille SLAM et la protéine adaptatrice SAP	61
1. Généralités sur les récepteurs de la famille SLAM.....	61
2. Les motifs ITSM.....	63
3. Les protéines adaptatrices de la famille SAP.....	64
a. Généralités	64
b. La protéine SAP.....	64
i. Le gène sh2d1a.....	66
ii. Expression de SAP.....	66
iii. Propriétés du domaine SH2 de SAP.....	67
c. Les protéines EAT-2 et ERT	71
i. La protéine EAT-2	71
ii. La protéine ERT	72
4. Fonctions biologiques régulées par les récepteurs de la famille SLAM.....	73
a. Signalisation médiée par SLAM (CD150).....	73
b. Signalisation médiée par 2B4	76
c. Signalisation médiée par NTB-A	77
d. Signalisation médiée par les autres récepteurs SLAM.....	78
IV. Le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP).....	81
1. Généralités	81
2. Manifestations cliniques des patients XLP	82
a. La mononucléose infectieuse fulminante	82
b. Les syndromes lymphoprolifératifs.....	82
c. Les désordres immunoglobulinémiques.....	83
3. Mutations du gène sh2d1a	83
4. Défauts cellulaires dans le XLP.....	84
a. Réponses humorales défectueuses en absence de SAP	84
b. Défaut de cytotoxicité en absence de SAP	86
c. Défaut de développement des cellules NKT en absence de SAP	88
d. Défaut de l'apoptose des cellules activées en absence de SAP	89
Objectifs du travail.....	91
Résultats.....	94
Discussion générale et perspectives.....	112
Références bibliographiques	124

Liste des figures

Figure 1	Schéma simplifié du développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le thymus	13
Figure 2	Développement des cellules NKT dans le thymus.....	15
Figure 3	Fonctions des lymphocytes T CD4 ⁺	18
Figure 4	Schéma récapitulatif des voies apoptotiques initiées par les récepteurs de la famille du TNF et par la voie des granzymes.....	22
Figure 5	Structure cristallographique des chaînes $\alpha\beta$ du TCR.....	26
Figure 6	Organisation et réarrangements des loci tcra et tcrb.....	27
Figure 7	Schéma des régions variables des chaînes du TCR.....	29
Figure 8	Structure des molécules de classe I et II du CMH.....	30
Figure 9	Modèle des complexes pCMH-I/TCR/CD8 et pCMH-II/TCR/CD4.....	31
Figure 10	Structures cristallographiques de l'interaction entre les chaînes CD3 $\epsilon\delta$, CD3 $\epsilon\gamma$ et CD3 $\zeta\zeta$	33
Figure 11	Assemblage du complexe TCR-CD3.....	34
Figure 12	Les modèles d'agrégation.....	35
Figure 13	Le modèle de changement conformationnel.....	37
Figure 14	Le modèle de ségrégation.....	38
Figure 15	Structure de la synapse immunologique.....	41
Figure 16	Modèle de régulation de la tyrosine kinase Lck par phosphorylation réversible.....	42
Figure 17	Modèle d'activation de la tyrosine kinase ZAP-70.....	43
Figure 18	Voies de signalisation précoces induites par l'activation du TCR.....	45
Figure 19	Activation de NF- κ B dépendante de la PKC- θ	51
Figure 20	Motifs d'interactions protéiques présents dans la queue cytoplasmique de CD28.....	55
Figure 21	Voies de signalisation dépendantes du recrutement de la PI3Kinase sur CD28.....	56
Figure 22	Voies de signalisation induites par le recrutement des protéines adaptatrices sur CD28.....	59
Figure 23	Organisation du locus slam chez l'Homme et la souris.....	61
Figure 24	Membres des récepteurs de la famille SLAM humains.....	62
Figure 25	Organisation du gène sh2d1a et comparaison de séquences du domaine SH2 de SAP.....	65
Figure 26	Illustration des associations du domaine SH2 avec les motifs ITSM.....	68
Figure 27	Modèle de recrutement et d'activation de la tyrosine kinase Fyn sur le récepteur SLAM.....	70
Figure 28	Voies de signalisation médiées par les récepteurs de la famille SLAM et dépendantes de SAP.....	75
Figure 29	Fonctions immunitaires régulées par les associations SAP/SLAM-R.....	80
Figure 30	Défauts cellulaires retrouvés chez les patients XLP.....	90

Liste des abréviations

ADN	Acide Desoxyribonucléique
AICD	Activation-Induced Cell Death
APAF1	Apoptotic Activating Factor 1
Bcl2	B cell lymphoma 2
CAD	Caspase-Activated DNase
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary Determining Regions
CH	Calponin Homology
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CPL	Common Progenitor Lymphoid
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
CRACC	CD2-like-Receptor Activating Cytotoxic Cell
DAG	Diacylglycérol
DC	Dendritic Cells
DH	Duffy Binding Protein (DBP) Homology
DED	Death Effector Domain
DISC	Death-Inducing Signalling Complex
EAT-2	Ewing's sarcoma-Associated Transcrit-2
EBV	Epstein-Barr Virus
ETP	Early Thymic Progenitor
ERT	EAT-2-related transducer
FADD	Fas-Associated Death Domain
Gads	Grb2-related Adaptor Downstream of Shc
Grb2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
ICOS	Inducible Costimulatory molecule
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IFN- γ	Interféron gamma
IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate

ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
Itk	IL-2 inducible T-cell Kinase
ITSM	Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif
kDa	kiloDalton
LAT	Linker of Activated T cells
LT	Lymphocyte T
MAPKinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural Killer
NKT	NK T cells
NTB-A	NK-T-B cell Antigen
Pecam-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PH	Pleckstrin Homology
PI3Kinase	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PLC- γ	Phospholipase C gamma
PKC- θ	Protein Kinase C theta
PS	Phosphatidylsérine
RAG	Recombination Activating Genes
SLAM	Signaling Lymphocyte Activated Molecule
Slp-76	Src Homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SAP	SLAM-Associated Protein
Sos1	Son of sevenless homolog 1
TCR	T Cell Receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TNF-R	TNF Receptor
TRADD	TNF-R Associated Death Domain
XLP	X-linked Lymphoproliferative syndrom
ZAP-70	Zeta-chain-Associated Protein kinase 70

Résumé

Régulation des voies de signalisation des lymphocytes T par la protéine SAP et ses partenaires

Directeur de thèse : Dr Jacques Bertoglio

Co-encadrant : Dr Franck Gesbert

Une réponse immunitaire adéquate nécessite la participation coordonnée de plusieurs populations de cellules immunitaires, comme les lymphocytes T et B, les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules NK. L'activation de ces types cellulaires est modulée par différents récepteurs membranaires dont la fonction est de déclencher une cascade de signalisation.

L'activation des lymphocytes T, acteurs cruciaux de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative, s'initie par l'engagement du récepteur T (TCR). Plusieurs autres types de récepteurs participent à la modulation des réponses cellulaires. Ainsi, les récepteurs aux facteurs de croissance, aux cytokines et aux chimiokines ainsi que les molécules d'adhésion et les récepteurs de la famille SLAM (pour Signaling Lymphocyte Activation Molecule) influencent l'activation cellulaire. Des travaux récents ont montré que l'activation des récepteurs SLAM induit leur association avec les membres de la famille SAP et est nécessaire à l'induction d'une réponse humorale, au développement des cellules NKT ainsi qu'à la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T CD8 et les cellules NK. L'altération du gène *sh2d1a* codant pour SAP conduit à l'apparition du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X-1 (XLP-1). Les patients atteints de ce syndrome développent trois principaux phénotypes cliniques qui sont une mononucléose infectieuse fulminante, une dysgammaglobulinémie, et des désordres lymphoprolifératifs.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier les étapes précoces d'activation des lymphocytes T et de comprendre comment la protéine SAP, associée à d'autres protéines ou domaines protéiques intracellulaires, est impliquée dans la régulation de ces mécanismes d'activation. Mon travail s'est donc orienté vers l'identification de nouveaux partenaires de SAP, autres que les récepteurs SLAM, et qui nous permettraient de mieux définir la fonction de SAP dans la signalisation T.

Par une approche de biochimie, mon travail a permis de démontrer que SAP s'associe directement à la chaîne CD3 ζ du complexe TCR-CD3, régule la signalisation induite par l'activation du récepteur T et permet la sécrétion de cytokines. Enfin, par une approche de double hybride, nous avons identifié *Pecam-1* comme nouveau partenaire de SAP. Nous avons par la suite observé que l'association de SAP avec *Pecam-1* régule l'adhérence des lymphocytes T. Par ces deux études, mon travail de thèse a permis de démontrer l'implication de SAP dans de nouvelles voies de signalisation et permet de mieux comprendre les mécanismes dérégulés lors de l'absence de SAP.

Abstract

Regulation of T cell signaling pathways by the SAP protein and its partners

Thesis director: Dr Jacques Bertoglio
Co-supervisor: Dr Franck Gesbert

Immune responses need a coordinate involvement between different immune cell populations, as T and B cells, macrophages, dendritic cells or NK cells. Activation of these different cell populations is mediated by different receptors whose function is to initiate a signal transduction cascade.

T cell activation, a crucial event in adaptive immune response, begins with T cell receptor (TCR) triggering. A large number of receptors can modulate T cell responses. Thus, cytokines, chimiokines and growth factors receptors, adhesion molecules and SLAM (for Signaling Lymphocyte Activation Molecule) family receptors regulate cell activation. Recent works have shown that SLAM receptors triggering induce their association with SAP (for SLAM-Associated Protein) family members and is vital for humoral immunity, NKT cell development and T CD8⁺ and NK cells cytotoxicity. Mutations in *sh2d1a* gene, which code for SAP, are responsible of X-linked Lymphoproliferative-1 (XLP-1) syndrome. Patients, who suffer from this syndrome, develop three main clinical manifestations: a fulminant infectious mononucleosis, dysgammaglobulinemia and lymphoproliferative syndromes.

My thesis work was to study early steps of T cell activation and to understand how the SAP protein, associated with its partners, regulates these cellular mechanisms. Thus, my work was to identify new SAP partners, others than SLAM receptors, in order to better understand SAP function in T cell signaling.

With a biochemical approach, my work has demonstrated that SAP directly associates with CD3 ζ chain of TCR-CD3 complex, regulates cell signaling and cytokines secretion following TCR triggering. Finally, with a two-hybrid assay, we have identified the adhesion molecule Pecam-1 as a new SAP partner. Then, we have observed that SAP directly interacts with Pecam-1 to regulate T cell adhesion. During my thesis work, we have identified new cellular signaling pathways that are regulated by SAP and permit to better understand the cellular mechanisms that are affected when SAP is absent.

Introduction bibliographique

Les mécanismes contrôlés par les réponses immunes protègent contre la colonisation d'organismes étrangers non voulus et participent à la réparation des tissus et à la restauration de l'homéostasie après les dommages induits soit par l'invasion des pathogènes soit par la réponse de l'organisme contre ces pathogènes. Une activation adéquate du système immunitaire requiert la distinction par les cellules immunes des constituants normaux de l'organisme (le soi) qui doivent être préservés et des pathogènes (le non soi) qui doivent être éliminés.

Deux phases sont distinguées lors de la mise en place d'une réponse immunitaire contre un organisme pathogène. Tout d'abord, la première phase de la réponse immunitaire, appelée immunité innée, contribue à l'activation de cellules non spécifiques pour le pathogène. Les épithéliums constituent la première barrière à franchir pour les pathogènes. Une fois cette barrière franchie, les pathogènes entrent en contact avec les cellules de l'immunité innée qui se trouvent sous toutes les surfaces des épithéliums. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs particuliers, les PRR (pour Pattern Recognition Receptors ou récepteur de reconnaissance de motifs) qui leur permettent de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP (pour Pathogen-Associated Molecular Patterns) présents uniquement sur de nombreux pathogènes. Les cellules de l'immunité innée qui reconnaissent un pathogène vont s'activer et le phagocyter déclenchant alors une réaction inflammatoire avec recrutement dans le site infectieux de nouvelles cellules phagocytaires, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques, qui vont ingérer et détruire le pathogène. Les cellules NK (pour Natural Killer) sont des cellules spécialisées de l'immunité innée capables d'induire la mort des cellules tumorales ou infectées par un virus. Cependant, les pathogènes ont également acquis des mécanismes de résistance dans le but d'échapper à la réponse immunitaire innée.

La deuxième phase de la réponse immunitaire, appelée immunité adaptative est apparue avec les vertébrés. La réponse immunitaire adaptative est basée sur la sélection clonale d'un répertoire de cellules immunitaires, les lymphocytes T et B, qui sont dotés de récepteurs antigéniques spécifiques. Chaque lymphocyte possède un récepteur distinct issu de recombinaisons aléatoires si bien que le répertoire entier de récepteurs peut reconnaître tout antigène étranger. Les cellules présentatrices d'antigènes, issues de l'immunité innée, activent les lymphocytes, qui prolifèrent et se différencient en deux populations de cellules : les cellules effectrices qui vont combattre le pathogène et les

lymphocytes mémoires qui vont constituer un répertoire de cellules prêtes à répondre rapidement en cas de nouvelle infection par le même pathogène. Les lymphocytes B effecteurs sont les cellules sécrétrices d'anticorps qui vont aider à la destruction du pathogène en facilitant leur phagocytose par les cellules de l'immunité innée. Les lymphocytes T effecteurs vont aider à la destruction des pathogènes en augmentant le pouvoir de phagocytose des cellules de l'immunité innée ou en détruisant directement les cellules infectées.

Une défense complète de l'organisme nécessite plusieurs systèmes de reconnaissances et divers mécanismes effecteurs afin de reconnaître et de détruire tous les types d'agents infectieux existants. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺, une sous population de lymphocytes T cruciale dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative adéquate.

I. Généralités sur les cellules T

1. Développement des lymphocytes T

Le développement des lymphocytes T (LT) s'effectue dans le thymus à partir d'un progéniteur lymphoïde commun (CPL) qui a migré de la moelle osseuse vers le thymus. En 1996, Res *et al* ont identifié une population de cellules exprimant les marqueurs CD34⁺CD38^{dim} dans le thymus humain et ont démontré que celle-ci a la capacité de se différencier, *in vitro*, en cellules T et NK ainsi qu'en cellules dendritiques (DC) (Res et al., 1996). Par la suite, Dik et ses collègues ont observé chez l'Homme que la population immature majoritaire retrouvée dans le thymus, également appelée progéniteur thymique précoce (Early Thymic Progenitor – ETP), est cette même population de cellules exprimant les marqueurs CD34⁺CD38^{lo} (Dik et al., 2005). Ils ont également prouvé que cette population ETP, qui exprime fortement CD10, provient d'une population de cellules CD34⁺CD45RA⁺CD7⁺CD10⁺CD38^{lo} retrouvée dans le sang de cordon et possédant une activité multipotente de différenciation en cellules T, B, NK, et DC (Hao, 2001). Lors de leur entrée dans le thymus par la jonction cortico-médullaire, ces ETP n'expriment pas de TCR, de CD4 ni de CD8 et sont appelés thymocytes double négatifs CD4⁻CD8⁻ (DN) (Lind et al., 2001). Ces thymocytes DN migrent dans le cortex où ils vont subir quatre étapes de différenciation suivant l'expression des marqueurs de surface CD44 et CD25 (IL-2R α). Ainsi, à leur entrée dans le thymus, les thymocytes DN1 sont CD44⁺CD25⁻ et possèdent toujours une activité multipotente de différenciation en cellules T, B, NK et DC. Les thymocytes vont ensuite migrer vers la zone sous-capsulaire où ils acquièrent l'expression de CD25 et sont appelés thymocytes DN2 CD44⁺CD25⁺. Ces thymocytes DN2 ont perdu leur capacité à se différencier en cellule B mais ont toujours leur potentiel de devenir des cellules T, NK ou des DC (Schmitt et al., 2004; Wu et al., 1996b). Les thymocytes s'engagent vers la voie de différenciation en lymphocyte T entre les étapes DN2 et DN3 lorsque les réarrangements, contrôlés par les protéines RAG1 et RAG2 (pour Recombination-Activating Genes), des gènes β (*tcrb*), ou γ (*tcrg*) et δ (*tcrd*) ont lieu (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1993). Il a été montré récemment que, dans les thymocytes DN2, ces réarrangements se faisaient dans un ordre bien précis $\delta > \gamma > \beta$. Les thymocytes qui expriment un TCR $\gamma\delta$ correct vont se développer en lymphocytes T $\gamma\delta$. Les thymocytes engagés dans la voie $\alpha\beta$ commencent le

réarrangement du locus β au stade DN2 par les segments D β et J β . Ce réarrangement se poursuit dans les thymocytes DN3 CD44⁺CD25⁺ avec la jonction V β et DJ (Figure 1) (Blom et al., 1999; Dik et al., 2005). Dans les thymocytes DN3, la chaîne β , correctement réarrangée, s'apparie avec une chaîne pT α (pour pré-T-cell- α) pour former le complexe pre-TCR- $\alpha\beta$ (Saint-Ruf et al., 1994). Ce complexe est alors associé aux chaînes de signalisation CD3 puis exprimé à la surface des thymocytes (van Oers et al., 1995). La formation de ce premier complexe pre-TCR est cruciale pour la survie des thymocytes lors de la phase de β -sélection. En effet, plusieurs études basées sur l'extinction de protéines clés de la voie de signalisation du TCR montrent un arrêt de la progression des thymocytes en phase DN3 et la mort de ceux-ci (Clements et al., 1998; Negishi et al., 1995; van Oers et al., 1996b).

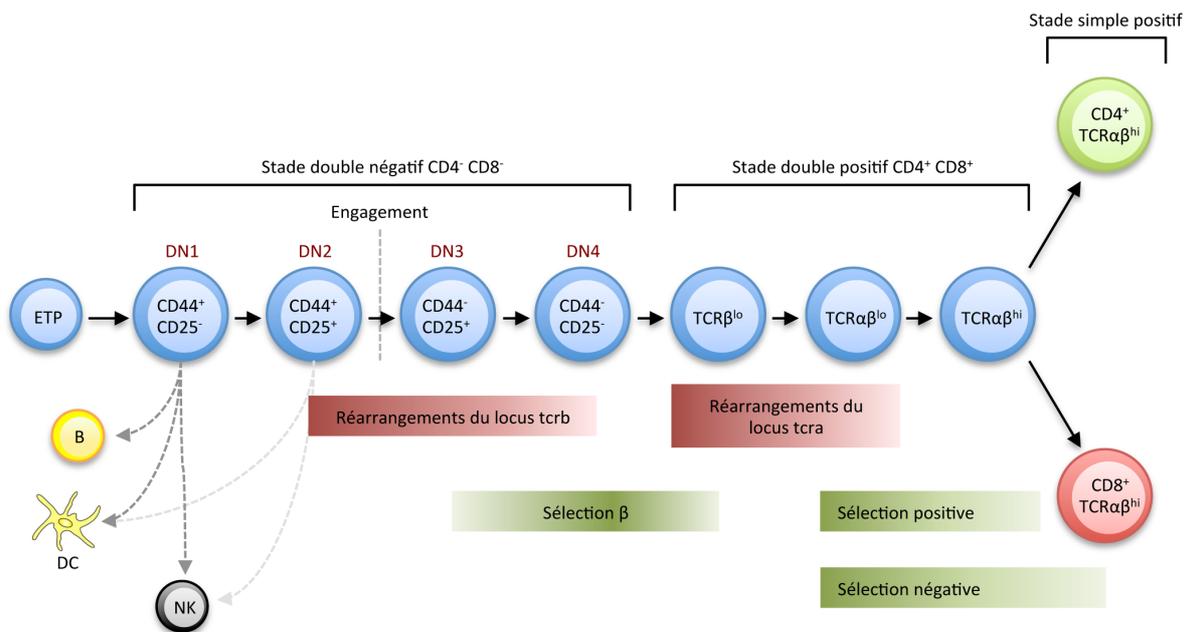


Figure 1 | **Schéma simplifié du développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le thymus.** Un progéniteur hématopoïétique précoce (ETP) entre dans le thymus et subit des réarrangements génétiques dans le but d'exprimer un TCR fonctionnel. Après plusieurs étapes de sélection et de maturation, un lymphocyte T CD4⁺ ou CD8⁺ simple positif sort du thymus pour coloniser les organes lymphoïdes périphériques. Adapté de Sebзда et al., 1999.

Les thymocytes survivant à la phase de β -sélection entrent dans la phase DN4 CD44⁻CD25⁻ où ils vont proliférer puis réarranger le locus de la chaîne α et enfin exprimer les molécules de surfaces CD8 tout d'abord puis CD4 pour former les thymocytes double positifs CD4⁺CD8⁺ (DP). Ces thymocytes migrent ensuite vers la médulla du thymus

où ils subissent une double sélection positive et négative dans le but de sélectionner les thymocytes DP pouvant reconnaître le complexe CMH/antigène avec une affinité appropriée. Les thymocytes répondant trop faiblement ou, au contraire, étant trop réactifs contre les molécules du soi, vont être éliminés. Les thymocytes survivants vont alors se différencier en lymphocytes matures simples positifs CD4⁺ ou CD8⁺ qui vont alors quitter le thymus pour former un répertoire périphérique de cellules T (Germain, 2002; Spits, 2002).

2. Développement des cellules NKT

Les cellules NKT représentent une sous-population de lymphocytes T spécialisés possédant leurs propres caractéristiques uniques distinctes des lymphocytes T conventionnels. Les cellules NKT expriment un TCR invariant chez l'Homme ou semi-invariant chez la souris, composé d'un simple réarrangement V α 24-J α 18 et V α 14-J α 18, respectivement chez l'Homme et la souris, combiné avec le segment V β 11 chez l'Homme ou V β 8, V β 2 ou V β 7 chez la souris. Le TCR des cellules NKT reconnaît les glycosphingolipides du soi et bactériens présentés par la molécule CD1d, une protéine apparentée aux molécules de classe I du CMH (Bendelac et al., 2007).

De manière similaire aux lymphocytes T conventionnels, le développement des cellules NKT se déroule dans le thymus. Deux modèles ont été proposés dans la littérature sur le développement des cellules NKT et diffèrent sur l'origine du précurseur, commun ou non avec celui des lymphocytes T. Le modèle de précurseur engagé suggère que les cellules NKT se développent très tôt dans l'embryogénèse, avant même l'apparition du thymus et l'apparition des lymphocytes T conventionnels. A l'inverse, le modèle instructif, basé sur une sélection par le TCR, propose que ce soit seulement après l'expression d'un TCR fonctionnel que les cellules s'engagent vers la voie des NKT. En accord avec ce modèle, il est maintenant clairement établi que les lymphocytes T $\alpha\beta$ et les cellules NKT passent par le même stade précoce triple négatif (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) et requièrent les mêmes signaux pour le développement de leurs précurseurs respectifs. Plus précisément, c'est pendant le stade double positif (CD4⁺CD8⁺) que les réarrangements V α 14 et J α 18 et l'expression du TCR invariant ont lieu et engagent les cellules vers la lignée NKT (Figure 2) (Bezbradica et al., 2005; Gapin et al., 2001). Les cellules NKT subissent, tout comme les lymphocytes T $\alpha\beta$, une étape de sélection

positive, qui permet d'éliminer les cellules trop ou pas assez réactives. Au contraire des lymphocytes T conventionnels qui sont sélectionnés par interaction de leur TCR avec les complexes peptides-CMH exprimés sur les cellules épithéliales thymiques, les cellules NKT sont sélectionnées par interaction de leur TCR avec les complexes glycolipides-CD1d présentés par les thymocytes DP (Bendelac, 1995; Schumann et al., 2005).

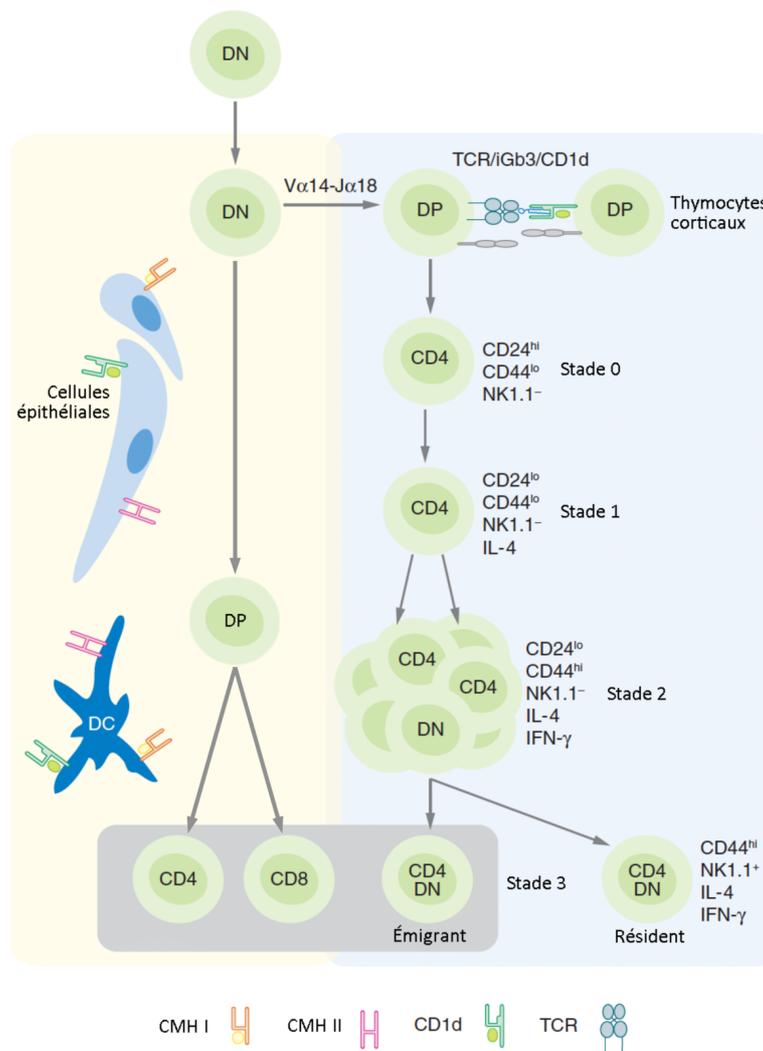


Figure 2 | **Développement des cellules NKT dans le thymus.** Les précurseurs des cellules NKT divergent des lymphocytes T conventionnels à partir du stade double positif CD4⁺CD8⁺ (DP). Un thymocyte DP engagé dans la voie de différenciation en cellules NKT est sélectionné par la reconnaissance par son TCR invariant de son ligand (iGb3) présenté par les molécules CD1d exprimé par les thymocytes DP corticaux. Après plusieurs stades de maturation, les cellules NKT deviennent double négatif CD4⁻CD8⁻ (DN) et acquièrent un phénotype de cellules mémoires/activées. Ces cellules NKT quittent alors le thymus pour coloniser les organes périphériques et acquièrent alors les marqueurs de cellules NK. D'après Bendelac et al., 2007.

Suivant la phase de sélection positive, les cellules NKT progressent à travers une voie de maturation qui est caractérisée par l'acquisition séquentielle de marqueurs d'expression à la surface des cellules. Il existe quatre stades de maturation des cellules NKT distincts par l'expression des marqueurs CD24, CD44 et NK1.1. Les cellules NKT les plus immatures sont CD24^{hi}CD44^{lo}NK1.1⁻ (stade 0) suivies par CD24^{lo}CD44^{lo}NK1.1⁻ (Stade 1), CD24^{lo}CD44^{hi}NK1.1⁻ (stade 2) et enfin CD24^{lo}CD44^{hi}NK1.1⁺ (stade 3) (Bendelac et al., 2007). Au stade 0, les cellules NKT sont petites et peu nombreuses (environ 1 cellule pour 1 million de thymocytes), suggérant qu'elles ne prolifèrent pas. Pendant la transition entre le stade 0 et le stade 1, l'expression de CD4 est diminuée, ce qui aboutit à l'obtention d'une population de cellules NKT DN. Au stade 1, les cellules prolifèrent et augmentent l'expression de CD44 leur donnant un phénotype de cellules mémoires/activées (Figure 2). La majorité des cellules CD24^{lo}CD44^{hi}NK1.1⁻ quittent le thymus pour migrer vers les tissus périphériques, où elles arrêtent de proliférer et acquièrent les marqueurs de la lignée NK, tels que NK1.1, NKG2D et Ly49A ainsi que des marqueurs de cellules T activées, comme CD69 et CD122 (Das et al., 2010; Godfrey et al., 2010).

3. Fonctions biologiques des cellules T

Les lymphocytes T matures qui circulent dans le sang et qui n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique sont appelés lymphocytes T naïfs. Pour participer à une réponse immunitaire adaptative les lymphocytes T naïfs migrent dans un organe lymphoïde secondaire pour y rencontrer leurs antigènes spécifiques, présentés par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) sous la forme d'un complexe CMH/peptide (pCMH). En présence de signaux de co-stimulation, détaillés plus loin dans ce manuscrit, les lymphocytes T naïfs vont s'activer, proliférer de manière clonale et se différencier en lymphocytes T effecteurs.

a. Les lymphocytes T CD4⁺

Suite à la reconnaissance par le TCR d'un peptide antigénique présenté uniquement par les molécules de classe II du CMH d'une CPA, et recevant les bons signaux de co-stimulation, un lymphocyte T CD4⁺ pourra se différencier en différents lymphocytes

effecteurs en fonction de son environnement en cytokines. A ce jour il existe quatre sous populations de LT CD4⁺ effecteurs répertoriés qui sont les lymphocytes T helper Th1, Th2, Th17 et les lymphocytes T régulateurs Treg (Figure 3). Ces différentes sous-populations peuvent être différenciées en fonction des cytokines sécrétées et des marqueurs exprimés à la surface des cellules. Ces différentes cellules vont jouer un rôle primordial en orchestrant la réponse immune adaptative contre de nombreux pathogènes.

i. Les lymphocytes Th1

Les lymphocytes T CD4⁺ activés par le TCR en présence d'IFN- γ vont se différencier en lymphocytes Th1 (Abbas et al., 1996). Une étude a également montré que l'IL-12 a un pouvoir de différencier les LT CD4⁺ naïfs en LT Th1 (Hsieh et al., 1993). Ces lymphocytes Th1 activés expriment à leur surface le CD40 ligand (CD40-L) et sécrètent de l'IFN- γ qui vont activer les macrophages et autres cellules de l'immunité innée en augmentant leur action microbicide (Stout et al., 1996). L'IFN- γ sécrété par les cellules Th1 peut également orienter la commutation de classe chez les lymphocytes B vers des isotypes IgG2a et IgG3 (Snapper et al., 1992; Snapper and Paul, 1987). Ces anticorps vont se fixer aux molécules du complément sur les pathogènes, facilitant leur opsonisation et leur destruction par les phagocytes. Enfin, la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 permet également la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques (Sad et al., 1995). Les lymphocytes T CD4⁺ Th1 vont donc avoir un rôle de défense contre les pathogènes intracellulaires (Figure 3).

i. Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 se différencient lorsque les LT naïfs sont activés en présence d'IL-4 (Le Gros et al., 1990; Swain et al., 1990). Les LT Th2 sont les cellules productrices d'IL-4, d'IL-5, d'IL-9 et d'IL-13 (Paul and Zhu, 2010). A l'inverse des cellules Th1, elles ne produisent pas d'IFN- γ , mais elles sécrètent un peu de TNF- α et elles sont également capables de sécréter de l'IL-2.

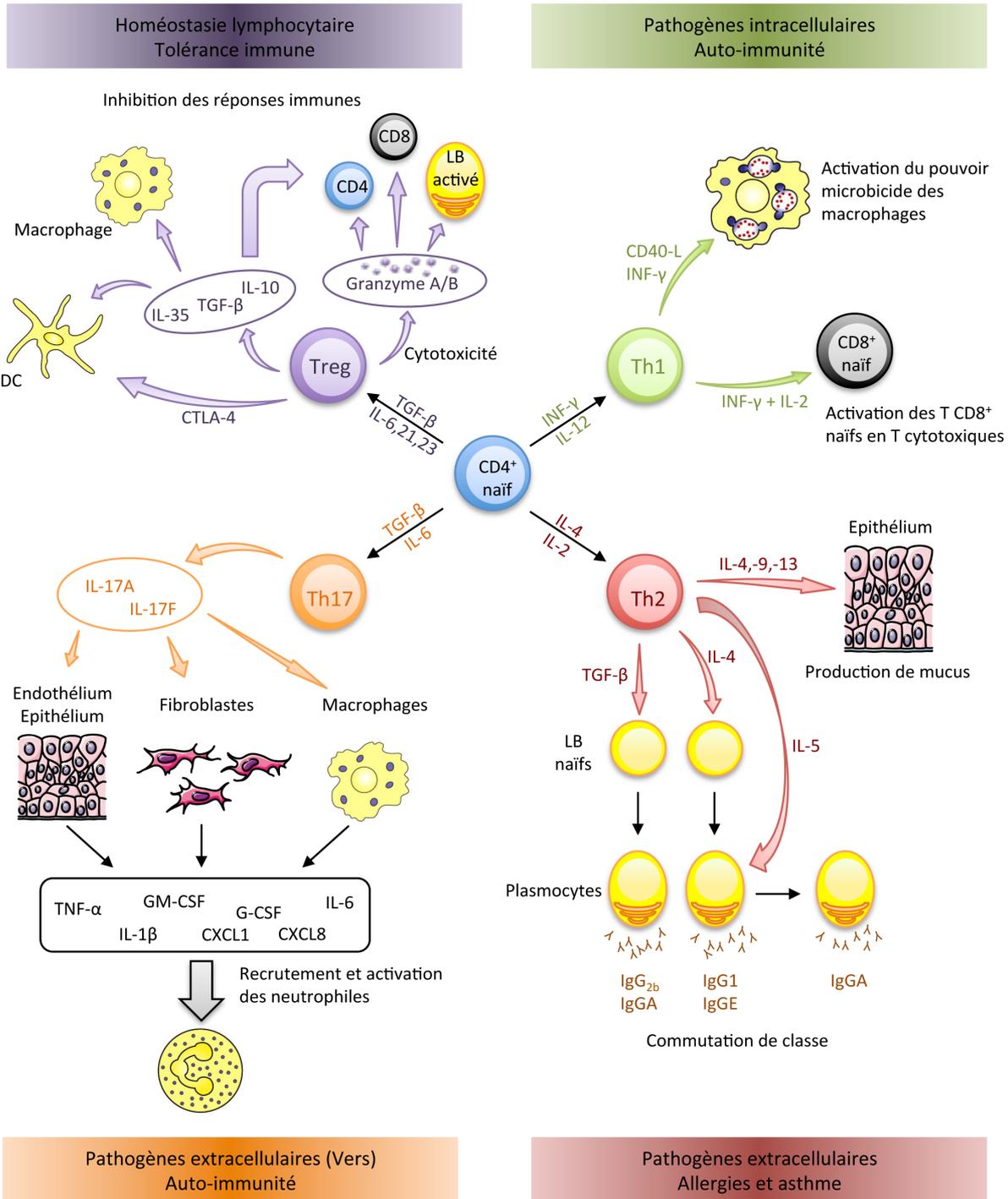


Figure 3 | **Fonctions des lymphocytes T CD4⁺.** Après activation du TCR, un lymphocyte T CD4⁺ naïf peut se différencier en fonction de l'environnement en cytokines en quatre sous populations effectrices. Les cellules Th1 luttent contre les pathogènes intracellulaires. Les cellules Th2 aident à la lutte contre les pathogènes extracellulaires et sont responsables des phénomènes allergiques et de l'asthme. Les cellules Th17 permettent le recrutement des éosinophiles au site infectieux dans la lutte contre certains types de pathogènes. Enfin, le rôle des lymphocytes Treg est de contrôler les réponses immunitaires en supprimant l'activité des cellules immunitaires effectrices. Adapté de Zhu et al., 2008.

L'IL-4 produite par les lymphocytes Th2 est l'inducteur majeur dans la commutation de classe chez les lymphocytes B vers des isotypes IgG1 et IgE alors que le TGF- β oriente la commutation de classe vers des isotypes d'anticorps neutralisant IgG_{2b} et IgA (Stavnezer, 1996). Les complexes immuns formés par les anticorps IgE activent les cellules de l'immunité innée, telles que les mastocytes et les basophiles, en activant les récepteurs Fc de haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI). La sécrétion de l'IL-5 par les cellules Th2 favorise la sécrétion d'IgA par les cellules B ayant déjà subi une commutation de classe et permet le recrutement et l'activation des éosinophiles (Rothenberg and Hogan, 2006; Takatsu et al., 1980; Yamaguchi et al., 1988). En agissant directement sur les cellules épithéliales (par l'IL-4, l'IL-9 et l'IL-13) et sur les cellules du muscle lisse (par l'IL-4 et l'IL-13), les cellules Th2 induisent la production du mucus des voies intestinale et pulmonaire et sont responsables des réactions inflammatoires développées pendant une crise d'asthme (Woodruff et al., 2009). Les lymphocytes T CD4⁺ Th2 sont donc les médiateurs de la réponse immunitaire adaptative contre les pathogènes extracellulaires (Figure 3).

ii. Les lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 ont été caractérisés récemment lorsque deux groupes ont découvert que la combinaison de TGF- β et d'IL-6 induit la différenciation des LT naïfs en LT Th17 dont la principale caractéristique est la sécrétion d'IL-17 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Par la suite, il a été rapporté que l'IL-21, une cytokine produite par les Th17, peut remplacer l'IL-6 pour la différenciation en LT Th17 et est nécessaire aux étapes d'amplification des LT Th17 (Korn et al., 2007; Zhou et al., 2007). Enfin, l'IL-23 est nécessaire à la maturation et à la survie des lymphocytes Th17 (McGeachy et al., 2009). Les lymphocytes Th17 sont des cellules productrices de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22. L'IL-21, nécessaire à la différenciation en lymphocytes Th17, peut également activer les lymphocytes B et induire la commutation de classe vers des isotypes IgG1 et IgG3 (Leonard and Spolski, 2005). Les lymphocytes Th17 produisent deux cytokines de la famille de l'IL-17 : l'IL-17A et l'IL-17F qui agissent sur un grand nombre de cellules (cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastes, macrophages) pour induire l'expression de cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF et G-CSF) et de chimiokines (CXCL1 et CXCL8) dont le but

principal est le recrutement et l'activation des neutrophiles (Awane et al., 1999; Fossiez et al., 1996; Jovanovic et al., 1998; Laan et al., 1999). En réponse à l'IL-23, les lymphocytes Th17 différenciés synthétisent l'IL-22 pour communiquer avec les cellules endothéliales et épithéliales et non avec les cellules immunes qui ne possèdent pas le récepteur à l'IL-22. L'IL-22 induit la production d'agents microbicides par les kératinocytes et est essentielle dans les fonctions de barrières naturelles des épithéliums lors d'infections bactériennes (Aujla et al., 2008; Liang et al., 2006; Zheng et al., 2008). Les cellules Th17 constituent donc une branche du système immunitaire dont la fonction est la destruction de pathogènes spécifiques qui requièrent une forte réponse inflammatoire et qui sont résistants aux réponses immunes prodiguées par les cellules Th1 et Th2 (Figure 3).

iii. Les lymphocytes Treg

Deux sous populations de lymphocytes T régulateurs (Treg) sont retrouvées en périphérie : les lymphocytes Treg naturels (nTreg) et les lymphocytes Treg induits (iTreg). Les lymphocytes nTreg proviennent de cellules T CD4⁺ naïfs qui auraient échappées à la sélection négative dans la médullaire du thymus alors que les iTreg dérivent de lymphocytes T CD4⁺ naïfs conventionnels retrouvés *in vivo* en périphérie et qui peuvent être également obtenus *in vitro* en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, de TGF- β et d'IL-2 (Davidson et al., 2007; Fontenot et al., 2005). Les lymphocytes Treg ont pour principale fonction de contrôler la réponse immunitaire en supprimant l'activité des cellules T effectrices et des cellules de l'immunité innée. Les cellules Treg vont donc avoir un rôle important dans la prévention des maladies auto-immunes, dans les allergies, dans les lésions d'organes provoquées par les réponses inflammatoires et dans le rejet des greffons (Schmidt et al., 2012). Les fonctions effectrices des lymphocytes Treg sont diverses, impliquant la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-35, TGF- β) et le contact cellules/cellules et agissent sur un grand nombre de cellules immunes (Figure 3). Les lymphocytes Treg entraînent, par contact direct avec la DC, l'inhibition de leur maturation ainsi que de leur capacité de co-stimulation en provoquant la diminution d'expression des molécules co-activatrices à leur surface par un mécanisme de trans-endocytose (Liang et al., 2008; Qureshi et al., 2011).

Les lymphocytes Treg sécrètent du TGF- β qui va supprimer les fonctions effectrices des cellules Th1 ainsi que la cytotoxicité et la production de cytokines par les lymphocytes T CD8⁺ (Li et al., 2007; von Boehmer, 2005).

Enfin, plusieurs études ont prouvé l'activité cytotoxique des lymphocytes Treg. L'activation des lymphocytes Treg par CD3/CD46 mène à la production de granzyme A par les nTreg et de granzyme B par les iTreg. Les deux populations de cellules Treg produisent des perforines et peuvent tuer les lymphocytes B, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés, ainsi que les monocytes CD14⁺ et les DC immatures (Grossman et al., 2004; Zhao et al., 2006).

b. Les lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ sont activés après reconnaissance par leur TCR d'un antigène présenté par les molécules de classe I du CMH. Après avoir reçu les signaux de co-stimulation, les lymphocytes T CD8⁺ prolifèrent et se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dont la fonction principale est la destruction des cellules infectées par les pathogène intracellulaires, tels que les virus et certaines bactéries, ainsi que les cellules tumorales.

Une activation complète des lymphocytes T CD8⁺ en cellules effectrices nécessite que la DC servant de CPA à la cellule T CD8⁺ soit conditionnée (Bennett et al., 1997). Diverses études ont montré que les lymphocytes T CD4⁺ helper, qui expriment le CD40-L, activent la signalisation médiée par CD40 sur les DC entraînant le conditionnement des DC à activer les cellules T CD8⁺ (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Les DC conditionnées produisent de l'IL-12 et les lymphocytes T CD4⁺ helper produisent de l'IL-2, ces deux cytokines vont permettre l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques. L'IL-12 permet à la cellule T CD8⁺ de sécréter de l'IFN- γ et de synthétiser toute la machinerie nécessaire à l'activité cytotoxique, comme la synthèse de granzyme B et de perforines (Curtsinger et al., 2005; Curtsinger et al., 2003).

Les lymphocytes T cytotoxiques tuent par apoptose des cellules cibles. L'apoptose dans les cellules cibles est activée par deux voies principales : soit par la libération de granules cytotoxiques soit par activation des récepteurs de la famille du TNF, comme le récepteur Fas (Russell and Ley, 2002).

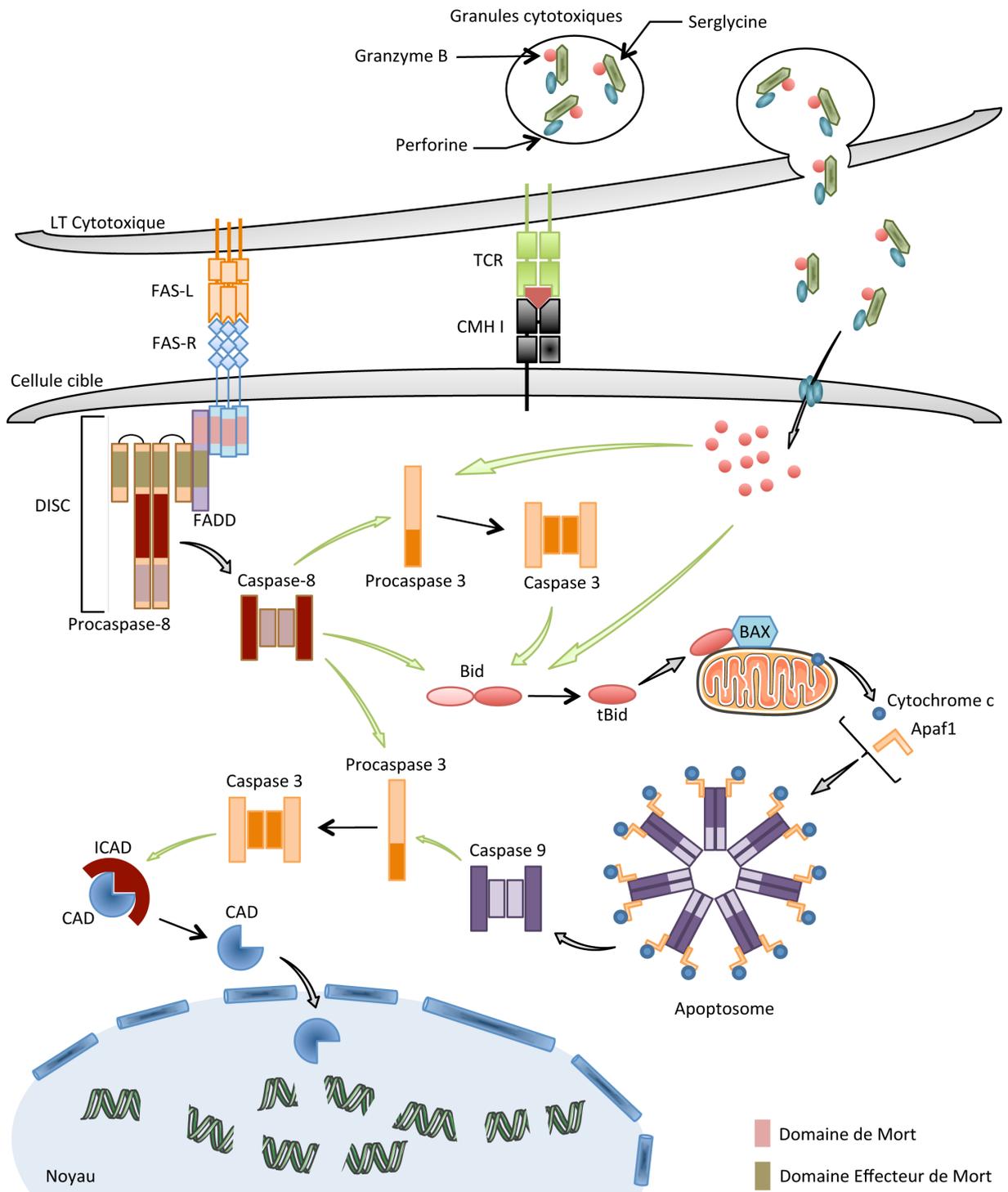


Figure 4 | **Schéma récapitulatif des voies apoptotiques initiées par les récepteurs de la famille du TNF et par la voie des granzymes.** L'activation des voies apoptotiques par les lymphocytes T cytotoxiques conduit à l'activation de la caspase 3 et de la DNase CAD aboutissant à la fragmentation de l'ADN et la mort de la cellule cible.

Les CTL qui ont reconnu une cellule infectée par un virus vont libérer les granules cytotoxiques dans l'espace intercellulaire. Ces granules cytotoxiques sont des lysosomes spécialisés qui contiennent trois types de protéines ayant des activités cytotoxiques : la perforine, le granzyme B et la granulysine (Russell and Ley, 2002). Ces protéines sont assemblées à un protéoglycane, la serglycine, qui sert de molécule d'échafaudage (Galvin et al., 1999). La perforine, par un mécanisme méconnu encore à ce jour, permet l'entrée du granzyme B dans la cellule cible. Le granzyme B est une sérine protéase qui clive des protéines impliquées dans l'activation de l'apoptose, telles que Bid ou la procaspase-3. Le granzyme B clive la procaspase-3 en caspase-3 active qui déclenche une cascade protéolytique aboutissant à l'activation de protéines impliquées dans la mort cellulaire dont la nucléase CAD (pour Caspase-Activated Deoxyribonuclease), la DNase responsable de la fragmentation de l'ADN (Figure 4) (Darmon et al., 1996; Thomas et al., 2000). Le granzyme B peut également cliver Bid, une autre protéine impliquée dans l'activation de l'apoptose, en une forme tronquée (gtBid). gtBid associe Bcl2 pour l'inhiber et recrute le récepteur Bax à la membrane de la mitochondrie. Ces mécanismes mènent à déstabiliser la membrane des mitochondries et provoquent la libération de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c dans le cytoplasme des cellules cibles. La libération du cytochrome c conduit à son interaction avec les molécules Apaf1 et les procaspases-9, permettant la formation de l'apoptosome qui va activer la caspase-9. La caspase-9 activée clive et active la caspase-3 générant ainsi une boucle auto-régulatrice (Figure 4) (Barry et al., 2000; Heibein et al., 2000). Enfin, la granulysine est une protéine qui, dans la cellule cible, s'associe directement avec la membrane externe de la mitochondrie, cause sa dépolarisation et induit donc la libération du cytochrome c dans le cytoplasme des cellules. Au contraire de l'action de tBid, la granulysine n'induit pas la formation de l'apoptosome mais semble activer directement la caspase 3 (Pardo et al., 2001).

L'autre voie utilisée par les CTL pour induire l'apoptose des cellules cibles est l'activation des récepteurs de la famille du TNF. Cette voie est utilisée dans l'homéostasie des lymphocytes pour réguler la réponse immune. Les lymphocytes T cytotoxiques activent les récepteurs de la famille du TNF de différentes façons : d'une part par l'expression du ligand de Fas (Fas-L) à leur surface et d'autre part par la synthèse de TNF- α . Par contact cellule/cellule, le Fas-L active le récepteur Fas (CD95) sur la cellule cible et induit sa mort par apoptose et de manière similaire, le TNF- α

sécrété dans le milieu extracellulaire active la signalisation médiée par TNFR-1 (Chavez-Galan et al., 2009). La liaison du Fas-L sur CD95 entraîne la trimérisation du récepteur induisant un changement conformationnel des parties intra-cytoplasmiques des récepteurs et le regroupement des domaines de mort. Ces domaines vont recruter FADD (Fas-Associated Death Domain) une protéine adaptatrice qui va à son tour recruter la procaspase-8 via leur domaine effecteur de mort (Death Effector Domain, DED). Ce complexe multi-protéique est appelé DISC (Death-Inducing Signalling Complex) et permet l'activation de la caspase-8. Celle-ci va déclencher l'apoptose soit en activant la caspase-3, soit en activant la voie apoptotique dépendant de la mitochondrie en clivant Bid (Figure 4) (Krammer, 2000).

La signalisation médiée par le TNFR-1 est similaire à celle du récepteur Fas. La trimérisation du récepteur est également induite suite à la liaison du TNF- α . Le récepteur recrute ensuite une première protéine adaptatrice TRADD qui recrute FADD et la procaspase-8 pour former le complexe DISC. Le complexe DISC va alors déclencher l'apoptose en activant la caspase-8 (Bodmer et al., 2000).

c. Les cellules NKT

Les cellules NKT matures se distinguent des autres cellules du système immunitaire par l'expression de marqueurs de surface spécifiques à la lignée NK, de l'expression d'un TCR invariant et de l'acquisition d'un phénotype de type mémoire de l'immunité innée. En conséquence, les cellules NKT sécrètent rapidement une quantité élevée de cytokines de type Th1 et Th2 après engagement de leur TCR et sont maintenant reconnues comme des acteurs majeurs du système immunitaire à la frontière de l'immunité innée et adaptative. En effet, les cellules NKT peuvent à la fois activer et inhiber le système immunitaire. L'hypothèse actuelle est l'existence de différentes sous populations de cellules NKT matures basées sur l'expression des marqueurs CD4, CD8 et NK1.1 (ou CD161 chez l'Homme) (Bendelac et al., 2007; Godfrey et al., 2010). Les cellules NKT humaines CD4⁺ sécrètent à la fois des cytokines de types Th1, comme l'IL-4 et l'IL-13, et Th2, comme l'IFN- γ et le TNF- α alors que les cellules NKT CD4⁻ sécrètent principalement des cytokines de types Th1 (Gumperz et al., 2002; Lee et al., 2002b). Les cellules NKT CD8⁺, qui existent uniquement chez l'Homme, ressemblent aux cellules NKT DN mais ne sécrètent pas d'IL-4 (Takahashi et al., 2002). Enfin, les cellules NKT NK1.1⁻ produisent

une grande quantité d'IL-4 et peu d'IFN- γ et, à l'inverse, les cellules NKT NK1.1⁺ produisent plus d'IFN- γ que d'IL-4 (Figure 2) (Benlagha et al., 2002; Pellicci et al., 2002). Ainsi, à travers la production de cytokines et de chimiokines (comme MIP1- α et MIP1- β), les cellules NKT influencent l'homéostasie d'un grand nombre de cellules immunitaires, telles que les cellules NK, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Il est maintenant largement documenté dans la littérature que les cellules NKT interviennent dans le contrôle de nombreux procédés tels que l'immunité microbienne, la rejection tumorale ou les maladies auto-immunes (Bendelac et al., 2007).

II. Mécanismes d'activation des lymphocytes T

1. Le récepteur des lymphocytes T (TCR)

a. Structure du TCR

Les lymphocytes T circulants, pour la majorité d'entre eux, expriment à leur surface un TCR composé de deux chaînes $\alpha\beta$ capables de reconnaître les peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH de classe I ou II. Une minorité de cellules T exprime un TCR différent composé de deux chaînes $\gamma\delta$ (Rudolph et al., 2006). Les parties extracellulaires de chaque chaîne sont composées de deux domaines ressemblant aux domaines variables (V) et constants (C) des immunoglobulines. Les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure au niveau de deux résidus cystéine situés dans une séquence proche de la membrane. Chaque chaîne comporte un domaine transmembranaire et se termine par une courte région C-terminale. En plus du pont disulfure reliant les deux chaînes $\alpha\beta$, la structure du TCR est stabilisée par des liaisons hydrogène établies par les sucres des parties constantes $C\alpha$ et $C\beta$ (Figure 5) (Bentley and Mariuzza, 1996; Garcia, 1999).

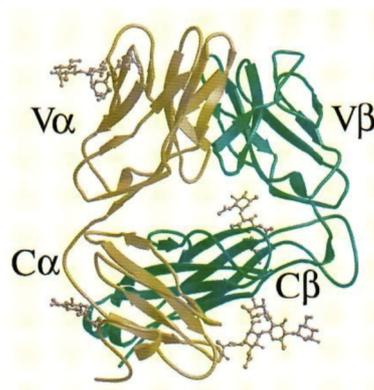


Figure 5 | **Structure cristallographique des chaînes $\alpha\beta$ du TCR.** Les domaines constant et variable de la chaîne α sont représentés en marron et ceux de la chaîne β en vert. Garcia, 1999.

Les quatre chaînes $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ sont issues des réarrangements géniques qui ont lieu lors des étapes de sélection des thymocytes dans le thymus et qui ont été décrites précédemment.

b. Organisation des loci *tcrα* et *tcrβ*

L'arrangement des segments géniques codant pour les chaînes TCR α et TCR β ressemble à celui des gènes d'immunoglobulines, avec séparation des segments de variabilités (V), de diversité (D), de jonctions (J) et des gènes codants pour la partie constante (C).

Le locus *tcrα* est situé, chez l'Homme, sur le chromosome 14 et est composé d'environ 80 segments géniques $V\alpha$ suivis par 61 segments géniques $J\alpha$ et d'un segment C unique qui code pour la partie constante ainsi que pour les domaines transmembranaire et intracellulaire. Le locus *tcrβ*, situé sur le chromosome 7, est organisé différemment. Il est composé de 52 segments variables $V\beta$ puis de deux ensembles de gènes comportant un segment génique D suivi de 6 ou 7 segments géniques J et du segment génique C. De manière similaire au gène $C\alpha$, chaque gène $C\beta$ a des exons séparés codant pour la région constante et pour les domaines transmembranaire et intracellulaire (Figure 6A).

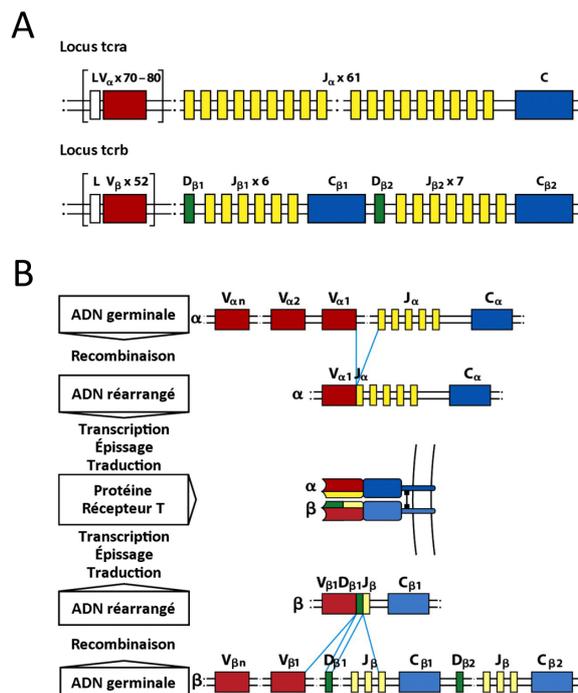


Figure 6 | **Organisation et réarrangements des loci *tcrα* et *tcrβ*.** (A) Le locus *tcrα* consiste en 70-80 segments géniques $V\alpha$, chacun précédé par un exon codant le peptide signal (L). Un ensemble de 61 segments géniques $J\alpha$ est situé à une distance élevée des segments géniques $V\alpha$ et suivi par un segment génique C unique. Le locus *tcrβ* est organisé en un ensemble de 52 gènes $V\beta$ localisé à distance de deux ensembles séparés, chacun contenant un seul segment génique $D\beta$, avec 6 ou 7 segments géniques $J\beta$ et un gène C unique. (B) Les gènes des chaînes α et β du TCR sont composés de segments joints par recombinaison somatique durant le développement des cellules T. Ces réarrangements géniques génèrent un exon codant pour la région V fonctionnelle ($V\alpha J\alpha$ ou $V\beta D\beta J\beta$) qui est transcrit et épissé pour se joindre au segment C. Les ARNm sont traduits en chaînes α et β qui s'apparient rapidement pour former l'hétérodimère $\alpha\beta$ du TCR. Adapté de Janeway, Immunobiology, 7^{ème} édition.

Durant la sélection des thymocytes dans le thymus, les cellules T réarrangent les locus des chaînes α et β , permettant l'expression d'un TCR spécifique pour un antigène. Ce réarrangement génique est catalysé par un complexe enzymatique appelé recombinaison V(D)J. Ce complexe est composé des protéines RAG-1, RAG-2 et de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, comme l'hétérodimère Ku70:80, l'ADN-PK ou Artemis ainsi que de l'ADN ligase IV, chacune ayant un rôle bien spécifique dans la recombinaison V(D)J. Ces enzymes réorganisent tout d'abord les segments VDJ de la chaîne β puis les segments VJ de la chaîne α . Les locus réarrangés vont être transcrits puis traduits en chaînes α et β pour composer le TCR (Figure 6B) (Bassing et al., 2002).

c. Structure des chaînes α et β du TCR

La structure tridimensionnelle des régions variables des chaînes α et β montrent que ces régions sont constituées de deux feuillets β reliés entre eux par un pont disulfure et prenant la forme d'un tonneau, appelé aussi tonneau β . Les deux feuillets β sont composés de quatre brins β anti-parallèles pour l'un et de cinq brins β anti-parallèles pour l'autre. Ces brins β sont reliés entre eux par huit boucles pour former les feuillets β . Chaque chaîne expose trois boucles vers l'extérieur de la protéine qui possèdent toutes une grande variabilité de séquence et ont été appelées régions hypervariables (Bentley et al., 1995; Fields et al., 1995). Ces six boucles forment un site hypervariable unique au sommet de chaque TCR et constituent le site de liaison à l'antigène (Al-Lazikani et al., 2000). Les six boucles hypervariables déterminent la spécificité antigénique en formant une structure complémentaire du peptide antigénique présenté par les molécules du CMH, c'est pourquoi ces boucles ont été appelées CDR (pour Complementary-Determining Regions) (Chothia et al., 1988). Les boucles CDR1 et CDR2 des chaînes α et β possèdent un taux de variabilité plus faible que pour les boucles CDR3. Les boucles CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β et CDR2 β sont retrouvées à la périphérie du site de liaison où ils associent la molécule du CMH, d'où la plus faible variabilité de ces boucles. Les CDR3 α et CDR3 β se situent au centre du site de liaison où ils vont interagir directement avec le peptide antigénique présenté par la molécule du CMH (Figure 7) (Jores et al., 1990).

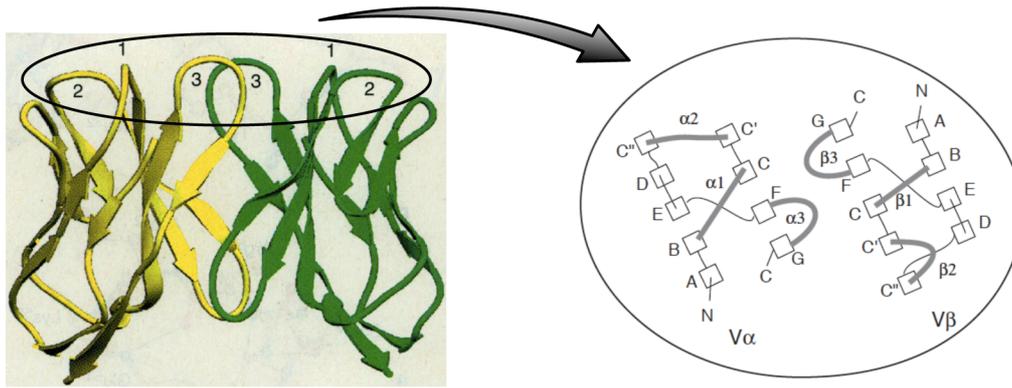


Figure 7 | **Schéma des régions variables des chaînes $\alpha\beta$ du TCR.** A gauche, structure cristallographique des domaines variables des chaînes α (jaune) et β (vert) composés chacun de deux feuillets β . Les numéros représentent les boucles hypervariables (CDR) pour chaque chaîne. A droite, schéma représentant le dessus du TCR et montrant la disposition des CDR dans le site de liaison à l'antigène. Fields et al., 1995 et Al-Lazikani et al., 2000.

2. Reconnaissance de l'antigène par le TCR

a. Les molécules du CMH

Il existe deux types de molécules de CMH : les molécules de classe I et de classe II qui possèdent une structure tridimensionnelle similaire mais qui diffèrent par leur expression cellulaire. Les molécules de classe I du CMH sont exprimées de façon ubiquitaire. Les CMH de classe I vont présenter des peptides antigéniques issus de source endogène grâce à la voie de dégradation classique des protéines par le protéasome dans le cytosol. Ils vont être reconnus par les lymphocytes T $CD8^+$ activés qui vont lyser ces cellules présentées comme anormales. Les molécules de classe I du CMH sont donc essentielles dans la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées par les virus, les cellules tumorales et lors de la transplantation d'organe (van den Elsen, 2011).

Les molécules de classe II du CMH ont un rôle central dans l'initiation des réponses immunitaires cellulaires et humorales. L'expression constitutive des CMH de classe II est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) que sont les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les cellules B, ainsi que sur les cellules épithéliales du thymus. Cependant, l'expression des CMH de classe II peut être induite lorsque les cellules sont dans un environnement riche en $IFN-\gamma$. Les molécules de classe

II du CMH appréhendent un peptide antigénique issu d'un pathogène extracellulaire qui a été capté puis phagocyté par la CPA. Les peptides antigéniques présentés par les molécules de classe II du CMH sont reconnus par le TCR des lymphocytes T CD4⁺ helper qui s'activent et aident les macrophages à éliminer les pathogènes enfermés dans leurs vacuoles, ou activent les lymphocytes B à se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Boss and Jensen, 2003).

b. Structure des molécules du CMH

Les molécules de classe I sont composées d'une grande chaîne lourde transmembranaire α ayant trois domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et d'une chaîne légère $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$). Le domaine $\alpha 3$ s'associe de façon non covalente avec la chaîne $\beta 2m$. Les domaines $\alpha 2$ et $\alpha 3$ se replient de façon bien spécifique pour former une structure constituée de deux hélices α allongées sur un feuillet de huit brins β anti-parallèles (Figure 8). Cette structure forme une cavité, appelée aussi sillon de liaison au peptide, dans laquelle s'insère le peptide antigénique (Bjorkman et al., 1987).

Les molécules de classe II du CMH sont composées de deux chaînes transmembranaires α et β , associées de façon non covalente. Ces deux chaînes sont constituées chacune de deux domaines, $\alpha 1$ et $\alpha 2$ pour la chaîne α et $\beta 1$ et $\beta 2$ pour la chaîne β . Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ se replient de la même manière que les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule de classe I du CMH et forment le sillon de liaison au peptide antigénique (Figure 8) (Fremont et al., 1996).

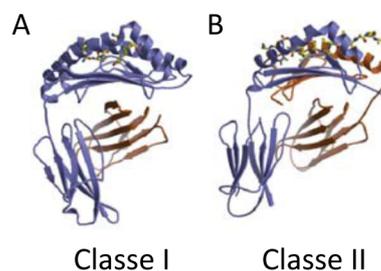


Figure 8 | **Structure des molécules de classe I et II du CMH.** (A) Les molécules de classe I sont formés d'une chaîne lourde (en bleu) et d'une chaîne légère β_2m (en orange). Le site de liaison au peptide antigénique est constitué exclusivement de la chaîne lourde, alors que pour les molécules de classe II (B), il est formé des deux sous-unité. Rudolph et al., 2006.

Dans les molécules de classe I et II du CMH, le peptide antigénique est pris en « sandwich » entre les deux hélices α du sillon de liaison et forme le complexe CMH-peptide (pCMH) qui interagit avec les chaînes α et β du TCR.

c. Rôle des co-récepteurs CD4 et CD8

Les molécules CD4 et CD8 ont initialement été décrites comme marqueurs de surface pour différencier les populations de cellules qui sortent du thymus. Après activation, les cellules T CD4⁺ se différencient en lymphocytes T helper alors que les cellules T CD8⁺ se différencient en lymphocytes T cytotoxiques. Mais ces deux molécules possèdent un rôle plus crucial en interagissant directement avec les molécules du CMH, permettant de stabiliser l'interaction entre les complexes TCR/pCMH lors de l'activation des lymphocytes T. En effet, CD8 associe strictement les molécules de classe I du CMH tandis que CD4 associe spécifiquement les molécules de classe II du CMH (Figure 9).

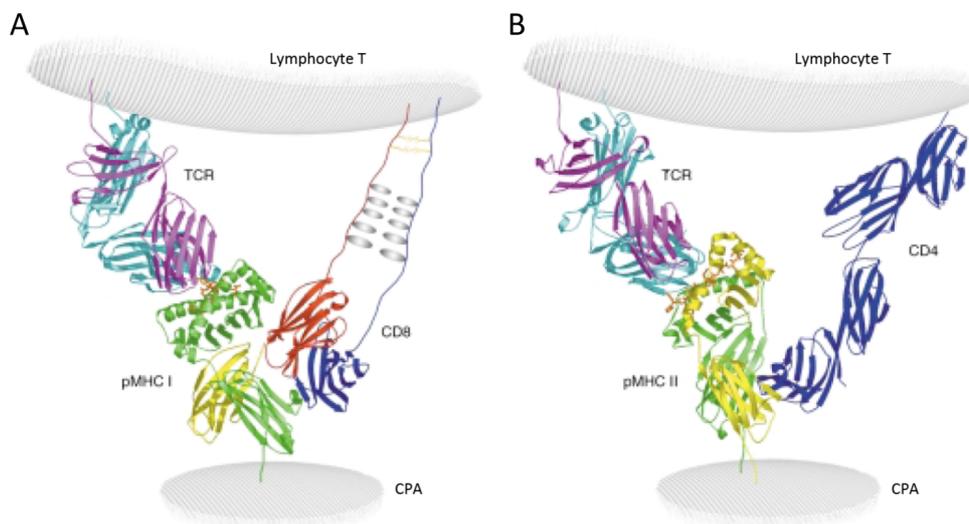


Figure 9 | **Modèle des complexes pCMH-I/TCR/CD8 et pCMH-II/TCR/CD4.** (A) Les chaînes $\alpha\beta$ du TCR (respectivement en bleu et violet) reconnaissent un peptide antigénique présenté par une molécule de classe I du CMH (chaîne lourde en vert et chaîne légère en jaune). Les chaînes $\alpha\beta$ (en bleu et rouge) de la molécule CD8 interagissent avec le domaine constant de la chaîne lourde du CMH-I pour stabiliser le complexe. (B) De la même façon, le domaine D1 de CD4 (en bleu) interagit avec les domaines constants des chaînes $\alpha\beta$ (en jaune et vert) de la molécule de classe II du CMH. Gao et al., 2002.

CD4 est une molécule transmembranaire monocaténaire composée de quatre domaines, arrangés en tandem, de types immunoglobulines et notés D1, D2, D3 et D4. La cristallographie d'un complexe comprenant les deux domaines N-terminaux de CD4 et le complexe pCMH a montré que seul le domaine D1 de CD4 associe les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ du CMH de classe II (Figure 9) (Wang et al., 2001).

CD8 est un hétérodimère composé de deux chaînes transmembranaires α et β reliées entre elles par un pont disulfure. Chacune de ces chaînes est constituée d'un domaine de type immunoglobuline lié à la membrane par une longue queue polypeptidique fortement O-glycosylée. L'association CD8/CMH est médiée par des liaisons hydrogènes entre les domaines de type immunoglobuline de CD8 et le domaine $\alpha 3$ du CMH ainsi qu'avec les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2m$, mais de manière plus faible (Figure 9) (Gao et al., 2002).

3. Le complexe de signalisation TCR-CD3

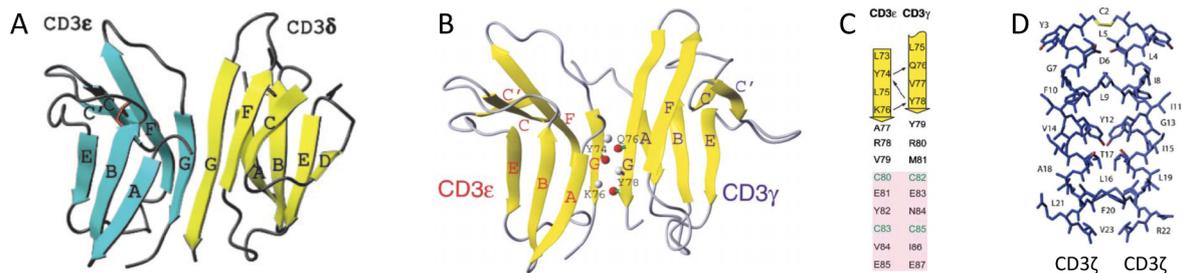
Les domaines intracellulaires des chaînes α et β sont très courts et ne possèdent pas de domaines capables d'induire une signalisation. Les chaînes du TCR sont donc associées de façon non covalente avec les molécules CD3, capables de signaler, pour former le complexe TCR-CD3.

Un complexe TCR-CD3 est composé de huit protéines : les chaînes α et β (ou γ et δ) qui reconnaissent l'antigène, et trois dimères de molécules du CD3 (δ , ϵ , γ ou ζ) qui permettent la signalisation. Une étude récente, basée sur des mesures biochimiques de la stoechiométrie du complexe TCR-CD3, a montré que les chaînes α et β sont associées à deux hétérodimères CD3 $\delta\epsilon$ et CD3 $\gamma\epsilon$ et à un homodimère CD3 $\zeta\zeta$ (Call et al., 2004).

L'assemblage du complexe TCR-CD3 se fait dans le réticulum endoplasmique et commence par la production d'un pentamère composé des chaînes α et β et des molécules CD3 δ , ϵ , γ . L'homodimère CD3 $\zeta\zeta$ est alors assemblé à ce pentamère et le complexe TCR-CD3 termine sa maturation dans le Golgi avant d'être exprimé à la membrane plasmique (Alarcon et al., 1988; Geisler et al., 1989).

Les études cristallographiques montrent que les domaines extracellulaires des hétérodimères CD3 $\delta\epsilon$ et CD3 $\gamma\epsilon$ sont composés d'un domaine de type immunoglobuline. Les brins β de chaque sous unité CD3 qui se retrouvent à l'interface entre les deux

domaines extracellulaires vont former de nombreuses liaisons hydrogène, stabilisant l'hétérodimère (Arnett et al., 2004; Kjer-Nielsen et al., 2004). De plus, un motif de huit acides aminés RxCxxCxE, situé dans la région proximale de la membrane de chaque sous-unité, facilite l'appariement des hétérodimères (Figure 10A et B). Enfin, les domaines transmembranaires des molécules CD3 δ , ϵ et γ sont composés d'hélices α qui sont connues pour former des liaisons hydrogène (Figure 10C) (Sun et al., 2001).



Le domaine extracellulaire de la chaîne CD3 ζ ne comporte que neuf acides aminés et ne semble pas former de motif particulier. Les interactions entre les deux molécules qui composent l'hétérodimère CD3 $\zeta\zeta$ se font principalement par des liaisons hydrogène entre les hélices α des domaines transmembranaires ainsi que par un pont disulfure, stabilisant les deux molécules (Figure 10D) (Call et al., 2006; Rutledge et al., 1992).

La chaîne α du TCR possède deux acides aminés basiques dans sa partie transmembranaire et la chaîne β en possède un. De la même façon, les molécules du CD3 δ , ϵ , γ et ζ possèdent chacune un acide aspartique ou glutamique dans leurs parties transmembranaires, créant ainsi une paire de résidus acides pour chaque dimère. Des expériences de mutagénèses ont montré qu'un résidu basique des chaînes du TCR établit des liaisons faibles avec une paire de résidus acides. Ces expériences ont démontré que la chaîne α , via un résidu lysine, associe l'hétérodimère CD3 $\delta\epsilon$ et via un résidu arginine, l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$. De son côté, la chaîne β du TCR associe via un

résidu lysine l'hétérodimère CD3 $\gamma\epsilon$ (Figure 11) (Alcover et al., 1990; Blumberg et al., 1990; Call et al., 2002; Call et al., 2004). Ces interactions permettent la formation du complexe TCR-CD3 et son expression à la surface des cellules T.

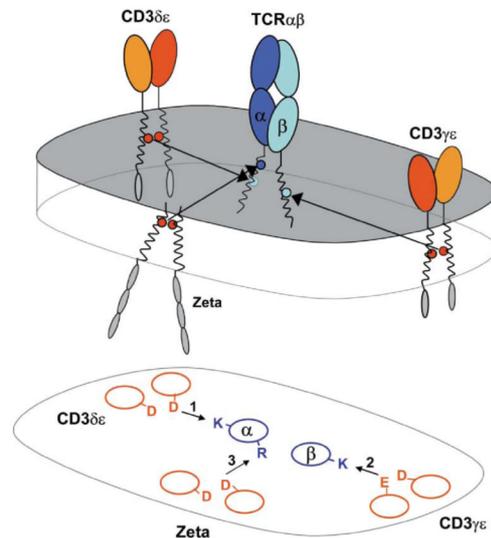


Figure 11 | **Assemblage du complexe TCR-CD3.** L'assemblage du complexe implique l'interaction par des liaisons faibles entre des résidus basiques sur les chaînes $\alpha\beta$ (en bleus) et des résidus acides sur les chaînes CD3 (en rouge). Call et al., 2002.

Les molécules CD3 possèdent dans leur partie intra-cytoplasmique, une ou plusieurs copies d'un motif ITAM (pour Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Ce motif, très conservé dans l'évolution, possède la séquence consensus Yxx(I/L)x₆₋₈Yxx(I/L). Suite à l'engagement du TCR, une kinase de la famille Src phosphoryle les résidus tyrosine présents dans les motifs ITAM, pouvant alors recruter des protéines de signalisation. Les chaînes CD3 δ , ϵ et γ possèdent chacune un motif ITAM dans leur partie intra-cytoplasmique alors que la chaîne ζ en possède trois (Irving et al., 1993; Wegener et al., 1992). Un complexe TCR-CD3 mature possède donc dix motifs ITAM permettant de déclencher la cascade de signalisation suite à l'engagement du TCR.

4. Mécanismes généraux d'activation du récepteur à l'antigène

Bien que les voies de signalisation déclenchées lors de l'engagement du récepteur T soient largement détaillées dans la littérature, très peu de choses sont connues sur les

mécanismes de phosphorylation des ITAM. Les modèles actuels suggèrent à la fois qu'une agrégation et des changements conformationnels du TCR sont nécessaires dans l'initiation du signal. Un troisième mécanisme, basé sur la ségrégation et la redistribution des complexes TCR-CD3, est aussi proposé dans la littérature comme moyen d'initier le signal induit par l'engagement du récepteur T (van der Merwe and Dushek, 2011).

a. Le modèle d'agrégation

Le modèle classique d'hétérodimérisation suggère que les co-récepteurs CD4 et CD8 associent le même complexe pCMH que le TCR. Cela permet à la tyrosine kinase Lck, constitutivement associée à CD4 ou CD8, de se trouver dans un environnement très proche des chaînes CD3 et de les phosphoryler (Figure 12A) (Trautmann and Randriamampita, 2003). La majorité des expériences montrent que ce modèle serait plus couramment utilisé par les lymphocytes T CD8⁺. En effet, plusieurs observations, basées sur l'utilisation de peptides antigéniques photoréactifs, ont démontré que l'interaction TCR/pCMH est grandement augmentée par CD8 (Luescher et al., 1995).

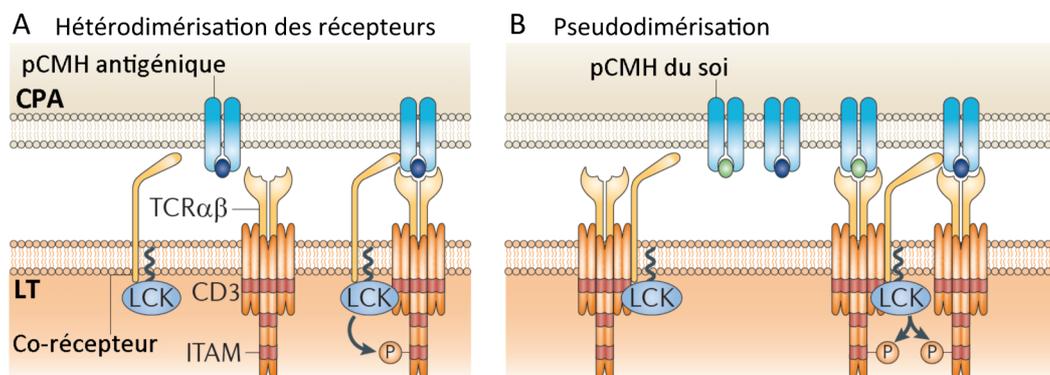


Figure 12 | **Les modèles d'agrégation.** (A) L'hétérodimérisation avec le co-récepteur CD4 ou CD8 permet de localiser la tyrosine kinase à proximité des motifs ITAMs. (B) Le modèle des pseudodimères hypothèse que deux TCR sont engagés ensemble, l'un par faible contact avec une molécule du CMH présentant un peptide du soi (en vert) et l'autre par fort contact avec un CMH présentant un peptide antigénique (en bleu). Le co-récepteur associé avec le premier TCR engage les deux TCR à signaler. Van der Merwe et al., 2010.

Le modèle de pseudodimérisation a été proposé pour expliquer des données obtenues avec les lymphocytes T CD4⁺. Celui-ci suggère que l'association classique TCR/pCMH est

stabilisée par une molécule CD4 apportée par une association entre un TCR et un CMH portant une molécule du soi, induisant une forte proximité entre les récepteurs T avec plusieurs molécules CD4 (Figure 12B) (Krogsgaard et al., 2005). Les travaux de Lindstedt *et al* renforcent cette idée en montrant que la dimérisation des molécules de classe II du CMH est nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Lindstedt et al., 2001). Ce modèle est particulièrement intéressant car les molécules de classe II du CMH portant un peptide antigénique sont moins nombreuses que celles portant un peptide du soi. Ainsi, la pseudodimérisation des récepteurs permet d'amplifier la réponse T en augmentant le recrutement de molécules du TCR qui ne sont pas associées à un complexe pCMH.

b. Le modèle de changement de conformation

Plusieurs équipes ont montré récemment que les formes non phosphorylées des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ se replient d'une manière bien spécifique pour interagir avec des vésicules constituées de différents types de lipides synthétisés pour mimer la constitution de la membrane plasmique interne (Aivazian and Stern, 2000; Xu et al., 2008). De plus, Xu *et al* ont également démontré que ce repliement induit l'association non covalente des résidus clés des motifs ITAM (tyrosine et isoleucine ou valine) avec les lipides de la membrane plasmique, empêchant la phosphorylation des motifs ITAM par Lck. Alarcon et ses collègues ont également montré que l'activation du TCR par des anticorps anti-CD3 ϵ ou par des molécules pCMH aboutit à un changement conformationnel de la chaîne CD3 ϵ , faisant apparaître un motif riche en proline capable d'associer le domaine SH3 de Nck (Gil et al., 2002; Gil et al., 2005; Risueno et al., 2008). Cependant, des études plus récentes ont montré que le recrutement de Nck sur la chaîne CD3 ϵ régule l'expression du complexe TCR-CD3 mais pas l'initiation du signal TCR, suggérant plutôt un rôle dans le développement des lymphocytes T (Gil et al., 2005; Mingueneau et al., 2008).

Bien que ces travaux sur le changement conformationnel des chaînes CD3 puissent expliquer l'initiation de la cascade de signalisation provoquée par l'engagement du TCR, on ne connaît pas encore les mécanismes mis en jeu lors de l'interaction TCR/pCMH qui induisent ces modifications de conformation. L'étude des structures cristallographiques des complexes TCR/pCMH révèle peu de changement dans la conformation du TCR, en dehors du site de liaison au peptide antigénique (Rudolph et al., 2006). Cependant, la

comparaison de la structure d'un TCR lié à son antigène ou non a permis d'observer une légère modification conformationnelle dans la boucle AB du domaine constant de la chaîne α ($C\alpha$) (Kjer-Nielsen et al., 2003). Une étude plus récente confirme par une technique différente ce changement conformationnel et démontre également que des mutations dans la boucle AB empêchent la reconnaissance de l'antigène par le TCR (Beddoe et al., 2009). Enfin Kuhns *et al* ont rapporté que des mutations dans la boucle AB du domaine $C\alpha$ inhibent la dimérisation du TCR, empêchent l'agrégation et la polarisation du TCR au site de contact cellule T/CPA et inhibent l'initiation de la cascade de signalisation en n'observant plus la libération du calcium intracellulaire (Kuhns et al., 2010). Cette étude clarifie les mécanismes d'initiation de la cascade de signalisation déclenchée par l'activation du TCR en proposant un modèle dans lequel le TCR se dimérise et oriente les homodimères $\zeta\zeta$ l'un en face de l'autre, ne permettant plus aux domaines cytoplasmiques des chaînes $CD3\zeta$ d'interagir avec les lipides de la membrane plasmique, rendant alors les motifs ITAM accessibles à Lck (Figure 13). De plus ces études confirment le modèle de pseudodimérisation et l'étude de Lindstedt *et al* montrant que la dimérisation des molécules du CMH est nécessaire à l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ (Lindstedt et al., 2001).

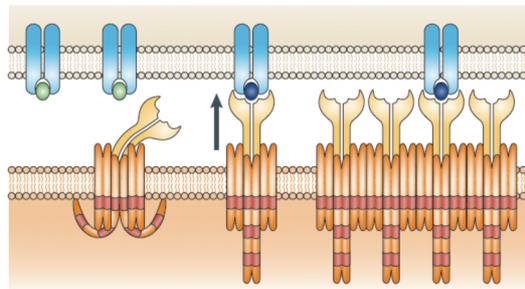


Figure 13 | **Le modèle de changement conformationnel.** L'association du TCR avec le pCMH provoque une modification conformationnelle des domaines intracellulaires des chaînes $CD3$, libérant l'accès des motifs ITAM à Lck. Van der Merwe et al., 2010.

Enfin, un dernier modèle très récent proposé par Minguet *et al* appuie la théorie d'un changement de conformation du complexe TCR- $CD3$ pour l'initiation du signal TCR. Leur modèle de « géométrie permissive » suppose l'interaction entre des dimères de molécules pCMH et deux complexes TCR- $CD3$. Cette interaction résulte en la rotation selon un axe perpendiculaire des chaînes $TCR\alpha\beta$, déplaçant les domaines

extracellulaires des molécules CD3. Les interactions des domaines transmembranaires entre les molécules CD3 et les chaînes TCR $\alpha\beta$ servent de point de rotation pour des mouvements de type « ciseaux » des domaines intracellulaires des molécules CD3, permettant d'exposer les motifs ITAM vers l'extérieur du complexe, les rendant accessibles à la phosphorylation par Lck (Minguet and Schamel, 2008).

c. Le modèle de ségrégation ou de redistribution

Ce troisième type de mécanisme proposé pour l'activation du récepteur T est basé sur la distribution des molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes T (complexe TCR-CD3, tyrosine kinases ou tyrosines phosphatases) le long de la membrane plasmique. Deux modèles de ségrégation ou de redistribution sont proposés : le modèle dynamique et le modèle des radeaux lipidiques.

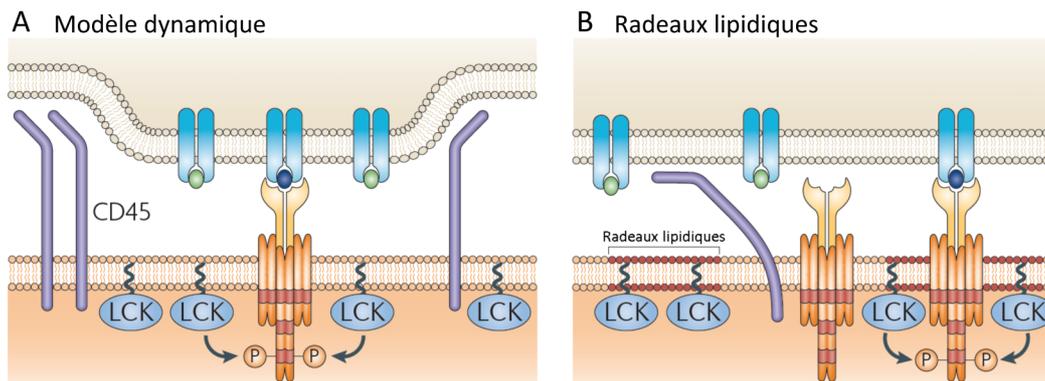


Figure 14 | **Le modèle de ségrégation.** (A) Ce modèle propose que l'association TCR-pCMH piège le complexe TCR-CD3 dans une zone de contact rapprochée avec la CPA, délogeant les phosphatases et permettant une phosphorylation des ITAMs prolongée. Le modèle des radeaux lipidiques (B) suggère que l'engagement du TCR relocalise le complexe TCR-CD3 dans les radeaux lipidiques qui est un environnement enrichi en kinase et déficient en phosphatases. Van der Merwe et al., 2010.

Le modèle dynamique est basé sur la redistribution des protéines membranaires en fonction de la taille de leur domaine extracellulaire. La reconnaissance de l'antigène par une cellule T sur une CPA engendre de nombreux sites de contacts à l'interface des deux cellules. Ces zones de contacts permettent l'association des complexes TCR-CD3 avec les molécules du CMH mais excluent également les protéines membranaires possédant un grand domaine extracellulaire comme les tyrosines phosphatases CD45 et CD148. A

l'inverse, les tyrosines kinases et les récepteurs co-activateurs ont toujours accès aux complexes TCR-CD3, favorisant la phosphorylation des motifs ITAM et l'initiation de la signalisation (Figure 14A) (Davis and van der Merwe, 2006). Plusieurs études confirment ce modèle. Tout d'abord, il a été démontré que les tyrosines phosphatases CD45 et CD148 sont exclues de la synapse immunologique et que des formes tronquées de ces phosphatases dans leur partie extracellulaire inhibent l'activation du TCR (Irles et al., 2003; Lin and Weiss, 2003; Varma et al., 2006). De plus, deux études récentes montrent qu'une élongation de la taille du complexe pCMH augmente la distance intercellulaire au niveau du site de contact entre la cellule T et la CPA. Les investigateurs de ces études ont observé que CD45 n'est alors plus exclue de la région d'agrégation des complexes TCR-CD3, résultant en une diminution de la phosphorylation et du recrutement de ZAP70 au site de contact et une inhibition de l'activation du TCR (Choudhuri et al., 2009; Choudhuri et al., 2005). Enfin les dernières observations attestant le modèle de ségrégation montrent que les ligands du TCR déclenchent une plus forte réponse lorsque ces ligands sont associés à une surface et non lorsqu'ils sont sous forme soluble, suggérant que le contact entre la cellule T et la CPA favorise l'activation du TCR (Geppert and Lipsky, 1987; Ma et al., 2008).

Le modèle des radeaux lipidiques propose que la reconnaissance du ligand par le TCR conduit à un recrutement des complexes TCR-CD3 au niveau des radeaux lipidiques. Comme ceux-ci sont enrichis en tyrosines kinases (comme Lck) et déficients en tyrosines phosphatases (comme CD45), le transit des complexes TCR-CD3 vers les radeaux lipidiques permettrait de favoriser la phosphorylation des motifs ITAM (Figure 14B). Cependant, le modèle des radeaux lipidiques reste encore controversé, d'une part à cause des techniques utilisées pour la détection des radeaux lipidiques (Munro, 2003) ou parce que certains groupes n'ont pas démontré l'importance de la formation des radeaux lipidiques dans l'initiation du signal TCR (Glebov and Nichols, 2004; Hashimoto-Tane et al., 2010; Zhu et al., 2005).

5. La synapse immunologique

L'activation de la cellule T résulte en la polarisation du centre d'organisation des microtubules (MTOC) au niveau du site de contact entre la cellule T et la CPA (Kupfer et al., 1987). Bien que la polarisation du MTOC a longtemps été observée comme une

caractéristique d'un contact adéquate entre la cellule T et la CPA, les mécanismes de signalisation responsables de ces mouvements restent peu définis. Les données récentes suggèrent que la protéine adaptatrice ADAP (un composant des complexes médiés par Slp-76 décrits plus tard dans ce manuscrit) régulerait ce mécanisme à travers son interaction avec la dynéine, une protéine motrice des microtubules (Combs et al., 2006). Les mouvements du MTOC ont été montrés comme étant essentiels pour la formation de la synapse immunologique (SI).

La SI est une structure organisée très dynamique qui se développe au site de contact entre la cellule T et la CPA. Elle est composée de deux régions concentriques basées sur leurs compositions protéiques : une zone centrale, appelée complexe d'activation supramoléculaire central (cSMAC) et une zone externe, appelée complexe d'activation supramoléculaire périphérique (pSMAC). Le cSMAC est une région riche en récepteurs, comme le complexe TCR-CD3, les co-activateurs CD2, CD4, CD8 et CD28 alors que le pSMAC se caractérise surtout par la présence de protéines d'adhérence, comme l'intégrine LFA-1 ou la molécule d'adhésion ICAM-1 (Figure 15) (Dustin et al., 2010). Bien que la SI ait été décrite depuis environ dix ans, son rôle exact dans l'activation des lymphocytes T reste peu clair. Initialement, la concentration des récepteurs dans le cSMAC a mené à supposer que le cSMAC est le site d'engagement du TCR et d'initiation du signal. Cependant, Lee *et al.*, ont montré dans deux études que le pic de signalisation induit par l'engagement du TCR se produit avant la formation du cSMAC. Les auteurs de ces études ont alors suggéré que le cSMAC est principalement le lieu de dégradation du complexe TCR-CD3 (Lee et al., 2003; Lee et al., 2002a; Varma et al., 2006). Plus récemment, il a été proposé que le cSMAC est le site à la fois de l'initiation du signal TCR et de sa dégradation et que la balance entre les deux mécanismes est régulée par la qualité de l'antigène. En effet, Cemerski et ses collègues ont montré que le cSMAC augmente le potentiel de stimulation des agonistes faibles alors que la signalisation est diminuée par des agonistes forts (Cemerski et al., 2008).

Bien que le rôle du cSMAC reste controversé, il est maintenant bien accepté que le signal TCR s'initie aux niveaux de microclusters situés en périphérie avant la formation de la SI. En effet, il a été montré que l'association TCR/pCMH résulte en la formation de microclusters composés de complexes TCR-CD3 associés à des molécules de signalisation capables de transduire un signal qui convergent ensuite vers le cSMAC. La formation et le transport de ces microclusters sont dépendants de la dynamique du

cytosquelette d'actine, permettant à de nouveaux clusters de migrer vers le cSMAC même après la formation de la SI (Bunnell, 2002; Campi et al., 2005; Varma et al., 2006; Yokosuka et al., 2005).

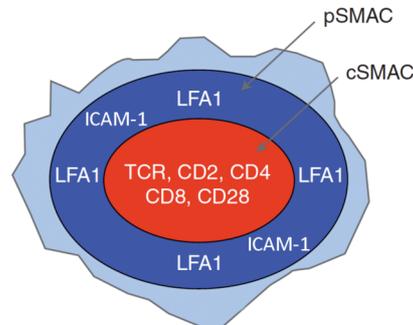


Figure 15 | **Structure de la synapse immunologique.** Le cSMAC (en rouge) se trouve au centre de la SI et contient les récepteurs comme le complexe TCR-CD3, CD28, CD4, CD8 et CD2. La région entourant le cSMAC est appelée pSMAC (en bleue) et contient les molécules d'adhésion comme LFA-1 ou ICAM-1. D'après Dustin et al., 2010.

A l'opposé du MTOC et de la SI, une autre structure organisée est formée et a été appelée complexe du pôle distal (DPC). Le rôle de la formation de ce DPC n'est pas encore très clair. Certains supposent que le DPC permet de séquestrer par les protéines ERM les régulateurs négatifs loin des complexes TCR-CD3 activés, permettant l'activation de la signalisation TCR. En effet il a été montré que la formation de ces complexes est dépendant du cytosquelette d'actine et de la phosphorylation des ERM qui migrent à la DPC (Allenspach et al., 2001). Récemment, il a été rapporté que la tyrosine kinase ZAP-70 est recrutée par les ERM à la SI ainsi qu'à la DPC, suggérant que des mécanismes de phosphorylation peuvent réguler un signal au niveau de la DPC (Ilani et al., 2007; Randriamampita et al., 2008).

Les mécanismes d'initiation du signal après reconnaissance de l'antigène par le TCR restent encore très controversés à l'heure actuelle. Cependant tous les modèles proposés convergent vers une colocalisation du complexe TCR-CD3 avec la tyrosine kinase Lck dont le but est la phosphorylation des motifs ITAM des domaines intracellulaires des molécules CD3, ce qui aura pour conséquence d'enclencher la cascade de signalisation.

6. Signalisation précoce induite par l'engagement du TCR

a. Mécanismes d'activation de la tyrosine kinase Lck

Lck est une tyrosine kinase cytosolique de la famille des Src kinases. Elle est constituée d'une courte région N-terminale modifiée post-traductionnellement par myristoylation de la glycine 2 et par acylation des résidus cystéine 3 et 5 qui lui permettent son ancrage dans la membrane plasmique (Kabouridis et al., 1997; Shenoy-Scaria et al., 1993). La région N-terminale est suivie par un domaine SH3 et un domaine SH2, du domaine catalytique et de la queue C-terminale (Boggon and Eck, 2004). L'activité kinase de Lck est régulée par la phosphorylation réversible de deux résidus tyrosine : la tyrosine 394, située dans le domaine catalytique, active la kinase alors que la tyrosine 505, localisée dans la queue C-terminale, inhibe Lck. La conformation inactive de Lck est stabilisée par deux repliements intramoléculaires. Tout d'abord, la phosphorylation de la tyrosine 505 par Csk entraîne son interaction avec le domaine SH2 (Bergman et al., 1992; Sicheri and Kuriyan, 1997). Cette interaction est ensuite stabilisée par l'association du domaine SH3 avec la région reliant le domaine SH2 et le domaine catalytique (Xu et al., 1997). Ces repliements provoquent le déplacement de résidus clés dans le domaine catalytique, bloquant l'accès au substrat et rendant la kinase inactive (Xu et al., 1999). L'inactivation de Lck peut être levée soit par engagement des domaines SH2 et SH3 sur ses cibles soit par déphosphorylation de la tyrosine 505 par CD45 après activation du TCR (Marti et al., 2006). La kinase se retrouve dans une conformation ouverte qui lui permet de s'activer par autophosphorylation sur la tyrosine 394 (Figure 16) (Abraham and Veillette, 1990).

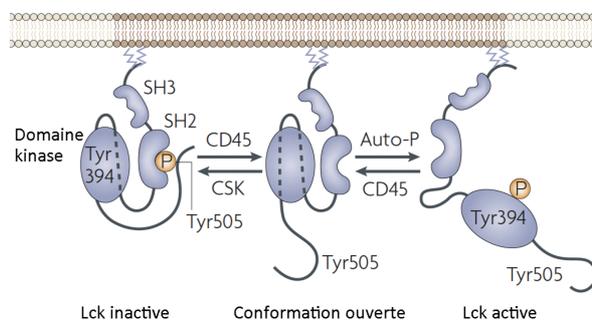


Figure 16 | **Modèle de régulation de la tyrosine kinase Lck par phosphorylation réversible.** La phosphorylation de la tyrosine Y505 par la tyrosine kinase Csk entraîne son association avec le domaine SH2 et induit un repliement conformationnel maintenant Lck dans une forme inactive. La déphosphorylation de la tyrosine Y505 par CD45 lève l'état inhibiteur de Lck. Celle-ci se retrouve dans une conformation ouverte qui lui permet de s'activer par auto-phosphorylation de la tyrosine Y394 du domaine kinase. D'après Acuto et al., 2008.

b. Lck est constitutivement associée à CD4 ou CD8

En plus de son ancrage à la membrane plasmique, le domaine N-terminal de Lck lui permet d'interagir de façon non covalente avec les corécepteurs CD4 et CD8 (Veillette et al., 1988). Plusieurs études ont approfondi la nature de l'interaction entre Lck et CD4 ou CD8 et ont montré que ces interactions, médiées par un atome de zinc, se font par des liaisons faibles entre deux résidus cystéine de la partie N-terminale de Lck et deux résidus cystéine du domaine cytoplasmique de CD4 ou de CD8 (Kim et al., 2003; Turner et al., 1990).

Suite à l'engagement du TCR, les corécepteurs CD4 ou CD8 sont relocalisés vers le TCR pour stabiliser le complexe TCR/pCMH. Ainsi, la tyrosine kinase Lck activée et associée au corécepteur sera en contact avec les molécules CD3, permettant la phosphorylation des résidus tyrosine des motifs ITAM (Barber et al., 1989; van Oers et al., 1996a). La principale protéine recrutée sur les motifs ITAM des chaînes CD3 lorsque ceux-ci sont phosphorylés est la tyrosine kinase ZAP-70 (pour Zeta-chain-Associated Protein kinase 70). La fixation de ZAP-70 sur les motifs ITAM doublement phosphorylés est médiée par l'interaction des deux domaines SH2 de ZAP-70 sur les deux tyrosines phosphorylées de l'ITAM (Chan et al., 1992). Ce recrutement permet un changement conformationnel de ZAP-70, libérant l'accès à la phosphorylation des tyrosines activatrices Y315 et Y319 (Figure 17).

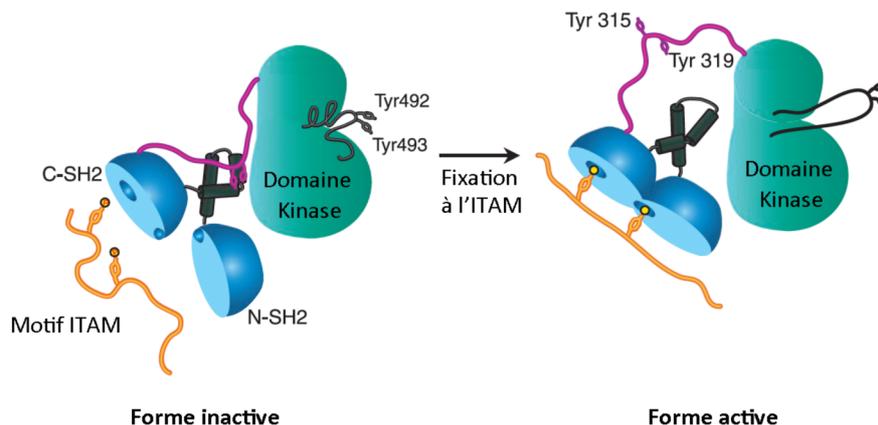


Figure 17 | **Modèle d'activation de la tyrosine kinase ZAP-70.** Le recrutement de ZAP-70 sur les motifs ITAM phosphorylés induit un changement conformationnel permettant la phosphorylation des tyrosines activatrices Y315 et Y319 par Lck ou par ZAP-70 elle-même. ZAP-70 est alors activée par auto-phosphorylation de la tyrosine Y394. D'après Au-Yeung et al., 2009.

Ces résidus tyrosine sont phosphorylés par Lck ou par ZAP-70 elle-même, rendant la kinase active en empêchant le repliement auto-inhibiteur (Au-Yeung et al., 2009). ZAP-70 termine son activation par la phosphorylation, par Lck ou par auto-phosphorylation, de la tyrosine Y493 localisée dans son site catalytique (Figure 17) (Chan et al., 1995). Le recrutement et l'activation de ZAP-70 génèrent la formation d'un premier complexe multiprotéique à la membrane responsable du déclenchement de la cascade de signalisation initiée par l'engagement du TCR.

De plus, d'autres études ont rapporté l'association de Shc, de la PI3Kinase, de Grb2, de Fyn et de Ras-GAP avec les différents motifs ITAM du complexe TCR-CD3. Ces études ont également montré que ces protéines possèdent une affinité différente selon l'ITAM et que certaines, comme Shc ou Grb2, associent sélectivement certains motifs ITAM (Isakov et al., 1995; Osman et al., 1996; Zenner et al., 1996). Cependant, le rôle fonctionnel de l'association de ces différentes protéines avec les motifs ITAM du complexe TCR-CD3 n'a pas été étudié.

c. La protéine adaptatrice LAT orchestre la cascade de signalisation

Une cible importante de la tyrosine kinase ZAP-70 est la protéine adaptatrice LAT (pour Linker of Activated T cells) (Zhang et al., 1998a). Il a été démontré le rôle central de LAT dans la signalisation induite par l'activation du TCR à l'aide d'une lignée de cellules T déficientes en LAT, les J.Cam2 dérivées de la lignée cellulaire Jurkat. Les expériences effectuées avec ces cellules J.Cam2 ont montré plusieurs défauts dans les événements de signalisation précoces, décrits plus tard dans ce manuscrit, induits après l'engagement du récepteur T (Balagopalan et al., 2010; Finco et al., 1998; Zhang et al., 1999b).

LAT est une protéine transmembranaire composée d'une très courte région extracellulaire de quatre acides aminés, d'un domaine transmembranaire et d'une longue région intracytoplasmique contenant neuf résidus tyrosine très conservés dans l'évolution. La région juxtamembranaire de LAT contient deux résidus cystéine (les cystéines C26 et C29 chez l'Homme) critiques pour la palmitoylation de LAT, sa localisation membranaire et sa fonction. La mutation de ces résidus cystéine inhibe la localisation de LAT dans les radeaux lipidiques et diminue sa phosphorylation en réponse à une activation du TCR (Zhang et al., 1998b). Bien que le rôle physiologique de

LAT dans les radeaux lipidiques soit toujours controversé, il est clairement établi que la palmitoylation de LAT est essentielle à sa fonction (Zhang et al., 1999b; Zhu et al., 2005).

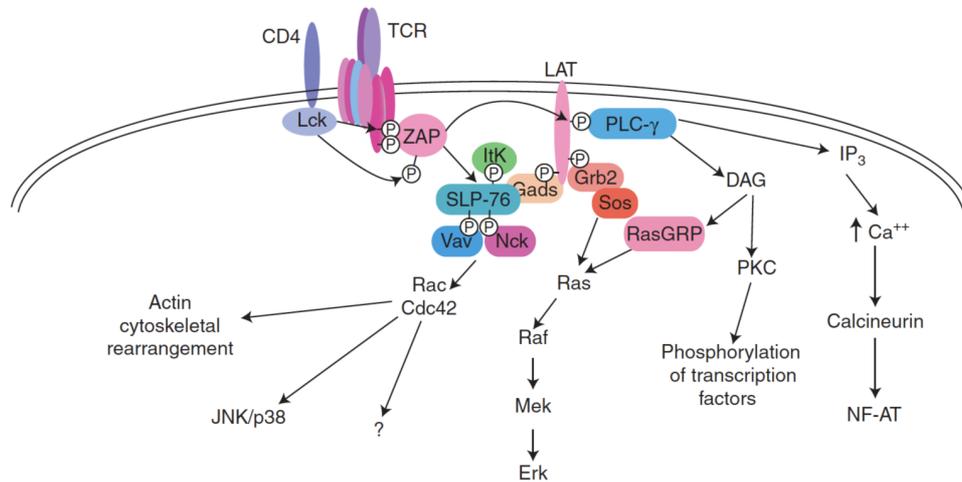


Figure 18 | **Voies de signalisation précoces induite par l'activation du TCR.** L'association TCR-pCMH induit l'activation de la kinase Lck qui phosphoryle les tyrosines des motifs ITAM des chaînes CD3. La kinase ZAP-70 est recrutée sur les ITAMs des chaînes CD3 et est activée par Lck. ZAP-70 phosphoryle la protéine d'échafaudage LAT qui orchestre la formation de complexes multiprotéiques à la membrane plasmique. Ces complexes initient les cascades de signalisation qui régulent l'activation des MAPKinases, la mobilisation du calcium, les réarrangements du cytosquelette, aboutissant à l'activation des facteurs de transcription et à l'activation du lymphocyte T.

LAT est rapidement phosphorylée après activation du TCR principalement par ZAP-70, mais des études ont montré que Lck et Itk peuvent également phosphoryler LAT (Figure 18) (Jiang and Cheng, 2007; Paz et al., 2001; Perez-Villar et al., 2002; Zhang et al., 1998a). La phosphorylation des tyrosines de LAT entraîne le recrutement de protéines de signalisation, décrites ci-après et confère à LAT les propriétés d'une protéine d'échafaudage. Ces protéines recrutent à leur tour de nouveaux partenaires pour former un deuxième complexe multiprotéique organisé autour de LAT à la membrane plasmique qui initie l'activation des voies de signalisation aboutissant à l'activation des lymphocytes T (Figure 18) (Smith-Garvin et al., 2009).

i. Activation de la phospholipase C gamma (PLC- γ)

La phospholipase PLC- γ a été le premier partenaire caractérisé de LAT (Gilliland et al., 1992). La PLC- γ est un important médiateur du signal TCR en hydrolysant le

phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) pour produire les seconds messagers suivants : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) (Lee et al., 1997). La PLC- γ associe, via son domaine SH2 N-terminal et avec une grande affinité, la tyrosine Y132 phosphorylée de LAT (Houtman et al., 2004; Zhang et al., 2000). Cependant, des expériences complémentaires ont prouvé qu'une activation complète de la PLC- γ est dépendante de son interaction avec d'autres protéines associées à LAT comme SLP-76 et Vav1 (Figure 18). La formation de ce complexe sur LAT est critique pour l'activation de la PLC- γ médiée par Itk (Reynolds et al., 2002; Yablonski et al., 2001). La kinase Itk est recrutée à la membrane plasmique après activation du TCR à travers l'interaction de son domaine PH avec le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃) généré par l'activation de la PI3K. A la membrane, Itk est phosphorylée et activée par Lck. Les domaines SH2 et SH3 d'Itk interagissent respectivement avec la tyrosine phosphorylée Y145 et la région riche en proline de Slp-76, permettant le recrutement d'Itk à proximité de la PLC- γ (Figure 18) (Beach et al., 2007; Bunnell et al., 2000).

ii. Association des membres de la famille Grb2 sur LAT

Grb2 (pour Growth factor Receptor-Bound protein 2) et Gads (Grb2-related Adaptor Downstream of Shc) sont deux protéines adaptatrices de la famille Grb2. Elles partagent une organisation commune composée d'un domaine SH2 flanqué par deux domaines SH3. Gads possède en plus un domaine riche en glutamine et un domaine riche en proline entre le domaine SH2 et le domaine SH3 C-terminal (Koretzky and Myung, 2001). Les domaines SH2 de Grb2 et de Gads leur permettent de s'associer à trois tyrosines phosphorylées différentes sur LAT : les tyrosines Y171, Y191 et Y226, permettant aux deux protéines de s'associer simultanément sur LAT (Zhang et al., 2000). Après activation du TCR, Grb2, via ses domaines SH3, recrute Sos1 (pour Son of sevenless homolog 1), un facteur d'échange de Ras, sur LAT. Cela permet de séquestrer Sos1 proche de la membrane où il pourra activer Ras et ainsi déclencher la cascade MAPKinase (Figure 18) (Buday et al., 1994).

La fonction principale de Gads est le recrutement de Slp-76 (pour Src Homology 2 (SH2) domain-containing Leucocyte Protein of 76 kDa) sur LAT. Un domaine SH3 de Gads associe le domaine riche en proline de Slp-76 pendant que le domaine SH2 de Gads interagit avec une tyrosine phosphorylée de LAT. (Liu et al., 1999).

iii. Slp-76 est la molécule centrale d'activation de la signalisation

Slp-76 est une protéine adaptatrice composée de trois tyrosines phosphorylables, d'un domaine riche en proline et d'un domaine SH2 (Koretzky et al., 2006). Ses trois tyrosines phosphorylées lui permettent de recruter des protéines, telles que la PI3K, Vav, Itk et Nck, dans le but d'initier différentes cascades de signalisation (Figure 18). La région centrale riche en proline associe Gads avec une grande affinité alors qu'elle peut associer également la PLC- γ mais avec une plus faible affinité (Houtman et al., 2004; Yablonski et al., 2001; Zhang et al., 2000). Cependant, le recrutement de Slp-76 sur LAT est fortement diminué lorsque la tyrosine Y132 de LAT est mutée, suggérant que le recrutement de Slp-76 sur LAT est stabilisé par la présence de la PLC- γ (Zhang et al., 2000). Enfin, le domaine SH2 de Slp-76 interagit avec ADAP et Shb pour médier des signaux d'activation.

La PI3Kinase (PI3K) est une lipide kinase composée de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85) et une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110). La PI3K catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) pour générer le second messager phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃). Après activation du TCR, le PIP₃ s'accumule à la membrane et permet le recrutement de protéines à domaine PH, telles que la PLC- γ , Sos1, RasGAP, Itk, Tec et Vav1 (Figure 18) (Fruman and Bismuth, 2009). Les premières études ont montré une interaction directe entre la PI3K et la tyrosine Y171 sur LAT (Fukazawa et al., 1995; Paz et al., 2001). Cependant, une étude plus récente a montré par double hybride que la PI3K peut associer directement Slp-76. Des expériences complémentaires ont prouvé que cette association est médiée par le domaine SH2 N-terminal de la sous-unité p85 et les tyrosines Y113 et Y128 de Slp-76 (Shim et al., 2004). La PI3K joue un rôle important dans l'activation des lymphocytes T, même si son mécanisme d'action reste encore assez méconnu. En effet, son inhibition par un inhibiteur pharmacologique résulte en une diminution de l'influx calcique après activation du TCR et de l'activation de Rac1 et de Erk 1/2. En revanche son inhibition n'a pas d'effet sur la phosphorylation de LAT, de Slp-76, de la PLC- γ ou de Vav1, suggérant que le rôle de la PI3K se situe en aval de la formation de complexes sur LAT (Cruz-Orcutt and Houtman, 2009).

Le double rôle du facteur d'échange Vav1 est clairement établi dans l'activation des lymphocytes T. La séquence de Vav1 révèle la présence de nombreux domaines capables de moduler sa fonction. Vav1 possède un domaine CH (pour Calponin Homology domain), une séquence d'acides aminés qui contient trois tyrosines régulatrices, un domaine DH (pour Duffy binding protein (DBP) Homology domain) qui module son activité de facteur d'échange, un domaine PH qui lui permet d'être recrutée à la membrane, et une région riche en proline associée à deux domaines SH3 entourant un domaine SH2 qui vont médier son rôle de protéine adaptatrice (Katzav, 2009). Suite à l'activation du TCR, Vav1 est recrutée par ses domaines SH2 et SH3 sur Slp-76 où elle participe à la formation du complexe menant à l'activation de la PLC- γ (Figure 18) (Onodera et al., 1996; Reynolds et al., 2002; Wu et al., 1996a). En plus de son rôle de protéine adaptatrice, Vav1, par sa fonction de facteur d'échange, active les GTPases Rho/Rac, initiant les cascades de signalisation qui vont réguler la réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation de la synapse immunologique (Hornstein et al., 2004). Enfin, il a également été montré que Vav1 forme un complexe avec les protéines adaptatrices Nck1 et WASp et régule la polymérisation de l'actine et les réarrangements du cytosquelette (Barda-Saad et al., 2005; Rivero-Lezcano et al., 1995; Wunderlich et al., 1999; Zeng et al., 2003).

L'activation des intégrines, suite à l'engagement du TCR, est médiée par le recrutement de la protéine adaptatrice ADAP (aussi connu comme FYB ou SLP-130) sur Slp-76. Cette interaction est dépendante du domaine SH2 de Slp-76 et de la phosphorylation de ADAP par la tyrosine kinase Fyn (da Silva et al., 1997). Le recrutement de ADAP sur Slp-76 permet la formation d'un complexe multi-protéique composé des protéines ADAP/SKAP55/RIAM/Rap1 à la synapse immunologique nécessaire à l'activation de LFA-1 (Baker et al., 2009; Horn et al., 2009).

Enfin, une dernière protéine identifiée comme participant aux complexes protéiques organisés autour de LAT est la protéine adaptatrice Shb. Il a été montré que Shb peut lier la chaîne CD3 ζ du TCR avec LAT. Le domaine SH2 de Shb associe CD3 ζ , pendant que son domaine PTB lie LAT et que ses régions riches en proline associent la PLC- γ et Grb2. Il a également été rapporté que Shb, phosphorylée par Fyn, associe également le domaine SH2 de Slp-76 et forme un complexe avec Gads, Slp-76 et Vav1. Les études sur Shb ont prouvé son importance dans l'activation des lymphocytes T car la surexpression d'une

forme mutée de Shb, ne pouvant plus lier de partenaires par son domaine SH2, diminue fortement la phosphorylation des protéines clés recrutées sur LAT, comme LAT elle-même, Slp-76, Vav1 ainsi que la PLC- γ . La surexpression de cette forme mutée de Shb résulte en une inhibition de la mobilisation du calcium intracellulaire et à une diminution de l'activation de la voie Jnk/MAPKinase ainsi que du facteur de transcription NFAT, aboutissant à une diminution de l'activation des lymphocytes T (Lindholm et al., 1999; Lindholm et al., 2002; Welsh et al., 1998). La protéine Shb a donc un rôle important dans la stabilisation et dans la phosphorylation des complexes multiprotéiques induits par l'activation du TCR.

L'activation du TCR mène à la phosphorylation et à la formation de complexes multiprotéiques organisés autour du couple LAT/Slp-76 aboutissant à la production des seconds messagers PIP₃, IP₂ et DAG ainsi qu'à l'activation des cascades MAPKinases. L'initiation de ces voies de signalisation conduit à la transcription de gènes spécifiques dans l'activation des lymphocytes T.

7. Voies de signalisation activées par les seconds messagers

a. Voies de signalisation médiées par le diacylglycérol (DAG)

Le DAG est produit, suite à l'engagement du TCR, par hydrolyse du PIP₂ en IP₃ + DAG par la PLC- γ activée lorsqu'elle est recrutée sur LAT (Lee et al., 1997). La production du DAG résulte en l'activation de deux voies de signalisation principales impliquant Ras et la PKC- θ .

Ras est une petite protéine G requise pour l'activation de la sérine/thréonine kinase Raf-1 qui initie l'activation de la cascade de phosphorylation des MAPKinase aboutissant à l'activation de Erk1/2. Ras est seulement active dans sa forme liée au GTP. Ce chargement en GTP est catalysé par un facteur d'échange GEF (pour Guanine-nucleotide Exchange Factor). Suite à l'activation du TCR, deux GEFs sont relocalisés à proximité de Ras pour l'activer. Ces deux GEFs sont Sos1 et RasGRP. RasGRP est recrutée à la membrane plasmique par fixation de son domaine C1 sur le DAG, où elle est phosphorylée et activée par la PKC- θ (Figure 18) (Ebinu et al., 1998; Roose et al., 2005).

Sos1 est constitutivement associée à Grb2 qui est recrutée sur LAT lors de l'activation du TCR (Finco et al., 1998). RasGRP et Sos1 activées agissent en synergie pour activer Ras qui va activer la cascade des MAPKinases (Roose et al., 2007). Ras active la MAPKinase Kinase Kinase Raf-1 qui phosphoryle et active la MAPKinase Kinase Mek qui phosphoryle et active les MAPKinase Erk1/2. Les kinases Erk1/2 activent la transcription de gènes clés dans l'activation des lymphocytes T, comme le gène *fos* pour produire le facteur de transcription c-Fos. L'activation de la kinase JNK aboutit à la phosphorylation et à la translocation du facteur de transcription c-Jun dans le noyau, où il s'hétérodimérise avec c-Fos pour former le facteur de transcription AP-1 qui à son tour active la transcription de gènes clés (Genot and Cantrell, 2000).

La deuxième voie de signalisation régulée par le DAG est celle médiée par la sérine/thréonine kinase PKC- θ . Le recrutement de la PKC- θ à la membrane est dépendant de sa phosphorylation par Lck qui induit un changement conformationnel permettant l'accrochage de la PKC- θ à la phosphatidylsérine (PS) ancrée à la membrane qui en retour augmente l'accrochage de la PKC- θ au DAG et permet l'activation de la protéine (Melowic et al., 2007). La fonction principale de la PKC- θ dans l'activation des lymphocytes T est l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Après engagement du TCR, la PKC- θ phosphoryle la kinase CARMA1, permettant son oligomérisation et son association avec Bcl10 (Matsumoto et al., 2005; Sommer et al., 2005). La protéine adaptatrice MALT1 associe Bcl10 pour former le complexe CBM (CARMA1/Bcl10/MALT1). Ce complexe CBM active l'ubiquitine ligase TRAF6 qui induit la dégradation de la sous-unité inhibitrice IKK γ associée à la kinase IKK. Celle-ci est alors activée et phosphoryle I κ B, l'inhibiteur de NF- κ B. I κ B se dissocie de NF- κ B puis est ubiquitinylé pour être dégradé (Sun et al., 2004). NF- κ B transloque alors dans le noyau, où il active la transcription de gènes impliqués dans la fonction, la survie et l'homéostasie des lymphocytes T (Figure 19) (Vallabhapurapu and Karin, 2009).

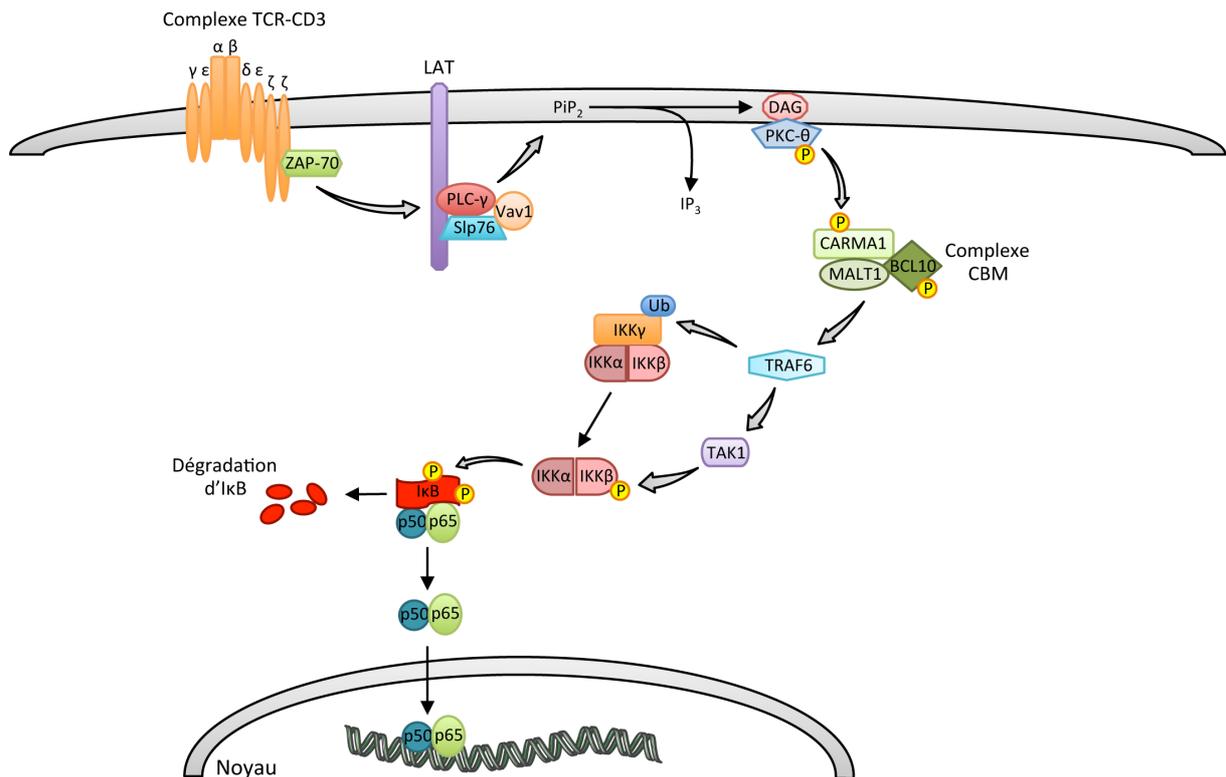


Figure 19 | **Activation de NF-κB dépendante de la PKC-θ.** Les voies de signalisation précoces induites par l'activation du complexe TCR-CD3 aboutissent à la production de DAG, au recrutement de la PKC-θ à la membrane et à son activation. La PKC-θ activée phosphoryle CARMA1 permettant la formation du complexe CBM. Par un mécanisme peu défini, le complexe CBM active l'ubiquitine ligase TRAF6. Celle-ci active la kinase IKK, composée des sous-unité IKKα et IKKβ, en induisant la dégradation de son inhibiteur IKKγ et en permettant sa phosphorylation par la kinase TAK1. La kinase IKK activée phosphoryle IκB, l'inhibiteur de NF-κB (composée des sous-unités p50-p65). La phosphorylation d'IκB induit la libération de NF-κB et sa translocation dans le noyau pour activer la transcription de gène clés dans l'activation T. D'après Vallabhapurapu S et Karin M, 2009.

b. Voies de signalisation médiées par le calcium Ca²⁺

Les ions Ca²⁺ sont des seconds messagers importants dans l'activation des voies de signalisation des cellules eucaryotes. L'IP₃ généré par la PLC-γ est libéré dans le cytoplasme des cellules et active son récepteur à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) qui libère les stocks de Ca²⁺ dans le cytosol. La déplétion en Ca²⁺ du RE provoque l'oligomérisation des protéines STIM1 à la membrane du RE. Les protéines STIM1 oligomérisées s'accumulent dans la région la plus proche de la membrane plasmique (MP), appelée « puncta » où STIM1 expose un motif basique C-terminal interagissant avec la MP. Au point de jonction RE-MP, STIM1 recrute et permet l'agrégation du canal calcique Orai1 en tétramère, rendant le canal CRAC (pour Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ channels) fonctionnel et permettant l'entrée du Ca²⁺

extracellulaire dans le cytoplasme (Liou et al., 2007; Penna et al., 2008; Wu et al., 2006a). L'activation des canaux CRAC, dépendante de la libération des stocks de calcium intracellulaire du RE, est un mécanisme appelé SOCE (pour Store-Operated Ca^{2+} Entry). Après activation du TCR, les protéines STIM1 et Orai1 sont recrutées à la synapse immunologique où elles co-localisent avec le TCR, les molécules co-activatrices et les protéines tyrosines phosphorylées (Lioudyno et al., 2008).

L'augmentation du niveau de Ca^{2+} intracellulaire induit l'activation de facteurs de transcription dépendant du Ca^{2+} et de la calmoduline, comme MEF2 et DREAM, ainsi que des protéines de signalisation comme la phosphatase calcineurine ou la kinase CaMK (pour Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase) qui en retour vont activer un grand nombre de facteurs de transcription. Les principaux facteurs de transcription activés par l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire suite à l'engagement du TCR sont les membres de la famille NFAT (pour Nuclear Factor of Activated T cells).

Les protéines NFAT font parties d'une famille de facteurs de transcription comprenant cinq membres : NFAT1 (NFATp, NFATc2), NFAT2 (NFATc, NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx, NFATc3) et NFAT5 (TonEBP pour Tonicity Element Binding Protein) qui est activé non pas par le Ca^{2+} mais par stress hypertonique (Lopez-Rodriguez et al., 1999; Miyakawa et al., 1999; Savignac et al., 2007). Récemment, il a été démontré chez deux familles qu'une mutation dans Orai1 cause une incapacité à activer le mécanisme SOCE provoquant une inhibition de l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire et un défaut d'activation des facteurs NFAT associé à une immunodéficience sévère (Feske et al., 2000; Feske et al., 2006). En travaillant sur des lignées de cellules issues de ces patients, il a été estimé que les facteurs NFAT activent ou répriment environ 75% des gènes dépendants du Ca^{2+} dans les lymphocytes T (Feske et al., 2001). De plus, des expériences de microarrays ont confirmé que la majorité des gènes induits après activation des lymphocytes T sont bloqués par des inhibiteurs de la calcineurine (Diehn et al., 2002). La calcineurine, activée par fixation du Ca^{2+} et de la calmoduline, déphosphoryle les membres de la famille NFAT (pour Nuclear Factor of Activated T cells), induisant leur translocation dans le noyau où ils vont coopérer avec d'autres facteurs de transcription pour activer la transcription de gènes (Jain et al., 1993; Park et al., 1995; Savignac et al., 2007). Le partenaire le plus connu pour NFAT est le facteur de transcription AP-1, produit de l'activation de la voie des MAPKinases et composé de l'hétérodimère c-Fos/c-Jun ou de l'homodimère c-Jun/c-Jun. Le complexe NFAT/AP-1 active l'expression de

nombreuses cytokines comme l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, l'IFN- γ et le GM-CSF, ainsi que des marqueurs d'activation des lymphocytes T, tels que CD25 ou CD69 (Jain et al., 1993; Macian et al., 2001). NFAT peut associer également d'autres facteurs de transcription, comme IRF-4 ou EGR-1 pour activer la transcription de l'IL-2 (Decker et al., 1998; Hu et al., 2002). Il a également été rapporté que NFAT forme un complexe avec les facteurs c-Maf et c-Jun ou avec IRF4 pour activer la transcription de l'IL-4 (Li et al., 1999a; Rengarajan, 2002). L'interaction entre GATA-3 et NFAT est importante pour l'expression de l'IL-4 et l'IL-5 (Zhang et al., 1999a). Récemment, Wu et ses collègues ont proposé que la fonction des lymphocytes Treg est médiée par le complexe FOXP3/NFAT. FOXP3 entre en compétition avec AP-1 pour la fixation avec NFAT et inhibe ainsi la production d'IL-2 (Wu et al., 2006b). Enfin, NFAT se complexe avec T-bet pour induire l'expression d'IFN- γ (Lee et al., 2004).

L'importance des facteurs NFAT a également été rapportée par l'étude des souris déficientes pour un ou plusieurs membres de la famille NFAT. Ces études ont montré que les facteurs NFAT possèdent des rôles redondants et participent, en fonction du partenaire associé, à la différenciation des différentes sous populations de lymphocytes T effecteurs. Les souris déficientes pour NFAT1 montrent une diminution de lymphocytes Th1, due à une diminution de la production d'IFN- γ , et un taux maintenu d'IL-4 favorisant une légère augmentation du nombre de cellules Th2 (Hodge et al., 1996; Kiani et al., 1997). A l'inverse, la délétion de NFAT2 montre une production d'IL-4 et d'IL-6 inhibée (Yoshida et al., 1998). Les cellules déficientes en NFAT4 n'ont pas de modifications dans leur production de cytokines mais présentent une hyperactivité suite à une activation du TCR. De plus, les souris déficientes pour NFAT4 possèdent une diminution de lymphocytes T périphériques due à une augmentation de l'apoptose des thymocytes double positif CD4⁺CD8⁺ dans le thymus (Oukka et al., 1998). NFAT4 aurait donc un rôle dans la génération et la survie des lymphocytes T.

Les souris doubles déficientes pour des membres de la famille NFAT présentent des défauts plus sévères. Les souris doubles déficientes pour NFAT1 et NFAT4 sont caractérisées par une forte réponse Th2 avec une augmentation de la production de cytokines Th2 ainsi que du taux d'IgG1 et d'IgE dans le sang (Ranger et al., 1998; Rengarajan et al., 2002). Enfin, la double délétion de NFAT1 et de NFAT2 est nécessaire à l'inhibition complète de la production de cytokines et de l'activation des lymphocytes T et B (Peng et al., 2001).

Toutes ces données suggèrent que NFAT1 et NFAT4 possèdent des rôles redondants dans les cellules immunitaires en favorisant la différenciation en lymphocyte Th1 alors que NFAT2 permet la différenciation des cellules en lymphocytes Th2.

L'activation des lymphocytes T dépend de la reconnaissance par le TCR d'un peptide antigénique présenté par les molécules du CMH sur une CPA, initiant un premier signal. Cependant, une activation complète de la cellule T nécessite un deuxième signal produit par l'activation de co-récepteurs présents à la synapse immunologique de la cellule T. Un lymphocyte T ne recevant pas ce deuxième signal ne s'active pas et rentre dans un état appelé anergie puis meurt par apoptose.

8. L'engagement des récepteurs co-activateurs est nécessaire à l'activation des lymphocytes T

Les signaux de co-stimulation sont de puissants modulateurs de la synthèse protéique, du métabolisme, de la progression dans le cycle cellulaire, de la survie et de la différenciation des lymphocytes T. Les récepteurs capables de médier les signaux de co-stimulation appartiennent à différentes familles de protéines : la famille des immunoglobulines (CD2, CD28, ICOS,...), la famille des récepteurs au TNF (CD27, DR3, OX40, 4-1BB), les intégrines (LFA-1), les récepteurs aux cytokines (IL-2R, IL4-R,...) et les récepteurs des chimiokines couplés aux protéines G (CCR1, CCR7, CXCR3 et CXCR4). Parmi tous ces récepteurs, CD28 semble être celui qui potentialise le plus la réponse T.

L'importance de CD28 fut démontrée par l'étude de l'extinction du récepteur dans la souris. Ces souris déficientes en CD28 montrent une forte diminution de la réponse des lymphocytes T après stimulation du TCR ainsi qu'un défaut de formation du centre germinatif et de la différenciation des lymphocytes T (Shahinian et al., 1993).

CD28 a été identifié pour la première fois en 1984 comme co-récepteur qui augmente la prolifération et permet la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs suite à l'activation du TCR (Gmunder and Lesslauer, 1984; Lesslauer et al., 1986). CD28 est une glycoprotéine transmembranaire de 44 kDa présente à la surface des lymphocytes T sous forme d'homodimère grâce à un pont disulfure entre deux cystéines de la région transmembranaire (Aruffo and Seed, 1987). La région extracellulaire de CD28 se compose d'un simple domaine de type immunoglobuline contenant un motif MYPPPY

très conservé entre les espèces (Harper et al., 1991). Ce motif permet l'interaction de CD28 avec ses ligands CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) (Azuma et al., 1993; Linsley et al., 1990; Peach et al., 1994). Le domaine intracellulaire de CD28 est composé de 41 acides aminés sans activité enzymatique apparente mais possède en revanche une tyrosine phosphorylable par Lck ou par Fyn sous activation du TCR et de CD28 (motif YMMN) et deux domaines riche en proline (P¹⁷⁵RRPGP et P¹⁸⁷YAPP) (Raab et al., 1995; Rudd et al., 2009).

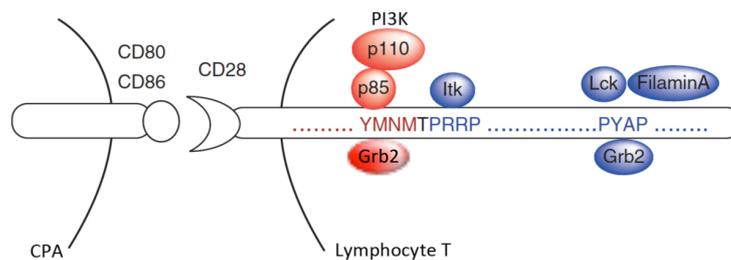


Figure 20 | Motifs d'interactions protéiques présents dans la queue cytoplasmique de CD28. L'activation de CD28 par CD80 ou CD86 sur la CPA initie le recrutement de protéines sur CD28 et la cascade de signalisation. La tyrosine du motif proximal YMMN est phosphorylée par Lck et associe les domaines SH2 de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3Kinase et de Grb2 (en rouge). Le motif riche en prolines proximal PRRP recrute les kinases de la famille Tec comme Itk (en bleu). Le motif riche en prolines distal PYAP associe les domaines SH3 de Lck, Grb2 et de la filamine A. Boomer et al., 2010.

Suite à l'activation du TCR et de CD28, la tyrosine du motif YMMN est phosphorylée et recrute la PI3Kinase par le domaine SH2 de la sous-unité régulatrice p85 (Figure 20) (Pages et al., 1994; Prasad et al., 1994; Truitt et al., 1994). La PI3Kinase catalyse la production de PIP₂ et de PIP₃ à la membrane qui recrutent des protéines à domaine PH comme les sérine/thréonine kinases PDK1 et AKT. L'activation d'AKT par PDK1 régule de nombreuses voies de signalisation liées à la synthèse protéique, au métabolisme cellulaire et à la survie cellulaire (Costello et al., 2002; Frauwirth et al., 2002; Harriague and Bismuth, 2002). L'activation d'AKT dépendante de l'activation de CD28 conduit à une augmentation de l'expression du transporteur du glucose Glut1 permettant une augmentation du glucose dans les cellules, une augmentation de la glycolyse et de l'activation des lymphocytes T (Frauwirth et al., 2002; Jacobs et al., 2008).

L'utilisation d'un CD28 muté sur la tyrosine, empêchant les protéines à domaine SH2 d'être recrutées sur CD28, ou sur la méthionine en +3 de la tyrosine, inhibant seulement l'interaction avec la PI3Kinase, montre des résultats similaires d'inhibition de la

production d'IL-2 par les cellules stimulées CD3+CD28 (Cai et al., 1995; Cefai et al., 1996). Ces études indiquent que le recrutement de la PI3Kinase est nécessaire à la production d'IL-2 suite à une activation CD3+CD28 des lymphocytes T. L'activation d'AKT par la PI3Kinase pourrait jouer un rôle crucial dans ce mécanisme. En effet, AKT phosphoryle et active la kinase IKK qui pourra phosphoryler I κ B, permettant la translocation de NF- κ B dans le noyau où il pourra jouer son rôle de facteur de transcription (Romashkova and Makarov, 1999). Des études plus récentes confirment le rôle d'AKT dans l'activation de NF- κ B. Narayan et ses collègues ont montré qu'AKT s'associe avec CARMA1 et que ce complexe est nécessaire à la phosphorylation de Bcl10 par AKT ainsi qu'à la formation du complexe CBM pour l'activation de NF- κ B (Figure 21) (Narayan et al., 2006). De plus, des expériences sur des souris déficientes en E3 ubiquitine ligase Cbl-b montre une hyperactivation de NF- κ B due à une activation continue d'AKT après stimulation par CD3+CD28. En revanche, ces cellules ne présentent pas de modification dans l'activation des facteurs NFAT ou AP-1, démontrant que l'hyperactivation de NF- κ B est spécifique de l'activation d'AKT (Qiao et al., 2008).

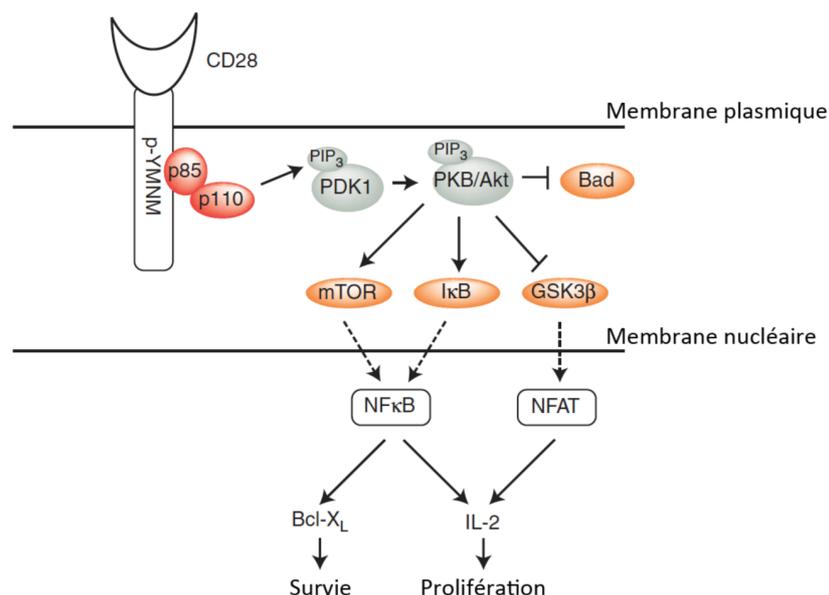


Figure 21 | **Voies de signalisation dépendantes du recrutement de la PI3Kinase sur CD28.** la phosphorylation de la tyrosine du motif YMNIM permet le recrutement de la PI3Kinase sur CD28. La PI3Kinase catalyse la production de PIP₃ à la membrane. Le PIP₃ recrute les kinases PDK1 et Akt via leur domaine PH, aboutissant à l'activation d'Akt. Akt phosphoryle ses cibles dont mTOR et I κ B menant à l'activation de NF- κ B. Akt inhibe la GSK3, prolongeant l'activation de NFAT. Les activations de NF- κ B et de NFAT résultent à la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération des cellules. Boomer et al., 2010.

Une autre cible d'AKT est la kinase GSK-3, une sérine/thréonine kinase qui permet l'export de NFAT du noyau en la phosphorylant. AKT phosphoryle et inhibe GSK-3, prolongeant la localisation nucléaire de NFAT et ainsi la transcription de l'IL-2 après une costimulation CD28 (Figure 21) (Cross et al., 1995). Plus récemment, un nouveau mécanisme de régulation de NFAT par AKT a été proposé. NFAT est inactivée dans le cytoplasme par phosphorylation et par association avec un inhibiteur, la protéine adaptatrice Homer, empêchant ainsi la déphosphorylation de NFAT par la calcineurine (Huang et al., 2008). Huang et ses collègues ont alors montré qu'une stimulation CD3+CD28 induit la phosphorylation d'Homer par AKT et la dissociation du complexe Homer/pNFAT. Ces études montrent le rôle d'AKT dans la transcription de gènes nécessaires à l'activation des lymphocytes T après une stimulation CD3+CD28.

Il a également été montré, *in vitro* et *in vivo*, que l'association de la PI3Kinase sur CD28 initie des signaux de survie qui inhibent l'apoptose des cellules T lors de leur activation (Burr et al., 2001; Okkenhaug et al., 2001). De plus, CD28 a longtemps été assimilé comme co-activateur inhibant l'AICD (pour Activation Induced Cell Death), la mort des cellules provoquée lors d'une restimulation par l'antigène (Radvanyi et al., 1996; Sperling et al., 1996). Dans le cas de l'apoptose induite par les récepteurs de mort, tel que CD95 (Fas), la co-stimulation par CD28 induit une diminution de l'expression de FasL à la membrane ainsi qu'une augmentation de l'expression de c-FLIP. c-FLIP surexprimé va interférer avec la formation du complexe DISC, provoquant une diminution de l'activation de la caspase-8. Enfin, l'activation d'AKT par la PI3Kinase inhibe également la formation du complexe DISC, diminuant l'apoptose des cellules lors d'une restimulation par l'antigène (Jones et al., 2002; Kirchhoff et al., 2000). L'activation d'AKT augmente aussi l'expression de protéines anti-apoptotique, comme Bcl-x_L ou Bcl-2, conduisant à la survie des cellules (Boise et al., 1995; Burr et al., 2001).

Il a été rapporté qu'après co-stimulation CD3+CD28, la tyrosine phosphorylée du motif YMNM de CD28 associe la protéine adaptatrice Grb2. Cette interaction est renforcée par l'association d'un domaine SH3 de Grb2 sur le motif riche en proline P¹⁸⁷YAPP de CD28 (Figure 20) (Kim et al., 1998; Okkenhaug and Rottapel, 1998). Grb2 recrute Vav1 sur CD28 où elle est activée par phosphorylation et active Rac1 aboutissant à l'activation de la MAPKinase JNK ainsi qu'à l'activation des facteurs de transcription NFAT/AP-1. Des expériences effectuées avec des protéines mutées pour inhiber la formation du

complexe CD28/Grb2/Vav1 ont montré un rôle crucial pour ce complexe dans la production de l'IL-2 (Figure 22) (Kim et al., 1998; Schneider and Rudd, 2008).

Le premier motif riche en proline P¹⁷⁵RRPGP de CD28 a été montré associé aux domaines SH3 des kinases de la famille Tec, Itk, et Tec (August et al., 1994; Marengere et al., 1997; Yang et al., 1999) pendant que le deuxième motif P¹⁸⁷YAPP lie les domaines SH3 de Lck, Grb2 et de la Filamine A (FLNA) (Figure 20) (Holdorf et al., 1999; Okkenhaug and Rottapel, 1998; Tavano et al., 2006).

La génération de PIP₃ par l'activation de la PI3Kinase sert de site d'ancrage à la membrane pour les kinases de la famille Tec, permettant leur proximité avec CD28. Ainsi, Itk peut s'associer directement avec CD28 via l'interaction de son domaine SH3 avec le motif riche en proline proximal P¹⁷⁵RRPGP de CD28 (Figure 22) (Marengere et al., 1997). Les dernières études publiées montrent que l'association entre Itk et CD28 est dépendante de Lck et que le recrutement d'Itk induit la phosphorylation et l'activation de la kinase (Gibson et al., 1996; Raab et al., 1995). Cependant, les études sur les souris déficientes pour Itk montrent que la signalisation induite par CD28 est toujours intacte, suggérant que le rôle majoritaire d'Itk est situé dans les complexes protéiques induits par la phosphorylation de LAT (Blomberg et al., 2009; Li and Berg, 2005). De la même manière que pour Itk, la kinase Tec associe le domaine riche en proline proximal de CD28 dépendamment de Lck. Cependant, la kinase Tec semble avoir un rôle plus important qu'Itk dans la signalisation médiée par CD28. En effet, l'activation CD3+CD28 induit le recrutement de la kinase Tec sur CD28 qui phosphoryle la protéine adaptatrice Dok-1. Des expériences complémentaires de surexpression d'une forme mutée de Tec ne possédant plus d'activité enzymatique ont montré que Tec induit l'expression d'IL-2 et d'IL-4 lorsque les cellules sont activées par CD3+CD28 (Yang et al., 1999; Yang and Olive, 1999).

La tyrosine kinase Lck est également recrutée via son domaine SH3 sur la région riche en proline distale PYAPP de CD28 et permettrait d'amplifier les événements de phosphorylation induits par l'engagement du TCR (Figure 22) (Holdorf et al., 1999).

Très récemment, plusieurs groupes ont montré que la filamine A (FLNA), une protéine adaptatrice liant l'actine, s'associe à CD28 lorsque les cellules sont activées et est nécessaire à la formation des radeaux lipidiques ainsi qu'à la relocalisation de CD28 dans la synapse immunologique (Sanchez-Lockhart et al., 2008; Tavano et al., 2006). D'autres groupes ont également montré que l'interaction entre FLNA et CD28 permet la

relocalisation et l'activation de la PKC- θ au niveau de la synapse immunologique (Hayashi and Altman, 2006; Yokosuka et al., 2008). Tavano et ses collègues ont montré que l'extinction de FLNA par ARN interférence conduit à une diminution de l'activation de NFAT et de Cdc42 et d'expression d'IFN- γ lorsque les cellules sont stimulées par CD3+CD28 (Tavano et al., 2006). Par la suite, Hayashi et Altman ont montré de la même manière en éteignant FLNA, que le recrutement de la PKC- θ sur CD28 via FLNA régule l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et, en accord avec l'étude précédente, ils démontrent que le complexe CD28/FLNA/PKC- θ augmente la production d'IL-2 lorsque les cellules sont activées (Hayashi and Altman, 2006).

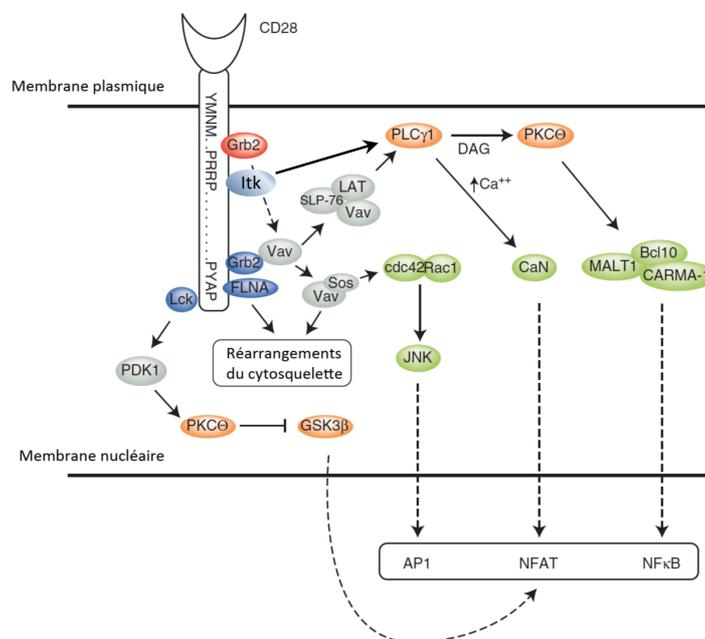


Figure 22 | **Voies de signalisation induites par le recrutement des protéines adaptatrices sur CD28.** Grb2 est recrutée sur CD28 par l'interaction entre son domaine SH2 et le motif pYAP et l'interaction entre un domaine SH3 et le motif distal PYAP. Grb2 recrute ainsi Vav1 sur CD28 et amplifie les signaux initiés par le complexe protéique orchestré par LAT en permettant l'activation de la PKC- θ et de la PLC- γ . Les complexes protéiques autour de CD28 contribuent aux réorganisations du cytosquelette d'actine et à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans l'activation des lymphocytes T. Boomer et al., 2010.

Très récemment, le groupe d'Altman a montré que la PKC- θ associe CD28 via Lck (Kong et al., 2011). Ils ont identifié une région riche en proline dans le domaine V3 de PKC- θ et ont démontré que le domaine SH3 de Lck associe cette région riche en proline pendant que le domaine SH2 de Lck interagit avec la tyrosine phosphorylée du motif YMNM de CD28. Dans des expériences de surexpression d'un peptide correspondant au domaine

V3 muté de la PKC- θ ou en mutant directement la région riche en proline du domaine V3, les investigateurs inhibent l'interaction de la PKC- θ endogène avec CD28. Ils ont alors observé une diminution de l'activation des cellules en réponse à une co-stimulation CD3+CD28. L'inhibition du recrutement de la PKC- θ sur CD28 cause une diminution de la relocalisation de la PKC- θ au niveau de la synapse immunologique, inhibant alors son activité et provoquant une diminution d'activation des facteurs de transcription AP-1 et NFAT, résultant en une diminution d'expression d'IL-2 et des marqueurs CD25 et CD69 à la surface des cellules.

L'engagement du TCR initie un premier signal permettant la formation de complexes protéiques à la synapse immunologique qui vont déclencher les cascades de signalisation. L'activation du co-activateur CD28 permet d'amplifier quantitativement ces cascades de signalisation et déclenche également des signaux de survie pour aboutir à la survie et à l'activation complète des lymphocytes T (Figure 22). L'activation de CD28 augmente l'expression d'une seconde vague de co-récepteurs, tel que ICOS, CTLA-4, CD40-L, OX40 qui vont prolonger les signaux d'activation (Acuto and Michel, 2003).

Les récepteurs de la famille CD2 de la superfamille des immunoglobulines font aussi partis des co-activateurs de la réponse T. Dans cette famille CD2, les récepteurs de la famille SLAM ont été caractérisés comme des co-activateurs essentiels à une réponse T optimale. En effet, les études récentes montrent que l'engagement de ces récepteurs régule les fonctions immunitaires telles que la production de cytokines, la cytotoxicité, la mise en place de la réponse humorale ou l'homéostasie de certaines populations de cellules.

III. Les récepteurs de la famille SLAM et la protéine adaptatrice SAP

1. Généralités sur les récepteurs de la famille SLAM

La famille des récepteurs SLAM comprend neuf membres : SLAM (CD150, slamf1), CD48 (slamf2), Ly9 (CD229, slamf3), 2B4 (CD244, slamf4), CD84 (slamf5), NTB-A (aussi connu comme SF2000 chez l'Homme ou Ly108 chez la souris, CD352, slamf6), CRACC (appelé aussi CS1, CD319, slamf7), BLAME (slamf8), et CD84-H1 (SF2001, slamf9). Les gènes codant pour les récepteurs SLAM sont localisés sur le chromosome 1 chez la souris (locus H2) et chez l'Homme (locus 1q23). Sept de ces gènes (slamf1-7) sont retrouvés dans un environnement très proche (moins de 400 kb), alors que les gènes codant pour slamf8 et slamf9 sont localisés dans la même région chromosomique mais en dehors du locus SLAM (Figure 23). L'organisation et la localisation des gènes des récepteurs SLAM suggèrent que ceux-ci sont issus de multiples duplications d'un ancêtre commun (Kingsmore et al., 1995).

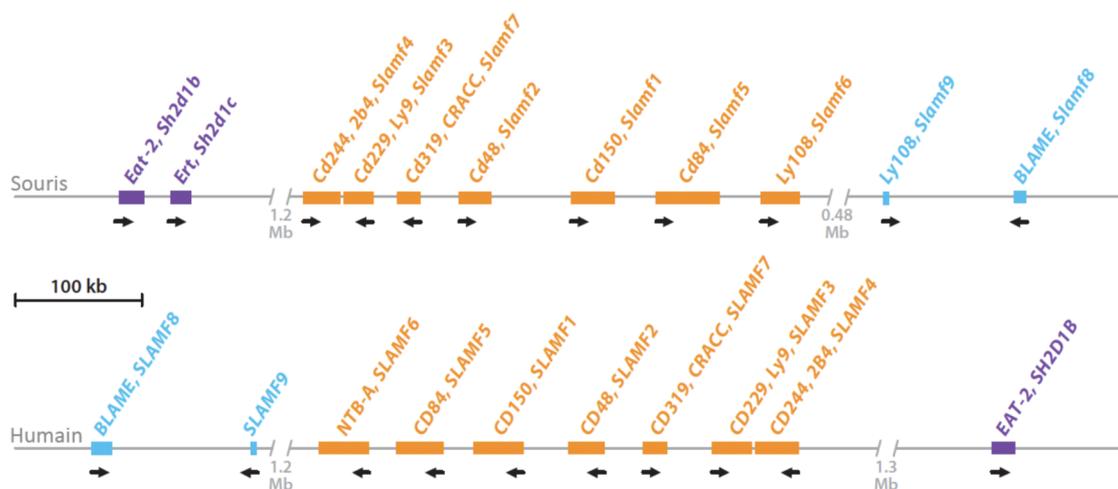


Figure 23 | **Organisation du locus slam chez l'Homme et la souris.** Les gènes codant les récepteurs de la famille SLAM sont localisés sur le chromosome 1q23 chez l'Homme et 1H2 chez la souris. Les gènes codant les membres de la famille SLAM sont regroupés dans un segment génique de 359 kb chez l'Humain et de 392 kb chez la souris. Les gènes SLAMF8 et SLAMF9 qui appartiennent à la famille des récepteurs SLAM sont localisés dans la même région chromosomique mais en dehors du locus slam. L'arrangement des gènes de la famille SLAM est identique entre l'Humain et la souris à l'exception de l'orientation des gènes relative à la position du centromère. Les flèches indiquent le sens de la transcription des gènes. Cannons et al., 2011.

Sur la base des homologies de séquences de leur partie extracellulaire, les récepteurs SLAM ont été classés dans la famille CD2 de la superfamille des immunoglobulines (Calpe et al., 2008; Cannons et al., 2011; Latour and Veillette, 2004; Tangye et al., 2000a).

Tous les membres de la famille (excepté CD48) partagent une organisation structurale commune. Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire formé de deux domaines de type immunoglobuline, un domaine transmembranaire, et une partie intracytoplasmique contenant des motifs à base de tyrosine.

Le domaine extracellulaire, pour la majorité des récepteurs de la famille SLAM, comprend deux domaines Ig-like arrangés en tandem qui sont un domaine V-like en position distale de la membrane, associé à un domaine C2-like plus proche de la membrane. Seul Ly9 fait exception, son domaine extracellulaire étant composé de quatre domaines Ig-like, dû à la duplication du tandem V-like et C2-like (Figure 24) (Sandrin et al., 1992). Les récepteurs SLAM interagissent spécifiquement avec leurs ligands via leurs domaines extracellulaires. SLAM, CD84, Ly9, NTB-A et CRACC participent dans des interactions homotypiques, alors que CD48 est le ligand de 2B4 (Brown et al., 1998; Falco et al., 2004; Kumaresan et al., 2002; Martin et al., 2001; Punnonen et al., 1997; Romero et al., 2005).

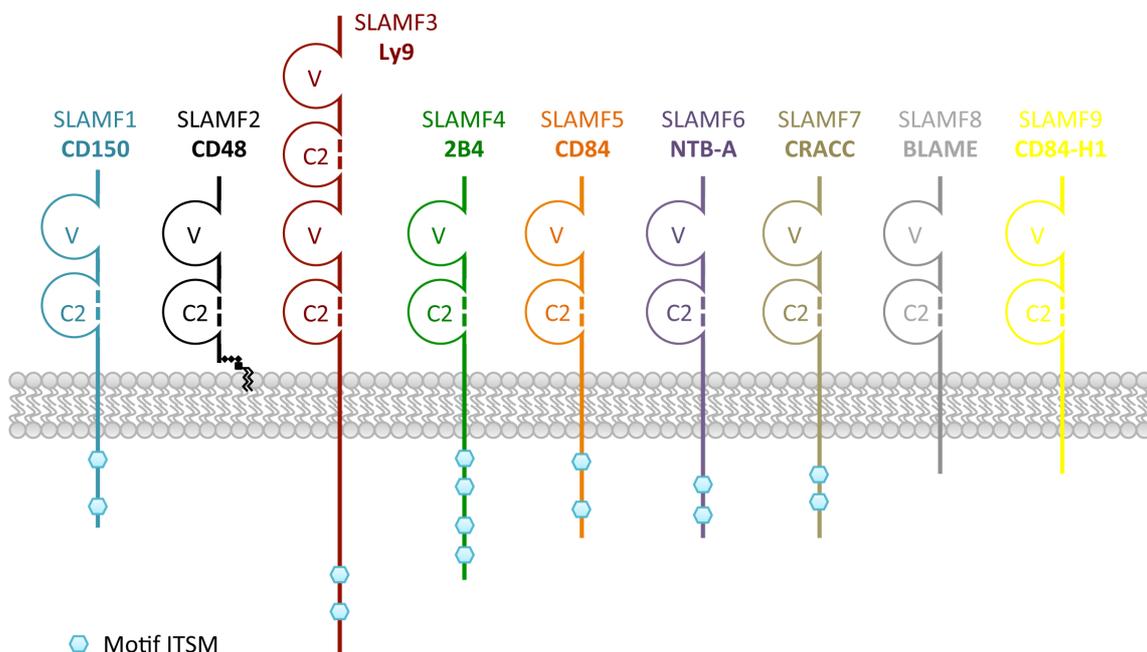


Figure 24 | **Membres des récepteurs de la famille SLAM humains.** Les récepteurs de la famille SLAM sont des glycoprotéines transmembranaires de type I caractérisées par un domaine N-terminal de type immunoglobuline V et un domaine proximal de la membrane de type immunoglobuline C2. Les queues cytoplasmiques des récepteurs SLAM, Ly9, 2B4, CD84, NTB-A et CRACC contiennent au minimum un motif ITSM pouvant lier SAP ou EAT2. D'après Cannons, et al., 2011.

Alors que huit récepteurs SLAM sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 avec un domaine cytoplasmique, CD48 est ancrée à la membrane plasmique via un glycosylphosphatidylinositol (GPI) et ne possède donc pas de partie intra-cytoplasmique.

Les régions intra-cytoplasmiques des récepteurs SLAM varient en longueur, en séquence ainsi que dans le nombre de motifs à base de tyrosine présent. Ainsi BLAME et CD84-H1 possèdent chacun une courte partie C-terminale, perdant leurs motifs à base de tyrosine et suggérant que ces deux molécules pourraient être des récepteurs orphelins (Kingsbury et al., 2001; Zhang et al., 2001). Les autres membres de la famille possèdent dans leur partie cytoplasmique une ou plusieurs copies d'un motif à base de tyrosine appelé ITSM (Figure 18).

2. Les motifs ITSM

Les motifs ITSM (pour Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) sont de courtes séquences consensus T/SxYxxI/V (où x représente n'importe quel acide aminé). Ces motifs sont organisés autour d'un résidu tyrosine pouvant être phosphorylé par une tyrosine kinase de la famille Src. Ces motifs diffèrent des motifs de type ITAM qui sont caractérisés par deux motifs YxxI/L séparés par une courte séquence composée de six à huit acides aminés. Cependant, les motifs ITSM sont très proches des motifs ITIM dont la séquence I/VxYxxI/V/L est aussi organisée autour d'un seul résidu tyrosine mais dont le résidu en -2 de la tyrosine est différent (Ostrakhovitch and Li, 2006).

De façon similaire aux motifs ITAM ou ITIM, les motifs ITSM, phosphorylés sur leur résidu tyrosine, recrutent des protéines à domaine SH2. En fonction du récepteur de la famille SLAM ou du type cellulaire impliqué, différents groupes ont montré que les phosphatases Shp-1, Shp-2 ou SHIP peuvent s'associer aux récepteurs de la famille SLAM via les motifs ITSM (Lewis et al., 2001; Shlapatska et al., 2001). Il a également été démontré que la tyrosine kinase Fyn et la sous unité régulatrice p85 de la PI3Kinase peuvent s'associer à un motif ITSM (Aoukaty and Tan, 2002; Sayos et al., 1998). Cependant, il est maintenant clairement établi que l'association de ces diverses protéines avec les récepteurs de la famille SLAM est finement régulée par les membres de la famille de protéines adaptatrices SAP (pour SLAM-Associated Protein). Ainsi,

différentes signalisations activatrices ou inhibitrices peuvent être induites en fonction de la protéine recrutée sur le motif ITSM, d'où leur nom de « switch motif ».

3. Les protéines adaptatrices de la famille SAP

a. Généralités

La famille SAP comprend trois membres : SAP (SH2D1A ou DHSP), Ewing's sarcoma-associated transcrit-2 (EAT-2 ou SH2D1B) et, chez les rongeurs, EAT-2-related transducer (ERT ou SH2D1C). Ces trois protéines partagent une structure commune consistant exclusivement en un domaine SH2 suivi d'une courte queue C-terminale. EAT-2 et ERT possèdent une grande similarité de séquences entre eux (85% d'homologie de séquence) en comparaison avec la protéine SAP (seulement 45% d'homologie de séquence). Les gènes codant pour EAT-2 et ERT sont positionnés en tandem sur le chromosome 1, proche du locus de gènes codant pour les récepteurs de la famille SLAM (Figure 23), tandis que le gène codant pour SAP se trouve sur le chromosome X. Grâce à leur domaine SH2, les protéines de la famille SAP s'associent, avec une haute affinité, sur les motifs ITSM des récepteurs de la famille SLAM, à l'exception de CRACC qui n'associe que EAT-2 et ERT (Cannons et al., 2011; Veillette, 2006).

b. La protéine SAP

En 1998, trois différents groupes ont identifié le gène *sh2d1a* comme étant responsable du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP). L'identification du gène s'est fait par deux approches différentes. Coffey *et al* et Nichols *et al* ont utilisé une technique de clonage positionnel et la construction de contigs YAC chevauchant le locus Xq25 dans le but d'identifier le gène responsable du XLP (Coffey et al., 1998; Nichols et al., 1998). A la recherche de nouveaux partenaires du récepteur SLAM, Sayos *et al* ont identifié la protéine SAP par double-hybride en utilisant le domaine intra-cytoplasmique du récepteur SLAM comme appât et une banque d'ADNc de lymphocytes T humains comme proie (Sayos et al., 1998).

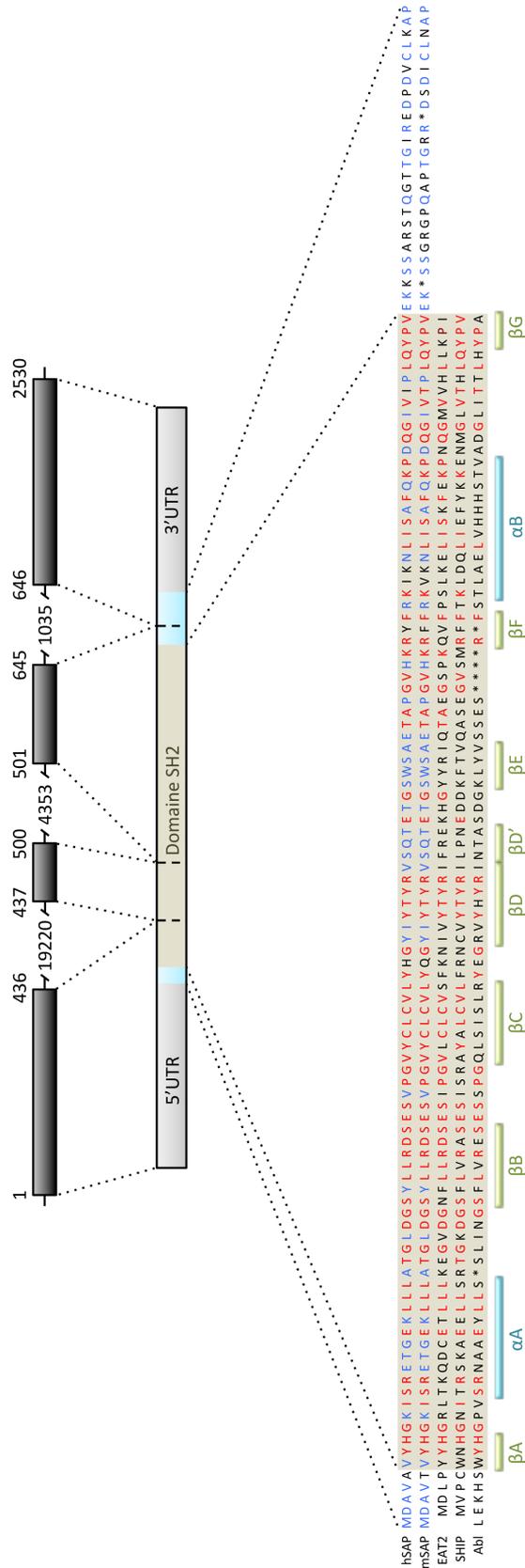


Figure 25 | **Organisation du gène *sh2d1a* et comparaison de séquences du domaine SH2 de SAP.** (A) Le gène *sh2d1a*, situé sur le chromosome X, est organisé en quatre exons s'étalant sur 25 kb. Les nombres aux extrémités de chaque exon représentent leur position correspondante dans l'ADNc. La taille entre chaque exon est également reportée (en pb). Les régions colorées en bleu de l'ADNc représentent les parties N-terminale et C-terminale de SAP. La partie rouge de l'ADNc représente la région codante pour le domaine SH2 de SAP. (B) Alignement des séquences des SAP humaines et murines avec les domaines SH2 de EAT2 humain (résidus 1 à 101), SHIP humain (résidus 122 à 217) et Abl humain (résidus 122 à 217). Les acides aminés partagés exclusivement entre la SAP humaine et murine sont en bleu et ceux partagés avec les autres domaines SH2 sont en rouge. Les barres vertes représentent les brins β et les barres bleues représentent les hélices α qui composent les domaines SH2. D'après Coffey et al., 1998 et Sayos et al., 1998.

i. Le gène sh2d1a

Chez l'Homme et la souris, les gènes sh2d1a sont organisés en quatre exons et trois introns s'étalant sur 25 kb et ayant 80% d'homologie de séquence en incluant les régions non transcrites (Coffey et al., 1998; Wu et al., 2000). Le domaine SH2 de SAP est codé par les trois premiers exons alors que le quatrième exon code pour la queue C-terminale de SAP ainsi que pour la région 3'UTR (Figure 25).

L'analyse du promoteur murin du gène sh2d1a montre de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription important dans le développement et la fonction des lymphocytes T. Cela inclut la présence de nombreux éléments de réponse aux récepteurs aux glucocorticoïdes (GRE), des sites de fixation pour Ets-1 et Ets-2 ainsi que pour IRF-1 (Okamoto et al., 2004; Wu et al., 2000). Okamoto *et al* ont démontré que le transcrit de SAP est finement régulé *in vitro* par la fixation des facteurs Ets-1/2 sur le promoteur, induisant la transcription de l'ARNm de SAP. En parallèle, ils ont également démontré que cet ARNm est dégradé très rapidement par des mécanismes post-transcriptionnels dus à la fixation sur des séquences ARE de protéines régulatrices (HuR et AUF1) dans la région 3'UTR. Basé sur ces expériences, Okamoto *et al* ont calculé que la demi-vie de l'ARNm de SAP est d'environ 1h.

ii. Expression de SAP

La protéine SAP est exprimée principalement dans les populations lymphocytaires, incluant les lymphocytes T, les cellules NK et NKT ainsi que dans les éosinophiles et les plaquettes (Coffey et al., 1998; Munitz et al., 2005; Nagy et al., 2000; Nanda et al., 2005; Nichols et al., 1998; Nichols et al., 2005a; Pasquier et al., 2005; Sayos et al., 1998). La présence de SAP dans les lymphocytes B reste toujours sujette à controverse. La majorité des études échoue à révéler SAP dans les lymphocytes B purifiés, quelque soit leur stade de maturation (Ma et al., 2006; Nagy et al., 2002b; Shinozaki et al., 2002). Cependant, Shlapatska *et al* ont recherché la présence de SAP dans un grand nombre de lignées de cellules B et ont détecté la protéine dans seulement deux lignées lymphoblastoïdes : les MP-1 (lignée B du centre germinatif précoce) et les CESS (cellule B mémoire) (Shlapatska et al., 2001). En accord avec ces résultats, Nagy *et al* ont confirmé la présence de SAP dans des lignées B positives pour l'EBV de lymphomes de

Burkitt ayant un phénotype de cellules B du centre germinatif (Nagy et al., 2002a). De manière générale, les types cellulaires qui expriment majoritairement SAP apparaissent pour être les lymphocytes T, les cellules NK et NKT, suggérant un rôle prédominant pour SAP dans les cellules du système immunitaire.

L'expression de SAP est modulée suivant l'activation des lymphocytes. Il a déjà été rapporté que l'expression de SAP augmente *in vitro* dans les lymphocytes T humains après stimulation avec des anticorps anti-CD3/CD28 ou des mitogènes tel que la PHA et *in vivo*, suite à l'infection par EBV (Nagy et al., 2000; Nichols et al., 1998; Shinozaki et al., 2002). De plus, il a été montré que l'expression de SAP augmente également dans les cellules NK humaines stimulées par l'IL-2 (Endt et al., 2007). A l'inverse, chez la souris, il a été observé que l'expression de SAP est fortement diminuée dans les lymphocytes T après stimulation par un anticorps anti-CD3 alors qu'elle est augmentée dans les cellules NK après stimulation par l'IL-2 ou après une infection virale (Davidson et al., 2004; Sayos et al., 2000; Wu et al., 2000). Les fonctions de SAP dans les lymphocytes T semblent donc être différentes en fonction du modèle cellulaire utilisé (Humain versus souris).

iii. Propriétés du domaine SH2 de SAP

Chez l'Homme, SAP est une petite protéine de 128 acides aminés (126 acides aminés chez la souris) possédant une masse moléculaire de 15 kDa. Les acides aminés 6 à 102 composent son domaine SH2 en partie N-terminale alors que les résidus 103 à 128 forment la queue C-terminale. Les séquences en acides aminés de la protéine SAP chez l'humain et la souris sont très similaires et partagent 87% d'identité, avec une forte similitude au niveau du domaine SH2 (Sayos et al., 1998). Le domaine SH2 de SAP a également une grande similitude avec les domaines SH2 de EAT-2 (50%), SHIP (45%) et Abl (35%) (Figure 25) (Coffey et al., 1998). Comme tout domaine SH2, des études cristallographiques ont montré que la poche de liaison au résidu tyrosine phosphorylé du domaine SH2 de SAP est composé d'un feuillet- β entouré de deux hélices- α (Poy et al., 1999).

Le domaine SH2 de SAP lui permet de s'associer, de manière conventionnelle, sur les tyrosines phosphorylées des motifs ITSM présents dans la partie intra-cytoplasmique des récepteurs SLAM, à l'exception de CRACC (Ma et al., 2007). Mais SAP possède un

domaine SH2 très particulier. En effet, des études de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire ont permis de démontrer que SAP s'associe à ses interacteurs de manière atypique. D'une manière générale, les domaines SH2 associent leurs interacteurs via un mécanisme à double « crochets », dans lesquels ils interagissent à la fois avec le résidu tyrosine phosphorylé et avec un résidu localisé en C-terminal de la tyrosine (généralement en +3) (Cohen et al., 1995). Cependant, dans le cas de SAP, l'interaction avec le motif ITSM de SLAM implique un troisième contact entre le domaine SH2 et le résidu situé en -2 de la tyrosine, créant ainsi une association à triple « crochets » (Figure 26) (Li et al., 1999b). L'existence de ce troisième lien augmente l'affinité du domaine SH2 de SAP pour son partenaire ($K_d \approx 120-150$ nM; en comparaison à un $K_d \approx 500$ nM pour un domaine SH2 conventionnel).

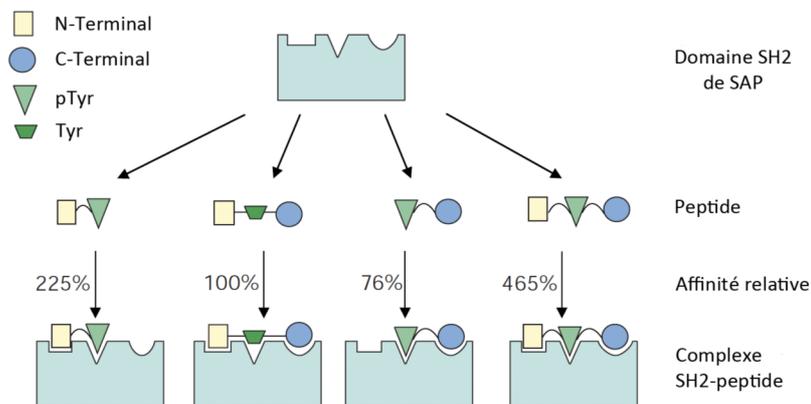


Figure 26 | **Illustration des associations du domaine SH2 avec les motifs ITSM.** Le domaine SH2 de SAP peut effectuer des associations de types deux ou trois « crochets » avec les motifs ITSM dont les affinités relatives dépendront du type d'association. D'après Li et al., 1999.

Ce troisième lien permet également au domaine SH2 de SAP de s'associer au premier motif ITSM de SLAM indépendamment de la phosphorylation du résidu tyrosine (avec un $K_d \approx 300$ nM), ce qui permet à SAP d'être constitutivement associée au récepteur SLAM (Li et al., 1999b; Poy et al., 1999; Sayos et al., 1998). Bien que les motifs ITSM soient retrouvés chez tous les membres de la famille SLAM, il semblerait que seul le motif ITSM proximal de la membrane plasmique de SLAM puisse associer SAP de façon constitutive.

De par sa forte affinité pour les motifs ITSM, SAP a été originellement décrite comme étant une molécule servant à bloquer le recrutement de protéines à domaine SH2 par compétition, telles que les tyrosine phosphatases Shp-1 et Shp-2, sur les récepteurs de la famille SLAM, suggérant un rôle inhibiteur pour la protéine SAP (Bottino et al., 2001; Parolini et al., 2000; Sayos et al., 2001; Sayos et al., 1998; Tangye et al., 1999). Mais la fonction de SAP ne s'arrête pas à ce rôle d'inhibiteur. Il a été montré par la suite que la protéine SAP possède un rôle plus important en tant que protéine adaptatrice. En effet, il a tout d'abord été observé que la phosphorylation du récepteur SLAM est fortement augmentée lorsque SAP est co-exprimée avec la tyrosine kinase FynT (l'isoforme de la tyrosine kinase Fyn exprimée dans les lymphocytes T) (Latour et al., 2001). Des expériences complémentaires effectuées dans des lymphocytes T de souris ont permis de démontrer que SAP recrute directement Fyn sur le récepteur SLAM. Un complexe trimoléculaire est alors formé permettant l'activation de Fyn qui va ensuite phosphoryler les résidus tyrosines du récepteur SLAM, aboutissant à l'activation de la signalisation en aval du récepteur SLAM via le recrutement des protéines SHIP, Dok1 et Dok2 (Chan et al., 2003; Latour et al., 2003). Ces travaux ont établi une association directe non conventionnelle entre le domaine SH2 de SAP et le domaine SH3 de Fyn. En effet, il n'y a pas de région riche en proline classique (PxxP) sur SAP pouvant associer un domaine SH3. Des études de cristallographie ont permis de démontrer que l'association de SAP avec Fyn s'effectue par des interactions électrostatiques entre la surface externe du domaine SH2 de SAP composé de résidus chargés positivement et le domaine SH3 de Fyn composé de résidus chargés négativement (Figure 27A et B). Sur le domaine SH2 de SAP, le résidu arginine R78 apparaît pour être nécessaire à l'association en faisant des liaisons hydrogènes avec les résidus aspartate D100 et tryptophane W119 de Fyn (Chan et al., 2003). De plus, la mutation de l'arginine R78 abolit non seulement le recrutement de Fyn sur SLAM mais également la phosphorylation du récepteur sans affecter le recrutement de SAP sur SLAM (Latour et al., 2003). L'association entre SAP et Fyn implique donc une région différente sur le domaine SH2 de SAP et autorise toujours la liaison avec les tyrosines des motifs ITSM des récepteurs SLAM. SAP peut donc associer simultanément le récepteur SLAM et la kinase Fyn, ce qui confère à SAP les propriétés d'une protéine adaptatrice. De plus, le domaine SH2 de SAP associe la région impliquée dans le repliement auto-inhibiteur de Fyn. Ainsi, l'association de SAP avec Fyn induit un

changement conformationnel de la protéine, levant son état d'auto-inhibition et aboutissant à l'activation de la kinase (Figure 27C).

Le groupe de Veillette a également montré que l'association entre SAP et Fyn est très spécifique car ils n'ont pu observer l'association de SAP avec les domaines SH3 des autres tyrosine kinases de la famille Src (Latour et al., 2003).

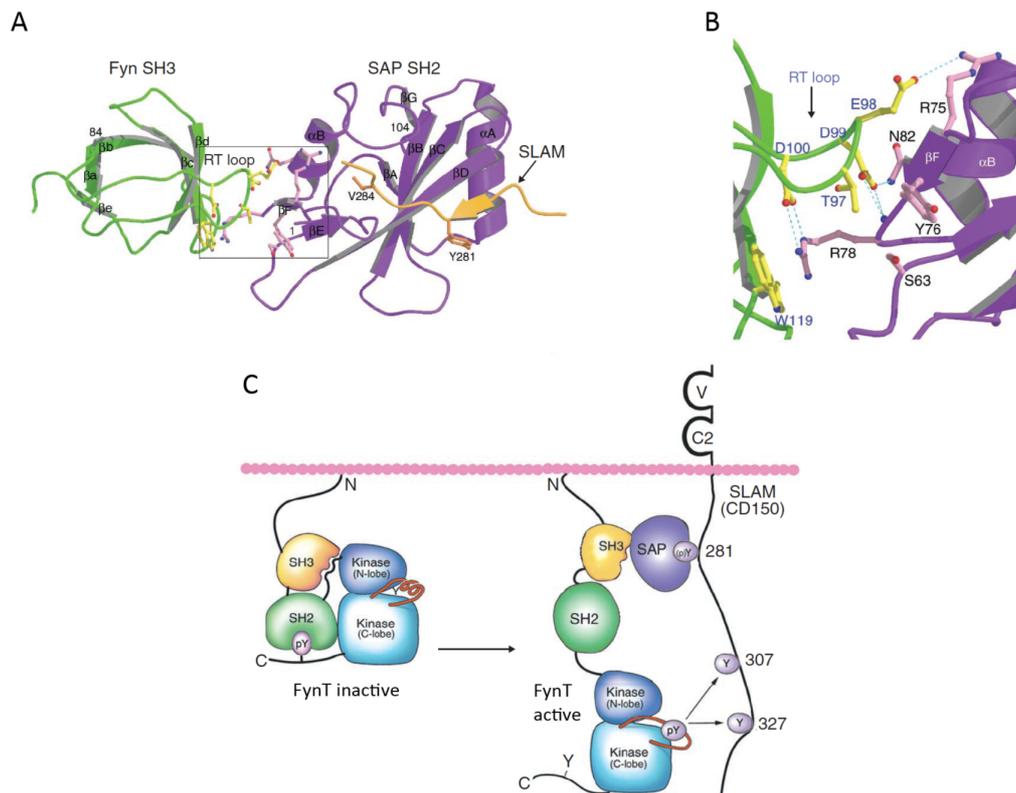


Figure 27 | **Modèle de recrutement et d'activation de la tyrosine kinase Fyn sur le récepteur SLAM.** (A) Structure du complexe SLAM/SAP/Fyn. Le domaine SH2 de SAP est représenté en violet, le domaine SH3 de Fyn en vert et le peptide SLAM en orange. (B) Agrandissement de la région d'interaction entre le domaine SH2 de SAP et le domaine SH3 de Fyn. Les résidus impliqués dans l'interaction sont colorés en jaune et rose respectivement sur Fyn et SAP. Les pointillés bleus indiquent les interactions hydrogène et ioniques. L'arginine R78 de SAP est critique pour l'interaction en établissant des liaisons hydrogène avec les résidus aspartate D100 et tryptophane W119. (C) Le recrutement de Fyn sur SAP induit un changement conformationnel de la kinase, rendant accessible le domaine catalytique et active la protéine. Chan et al., 2003.

Plus récemment, différents groupes ont montré l'association de SAP, par son résidu Arginine R78, avec d'autres partenaires, tels que β -PIX (un facteur d'échange pour les GTPase Rac/Cdc42), NCK1, ainsi que la serine/thréonine kinase PKC- θ (Cannons et al., 2010b; Gu et al., 2006; Li et al., 2009). Il a également été montré que SAP associe la

tyrosine kinase Lck mais cette association est médiée par le domaine catalytique de Lck et non par le domaine SH3 (Simarro et al., 2004).

Ainsi, SAP peut recruter différentes protéines sur les récepteurs SLAM et initier différentes signalisations en aval de ces récepteurs en fonction du partenaire associé.

c. Les protéines EAT-2 et ERT

Les gènes sh2d1b et sh2d1c sont situés sur le chromosome 1 près du locus des gènes codant pour les récepteurs de la famille SLAM et codent respectivement pour EAT-2 et ERT (Figure 23). Les structures exon-intron de ces gènes sont identiques, suggérant que ces gènes dérivent d'un ancêtre commun.

i. La protéine EAT-2

EAT-2 a tout d'abord été mise en évidence par son transcrite anormalement surexprimé dans des fibroblastes transformés par EWS-FLI1, un oncogène impliqué dans le Sarcome d'Ewing (Thompson et al., 1996).

L'ADNc de EAT-2 humain est composé de 399 nucléotides et possède 83% d'identité de séquence avec l'ADNc murin. De façon similaire au gène sh2d1a, le gène sh2d1b est organisé en quatre exons et trois introns s'étendant sur environ 14 kb du chromosome 1. Les exons 1, 2 et la majorité de l'exon 3 code pour le domaine SH2 de EAT-2 alors que la fin de l'exon 3 et l'exon 4 code pour la queue C-terminale de la protéine. L'analyse de l'ARNm du gène sh2d1b montre que trois séquences ARE sont retrouvées dans sa région 3'UTR, suggérant une régulation fine du transcrite du gène sh2d1b (Morra et al., 2001b).

Chez la souris, le transcrite d'EAT-2 a été détecté dans les cellules NK, les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques, alors que chez l'Homme, le transcrite a été retrouvé dans les lymphocytes B et les lymphocytes T activés. La protéine a également été observée dans les cellules NK et les lymphocytes T CD8+ humains mais n'a pas été détectée dans les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes B ou les cellules dendritiques (Calpe et al., 2006; Clarkson et al., 2007; Morra et al., 2001b; Roncagalli et al., 2005; Tangye et al., 2003; Tassi and Colonna, 2005; Thompson et al., 1996).

Le gène sh2d1b code pour une protéine de 132 acides aminés composée essentiellement d'un domaine SH2 suivi par une courte queue C-terminale. Cette queue cytoplasmique

diffère de celle de SAP par la présence d'un résidu tyrosine (deux chez la souris) et qui doit être phosphorylé pour que EAT-2 acquiert ces fonctions inhibitrices (Roncagalli et al., 2005). Le domaine SH2 de EAT-2 partage 50% d'identité de séquence avec celui de la protéine SAP et permet donc de recruter EAT-2 sur les motifs ITSM des récepteurs de la famille SLAM (Morra et al., 2001b; Tangye et al., 2003; Tassi and Colonna, 2005). Cependant, bien que SAP puisse associer l'ITSM proximal de SLAM sans que la tyrosine de celui-ci ne soit phosphorylée, l'association de EAT-2 sur les motifs ITSM des récepteurs SLAM est strictement dépendante de la phosphorylation du résidu tyrosine (Morra et al., 2001b). Les récepteurs SLAM possèdent plusieurs motifs ITSM dans leur partie intra-cytoplasmique, ce qui va leur permettre d'associer simultanément SAP et EAT-2. Il a été montré dans les cellules NK humaines activées que le recrutement d'EAT-2 est augmenté sur CRACC et qu'il est diminué sur 2B4 alors que celui de SAP est augmenté (Tassi and Colonna, 2005). Un shift de signalisation a donc lieu lorsque 2B4 est activé passant d'une signalisation inhibitrice lorsque EAT-2 est associée à une signalisation activatrice de la cytotoxicité lorsque SAP est associée.

Au contraire de SAP, EAT-2 ne possède pas le résidu arginine R78 responsable de l'association du domaine SH3 de Fyn sur SAP. Pourtant, il a déjà été observé une association entre EAT-2 et Fyn (Calpe et al., 2006; Clarkson et al., 2007). Des expériences de Biacore ont prouvé que le domaine SH2 de Fyn associe un résidu tyrosine phosphorylé sur EAT-2 (Clarkson et al., 2007). Le groupe de Lanyi a caractérisé l'association de EAT-2 avec les membres de la famille de tyrosine kinase Src par double hybride dans la levure. Ils ont observé que EAT-2 associe les tyrosine kinases Hck, Fyn, Lyn, Lck et Fgr et que l'interaction entre EAT-2 et les différents membres de la famille Src est dépendante uniquement du domaine catalytique de la kinase (Calpe et al., 2006).

ii. La protéine ERT

ERT (pour EAT-2-Related Transducer) est le troisième et dernier membre de la famille SAP à avoir été caractérisé. La protéine ERT est codée par le gène sh2d1c situé sur le chromosome 1 près du gène sh2d1b et possède la même organisation génomique que ce dernier, suggérant également que ces deux gènes proviennent de la récente duplication d'un gène commun. L'étude des exons du gène sh2d1c renforce cette idée. En effet, les exons un et quatre sont identiques à 100% entre les gènes sh2d1b et sh2d1c. Le

deuxième exon partage 96% d'identité alors que le troisième exon n'est identique qu'à 81% entre les deux gènes. Cette forte identité de séquence se retrouve au niveau des protéines où EAT-2 et ERT (qui possède également 132 acides aminés) sont identiques à 82%, alors que ERT ne partage que 40% d'acides aminés identiques avec SAP (Calpe et al., 2006). Au contraire de EAT-2, ERT est exprimée exclusivement dans les cellules NK murines (Roncagalli et al., 2005).

Les mécanismes moléculaires induisant les effets inhibiteurs de ERT doivent être similaires à ceux de EAT-2. D'une part, ces deux protéines possèdent une séquence en acides aminés très proches ; le domaine SH2 de ERT associe également les motifs ITSM des récepteurs de la famille SLAM ; et enfin, ERT possède les mêmes deux tyrosines dans sa partie C-terminale que EAT-2. De plus, de manière similaire à EAT-2, ERT peut associer les domaines catalytiques des tyrosine kinases de la famille Src (Calpe et al., 2006).

Bien que les protéines SAP, EAT-2 et ERT appartiennent à la même famille de protéine adaptatrice à simple domaine SH2, il semblerait que ces protéines aient évolué pour avoir différents rôles dans l'activation des lymphocytes.

4. Fonctions biologiques régulées par les récepteurs de la famille SLAM

a. Signalisation médiée par SLAM (CD150)

Le récepteur SLAM, appelé initialement IPO-3, a été découvert en 1993 comme marqueur surexprimé dans les lymphocytes T activés. SLAM possède une expression restreinte aux lignées hématopoïétiques et plus particulièrement dans les lymphocytes T et B, les macrophages, les plaquettes et les DC matures, où son expression augmente après activation *in vitro* (Ma et al., 2007; Sidorenko and Clark, 1993). L'engagement du récepteur SLAM, par interaction homotypique, induit le recrutement de SAP et sa phosphorylation par Fyn permettant le recrutement de l'inositol phosphatase SHIP via son domaine SH2. SHIP est à son tour phosphorylée et recrute les protéines adaptatrices Dok1 et Dok2 ainsi que Shc et Ras-GAP formant un complexe protéique aboutissant à une diminution de la production d'IFN- γ induit par l'activation du TCR dans une lignées de cellules issues d'un thymome murin (Figure 28) (Latour et al., 2001). Il a également été démontré que SAP interagit constitutivement avec la PKC- θ et que le recrutement de

SAP sur SLAM régule positivement l'activation de la PKC- θ et de la cascade de signalisation menant à l'activation de NF- κ B et à la production d'IL-4 (Cannons et al., 2010b; Cannons et al., 2004). L'activation de la signalisation médiée par le couple SLAM-SAP favorise donc l'apparition d'un phénotype Th2 et la commutation de classe dans les lymphocytes B vers l'isotype IgE (Czar et al., 2001; Wu et al., 2001). Des études complémentaires utilisant des souris déficientes pour le récepteur SLAM ont montré un défaut dans la production d'IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺ purifiés, confirmant le rôle central du couple SLAM-SAP dans la sécrétion d'IL-4. Cependant, ce défaut est moins prononcé dans les souris déficientes pour SLAM que dans les souris déficientes pour SAP, suggérant que d'autres mécanismes régulés par SAP entre en jeu pour la production d'IL-4 dans les lymphocytes T CD4⁺.

La co-activation du TCR et du récepteur SLAM augmente l'activité cytotoxique, la production d'IFN- γ et la libération de granules cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺ humains. Cependant, l'implication de SLAM dans la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ reste encore controversée car les souris déficientes en SLAM génèrent une population normale de lymphocytes T cytotoxiques fonctionnels (Henning et al., 2001; McCausland et al., 2007).

Dans les macrophages, l'engagement de SLAM après activation par le LPS provoque la sécrétion d'IL-12 et de TNF- α ainsi que la production de radicaux libres de l'oxygène, comme l'oxyde nitrique (NO). L'activation de SLAM inhibe également la production d'IL-6 par les macrophages. SLAM agit donc dans les macrophages comme un co-récepteur qui régule les signaux induits par le TLR-4 mais ne possède pas de rôle dans la phagocytose. Les macrophages n'expriment pas SAP mais EAT-2, suggérant une activation du récepteur SLAM indépendamment de SAP (Wang et al., 2004). Le rôle de SLAM dans l'activation des DC n'est toujours pas compris à ce jour. Une étude a montré que l'activation de SLAM sur les DC activés par le LPS entraîne la production d'IL-12 et de CXCL8 (Bleharski et al., 2001). Une étude similaire plus récente montre que la production d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- α est grandement inhibée par SLAM dans des DC activés par le LPS. Cependant, les DC activés par le LPS expriment normalement les marqueurs d'activation CD80 et CD86 à leur surface, suggérant un rôle négatif de SLAM dans la production de cytokines par les DC (Rethi et al., 2006).

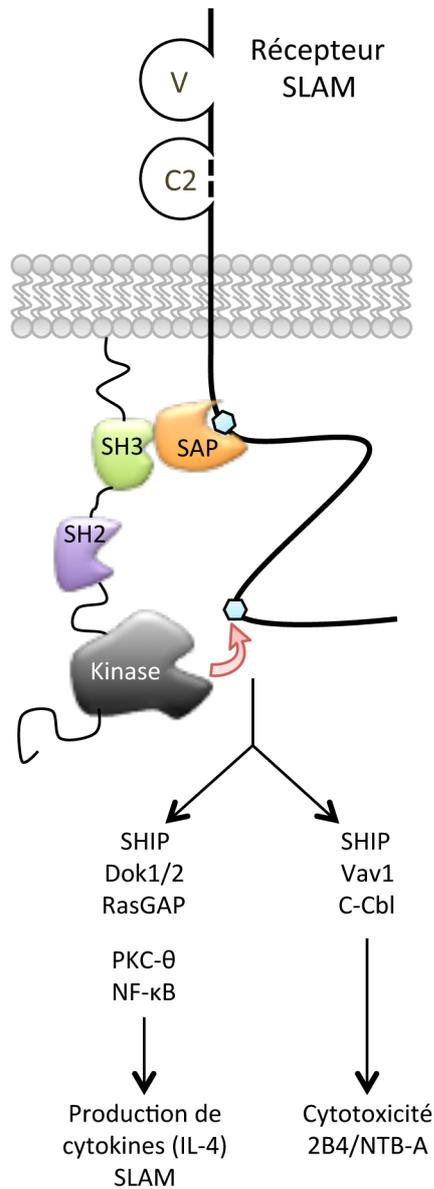


Figure 28 | **Voies de signalisation médiées par les récepteurs de la famille SLAM et dépendantes de SAP.** SAP recrute, via son arginine R78, la tyrosine kinase Fyn sur le récepteur, ce qui permet la phosphorylation des tyrosines distales de la membrane et le recrutement de protéines de signalisation, telles que SHIP, Dok1/2, RasGAP, Vav1 et c-Cbl, aboutissant à l'activation des fonctions effectrices des cellules. D'après Cannons, et al., 2011.

Le complexe SLAM/SAP/Fyn/PKC- θ , impliqué dans la production de cytokines des lymphocytes T CD4⁺, a également été montré comme essentiel au développement des cellules NKT. En effet, les souris déficientes pour SAP ou pour Fyn ne développent pas de cellules NKT alors que les absences de PKC- θ ou de Bcl10 diminuent fortement le nombre de cellules NKT (Borowski and Bendelac, 2005; Gadue et al., 1999; Pasquier et al., 2005). L'implication de SAP et de Fyn dans le développement des cellules NKT suggère un rôle des récepteurs de la famille SLAM dans ce processus. Les souris déficientes soit pour SLAM soit pour NTB-A ont un nombre normal ou légèrement diminué de cellules NKT, suggérant une redondance dans les fonctions des différents récepteurs SLAM. L'extinction de ces deux récepteurs est nécessaire pour inhiber à plus de 90% le développement des cellules NKT (Griewank et al., 2007).

b. Signalisation médiée par 2B4

2B4 est exprimé principalement par les cellules NK, les monocytes, les basophiles et environ 50% des lymphocytes T CD8⁺. Le ligand naturel de 2B4 est CD48 et l'engagement de 2B4 par CD48 induit la cytotoxicité et la production de cytokines par les cellules NK humaines et murines (Ma et al., 2007).

2B4 possède quatre motifs ITSM dont les tyrosines sont phosphorylées après engagement du récepteur (Figure 24). SAP peut associer les quatre motifs ITSM même si son association avec l'ITSM proximal de la membrane est suffisante pour induire l'activation des cellules NK. SAP recrute Fyn sur 2B4, ce qui résulte en une augmentation de la phosphorylation de 2B4 et le recrutement et la phosphorylation des protéines de signalisation Vav1, SHIP et Cbl-c (Figure 28) (Chen et al., 2004). Des études complémentaires ont montré que 2B4 associe constitutivement la protéine adaptatrice LAT et que cette association est nécessaire à la fonction cytotoxique des cellules activées par 2B4. En effet, Bottino et ses collègues ont montré que, suite à l'engagement de 2B4, LAT est phosphorylée et recrute la PLC- γ et la protéine adaptatrice Grb2 aboutissant à l'activation des voies MAPKinases. L'étude des souris *lat*^{-/-} montre une activité cytotoxique normale des cellules NK contre la ligne cellulaire YAC-1 (sensible aux cellules NK), cependant la cytotoxicité induite par l'engagement de 2B4 est inhibée dans ces cellules. Ainsi, à la fois les cellules NK issues de souris *sap*^{-/-} et *lat*^{-/-} présentent des

défauts d'activation de la cytotoxicité médiée par 2B4, suggérant que ces deux protéines sont impliquées dans la signalisation en aval de l'activation de 2B4 (Bottino et al., 2000; Klem et al., 2002).

Dans les cellules NK, 2B4 a tout d'abord été montré comme co-activateur de la cytotoxicité médiée par les récepteurs cytotoxiques naturels, comme NKp46, NKp44 et NKp30, ainsi que lors de l'activation de CD16. En effet, une étude récente a montré que 2B4 synergise avec CD16, NKp46, NKG2D et DNAM-1 pour augmenter le flux de Ca^{2+} intracellulaire. De plus, la co-activation de 2B4 avec NKG2D, DNAM-1 ou CD2 augmente la production de $TNF-\alpha$ et d' $IFN-\gamma$ dans les cellules NK (Bryceson et al., 2006; Sivori et al., 2000).

Il a également été rapporté que l'engagement de 2B4 permet d'augmenter la prolifération et la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T $CD8^+$. Dupre et ses collègues ont montré que l'interaction entre un lymphocyte T $CD8^+$ et une cellule présentant CD48 induit la relocalisation de 2B4 dans les radeaux lipidiques et la polarisation des granules cytotoxiques au niveau du site de contact. Ce mécanisme, dépendant de la signalisation médiée par 2B4, permet la lyse de la cellule cible et est inhibé dans les cellules déficientes pour SAP (Dupre et al., 2005; Kambayashi et al., 2001).

c. Signalisation médiée par NTB-A

NTB-A (pour NK-T-B cell Antigen) a été initialement décrit dans la souris et appelé Ly108 puis a ensuite été cloné chez l'Homme. NTB-A est exprimé dans les cellules NK, les lymphocytes T et B ainsi que dans les éosinophiles. NTB-A possède dans sa partie intracytoplasmique deux motifs ITSM qui sont phosphorylés et qui permettent le recrutement de SAP après engagement du récepteur par interaction homophile ou par anticorps (Bottino et al., 2001; Ma et al., 2007).

NTB-A semble avoir un rôle similaire que 2B4 dans l'activation des cellules NK. En effet, l'activation de NTB-A résulte en une augmentation de la cytotoxicité et de la production de cytokines dans les cellules NK (Falco et al., 2004). Une étude récente a montré le rôle distinct de SAP et de EAT-2 dans les fonctions biologiques régulées par NTB-A dans les cellules NK. Eissman et Watzl ont montré que suite à l'engagement de NTB-A, SAP et EAT-2 sont recrutées sur la même molécule NTB-A. SAP associe préférentiellement le

motif ITSM proximal de la membrane alors que EAT-2 associe les deux autres tyrosines présentes dans la queue cytoplasmique de NTB-A. De plus, ils ont démontré que l'activité cytotoxique des cellules NK dépendante de l'activation de NTB-A est toujours fonctionnelle dans des cellules déficientes pour SAP. Cependant, ces cellules montrent une forte diminution de production d'IFN- γ après activation du récepteur. En utilisant des formes mutées de NTB-A sur les différentes tyrosines, les auteurs de l'étude ont observé une inhibition de la cytotoxicité des cellules NK lorsque le récepteur n'associe plus EAT-2. Les auteurs ont donc conclu que l'activation de NTB-A dans les cellules NK permet la production d'IFN- γ par un mécanisme contrôlé par SAP et la lyse des cellules cibles par un mécanisme régulé par EAT-2 (Eissmann and Watzl, 2006).

Dans les lymphocytes T CD4⁺, NTB-A agit comme un co-activateur en augmentant la prolifération, la production d'IFN- γ et l'expression du marqueur d'activation CD69 après une co-activation CD3+NTB-A. De plus, il semblerait que NTB-A favorise la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers un phénotype Th1. En effet, l'activation de NTB-A augmente la production d'IFN- γ que dans les cellules Th1 et l'utilisation *in vivo* d'une protéine recombinante composée du domaine extracellulaire de NTB-A associé à un domaine Fc bloque la commutation de classe vers des isotypes IgG_{2a} et IgG3 qui sont normalement induits par les cellules Th1 (Valdez et al., 2004).

Enfin, il a également été rapporté dans la littérature un rôle pour le couple NTB-A/SAP dans l'activation de la mort induite par restimulation par l'antigène (AICD pour Activation-Induced Cell Death). En effet, Snow et ses collègues ont observé une diminution de l'AICD, associée à une diminution de l'expression de Bim, dans les cellules T activées déficientes pour SAP ou pour NTB-A. Les investigateurs ont alors suggéré que SAP influence l'AICD en régulant les signaux induits par le TCR nécessaires à l'expression de protéines clés dans l'apoptose, telles que Bim ou FasL (Snow et al., 2009).

d. Signalisation médiée par les autres récepteurs SLAM

Le rôle de CD84, Ly9 ou CRACC dans l'homéostasie des cellules immunes a été moins étudié. Après engagement des récepteurs, CD84 et Ly9 associent SAP alors que la fonction de CRACC ne semble pas dépendante de SAP mais de son association avec EAT-2 (Ma et al., 2007).

CD84 est exprimé par les cellules myéloïdes ainsi que par les lymphocytes T et B. CD84 agit comme un co-récepteur dans les lymphocytes T en augmentant la prolifération et la production d'IFN- γ après activation CD3 (Tangye et al., 2003). Une étude récente a également montré que CD84 permet de prolonger le contact entre les lymphocytes T et B par interaction homotypique. Ce mécanisme, dépendant de SAP, requiert la coopération de NTB-A et est nécessaire à la formation du centre germinatif et à l'induction d'une réponse humorale adéquate (Cannons et al., 2010a).

Le récepteur Ly9 est exprimé uniquement dans les lymphocytes T et B ainsi que légèrement dans les cellules NK. L'activation de Ly9 induit sa phosphorylation et le recrutement des protéines SAP, qui est nécessaire à sa complète phosphorylation, et EAT-2 (Simarro et al., 2004). Une étude a également rapporté l'association de Grb2 avec la tyrosine Y606 de Ly9, ce qui autorise toujours le recrutement de SAP, après co-activation CD3+Ly9 dans les lymphocytes T (Martin et al., 2005). Enfin, la sous-unité μ 2 du complexe AP-2 associe la tyrosine Y470 de Ly9, sans interférer également avec le recrutement de SAP (Del Valle et al., 2003). Ces deux études ont montré que les recrutements de la sous-unité μ 2 et de Grb2 sur Ly9 provoquent son endocytose suite à l'engagement du récepteur, et que ce mécanisme, unique à Ly9, n'est pas observé chez les autres récepteurs de la famille SLAM. Le recrutement de Grb2 induit également une légère diminution de l'activation de Erk1/2 ainsi que de la production d'IFN- γ dans les lymphocytes T activés par CD3, suggérant un rôle négatif pour Ly9 dans l'activation T. L'utilisation de souris déficientes pour Ly9 a permis d'étudier son rôle *in vivo*. Les lymphocytes T CD4⁺ des souris Ly9^{-/-} ont une production quasi normale d'IL-4 et d'IFN- γ mais présentent une légère diminution dans la production d'IL-2 et dans la prolifération des cellules après activation CD3+CD28. Cependant, ces souris montent une réponse humorale adéquate pour combattre une infection par LCMV. Ainsi, le rôle de Ly9 dans l'homéostasie du système immunitaire n'est pas encore bien compris et nécessite d'être approfondi dans le futur (Graham et al., 2006).

Le récepteur CRACC est exprimé par les cellules NK, les lymphocytes T et B activés ainsi que dans les DC activés et les macrophages (Cruz-Munoz et al., 2009). Bien que ce récepteur possède deux motifs ITSM dans sa partie intracytoplasmique, CRACC n'associe pas SAP mais son activation permet le recrutement de EAT-2 qui induit sa

phosphorylation complète. Dans les cellules NK, l'engagement de CRACC augmente la lyse des cellules cibles par un mécanisme impliquant EAT-2, les PLC- γ 1/2 et Erk1/2 (Cruz-Munoz et al., 2009; Tassi and Colonna, 2005). CRACC est induit dans les lymphocytes T activés par CD3+CD28 pendant au moins 24h. Cependant, l'activation de CRACC inhibe les lymphocytes T en diminuant leur prolifération ainsi que la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ (Cruz-Munoz et al., 2009). Enfin, dans les lymphocytes B activés par CD40 et l'IL-4, l'engagement de CRACC augmente la prolifération et la sécrétion de cytokines, comme le flt3-L, le TNF- α ou l'IL-14 (Lee et al., 2007).

L'association de la protéine SAP avec les différents membres de la famille SLAM régule de nombreuses fonctions dans l'activation des réponses innées et humorales (Figure 29). De nombreuses études ont montré que plusieurs récepteurs SLAM sont exprimés à la surface des cellules immunes permettant une redondance dans leur fonction. Cependant la perte de l'expression de la protéine SAP annihile complètement l'activation médiée par les récepteurs SLAM, comme en témoignent les expériences effectuées sur des souris *sap*^{-/-}. A la fin des années 90, trois groupes différents identifièrent le gène *sh2d1a* comme étant responsable du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP), une grave maladie génétique caractérisée par une réponse immune inappropriée face à l'infection par l'EBV.

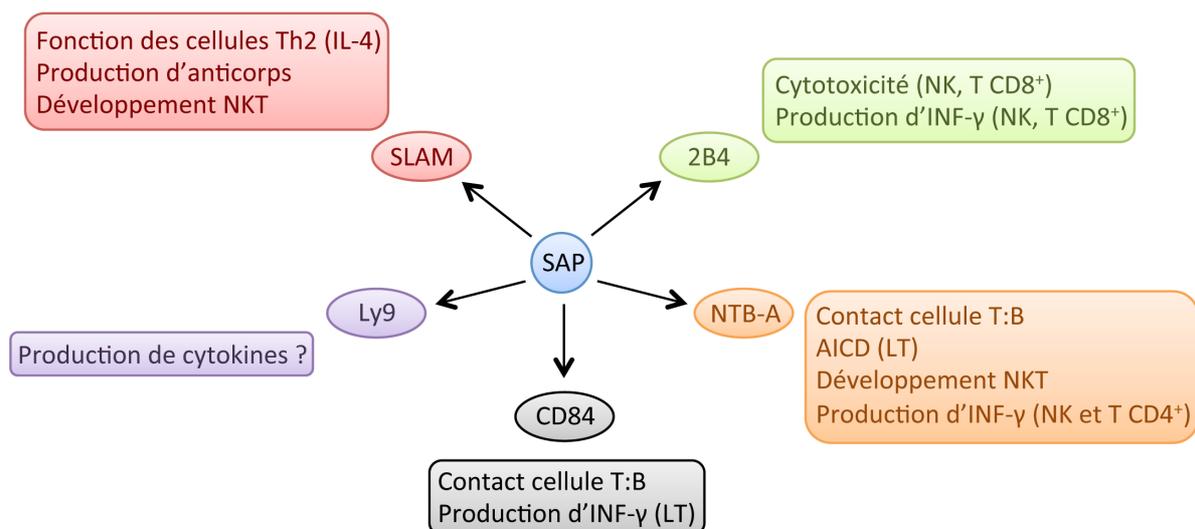


Figure 29 | **Fonctions immunitaires régulées par les associations SAP/SLAM-R.** Schéma récapitulatif des fonctions biologiques régulées par l'association de SAP avec les différents récepteurs de la famille SLAM. D'après Veillette, 2006.

IV. Le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP)

1. Généralités

Le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (appelé aussi le syndrome de Purtillo ou maladie de Duncan) est une maladie génétique récessive rare affectant 1 à 3 garçons pour 1 million (Morra et al., 2001a). Il fut caractérisé pour la première fois en 1975, lorsque Purtillo *et al* (Purtilo et al., 1975) rapportèrent les cas de 6 enfants mâles d'une même famille décédés de mononucléose infectieuse fulminante. Ces enfants ont développé une maladie lymphoproliférative, accompagnée d'une hépatosplénomégalie et de taux variables d'immunoglobulines dans le sérum. Trois de ces enfants développèrent la maladie suite à une infection par l'Epstein-Barr Virus sans développer d'anticorps dirigés contre le virus, suggérant que les patients XLP montent une réponse immunitaire dérégulée face à cette infection. Purtillo émis l'hypothèse que ces phénotypes proviendraient d'un défaut de fonctions des lymphocytes T helper de type 2 dirigés contre l'EBV et pouvant également aboutir aux dysgammaglobulinémies observées dans la maladie. En conséquence, les réponses de types Th1 pourraient être prolongées de façon excessive, expliquant ainsi l'activation et l'accumulation des lymphocytes T CD8⁺, des cellules NK et des macrophages (Purtilo et al., 1975).

Plus tard, trois groupes indépendants ont découvert que les mutations sur le gène *sh2d1a* aboutissent à une protéine SAP non fonctionnelle et sont la cause du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (Coffey et al., 1998; Nichols et al., 1998; Sayos et al., 1998).

Les patients atteints de ce syndrome vont présenter trois manifestations cliniques majeures : une mononucléose infectieuse fulminante (FIM), des désordres lymphoprolifératifs (principalement des lymphomes B) et des dysgammaglobulinémies (incluant des hypoglobulinémies et des hypergammaglobulinémies caractérisées par des taux élevés d'IgM) (Seemayer et al., 1995).

2. Manifestations cliniques des patients XLP

a. La mononucléose infectieuse fulminante

La mononucléose infectieuse fulminante (FIM) est la principale manifestation clinique chez les patients XLP. La FIM se déclare seulement lors de l'infection par l'EBV et touche environ 60% des patients. La moyenne d'âge d'apparition des symptômes se situe autour des 3 ans et la durée de vie des patients après infection par l'EBV est seulement de 1 à 2 mois (Seemayer et al., 1993). Les symptômes sont ceux des mononucléoses infectieuses tels que : fièvre, fatigue, malaise, maux de gorge, lymphadénopathie, hépatosplénomégalie, lymphocytoses atypiques, et des taux variables d'immunoglobulines sanguines, allant de l'agammaglobulinémie à l'hyperglobulinémie (Purtilo et al., 1982). Les examens histologiques des coupes d'organes affectés montrent des infiltrats polyclonaux de lymphocytes B infectés par l'EBV, des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ réactifs ainsi que des macrophages activés témoignant d'une hémophagocytose. Les patients XLP qui développent une FIM vont présenter pour 89% d'entre eux des dysfonctions hépatiques, pour 81% des troubles anémiques et pour 93% des thrombocytopénies. Les dysfonctions hépatiques et les hémorragies touchant le système nerveux central, le tractus gastro-intestinal ou les poumons sont les causes les plus fréquentes de décès chez ces patients, où le taux de survie n'est seulement que de 4% (Nichols et al., 2005b; Schuster and Kreth, 2000).

b. Les syndromes lymphoprolifératifs

Les désordres lymphoprolifératifs, incluant les lymphomes malins, se développent dans environ 30% des cas XLP, souvent en combinaison avec des dysgammaglobulinémies et des FIM. L'âge moyen du diagnostic des lymphomes est d'environ 5 ans chez les patients EBV⁺ ou de 8 ans chez les patients EBV⁻. La majorité des lymphomes se déclarent en dehors des ganglions lymphatiques et pour 75% des cas dans la région iléo-caecal. D'autres sites communs d'apparition de ces tumeurs sont le système nerveux central, le foie et les reins (Nichols et al., 2005b). Environ 90% des lymphomes malins sont d'origine des cellules B, avec 53% de lymphomes de Burkitt, 18% de lymphomes immunoblastiques, 12% de lymphomes à grandes cellules, 12% de lymphomes à petites

cellules et 5% de lymphomes inclassables (Egeler et al., 1992; Harrington et al., 1987). Très rarement, les malades XLP développent la maladie de Hodgkin ou des lymphomes de cellules T. Il a été estimé que le risque de développer un lymphome est 200 fois plus élevé chez les patients XLP que dans la population normale (Nichols et al., 2005b).

Bien que moins répandu que les lymphomes, les patients XLP développent des désordres lymphoprolifératifs non malins plus fréquemment que la moyenne. Cela inclut des granulomatoses lymphoïdes, des granulomatoses de Wegener et des vascularites nécrosantes (Dutz et al., 2001; Seemayer et al., 1995). Les analyses histologiques ont montré des degrés variables d'infiltration dans les parois des vaisseaux sanguins et dans les tissus perivasculaires. Environ 35% des patients XLP qui développent des lymphomes malins survivent sur une longue période pouvant aller jusqu'à 39 ans (avec une moyenne de 19 ans) pour les patients EBV⁻ (Seemayer et al., 1995).

c. Les désordres immunoglobulinémiques

Les dysgammaglobulinémies touchent 30% des patients XLP et se développent en une hypoglobulinémie progressive soit avant ou après infection par l'EBV. L'âge moyen d'apparition des symptômes est de 8 ans. Les patients présentent une réduction globale du taux d'immunoglobulines dans le sang avec dans la plupart des cas un nombre plus élevé d'IgM et/ou d'IgA et une absence des sous classes IgG1 et IgG3 (Nichols et al., 2005b). Les patients atteints d'hypoglobulinémie ont un pronostic plus favorable que ceux atteints de FIM ou de lymphomes surtout s'ils sont traités régulièrement avec des injections d'immunoglobulines pour protéger des infections.

3. Mutations du gène sh2d1a

L'analyse génétique de plus de 200 patients XLP a permis d'identifier 43 différentes mutations du gène sh2d1a. Toutes ces mutations sont répertoriées dans la base de données SH2D1Abase accessible librement sur internet (Lappalainen et al., 2000; Schuster and Kreth, 2000). La majorité des mutations sont des délétions d'exons ou du gène dans son entier ou des mutations sur les sites d'épissage intron/exon. Le reste des altérations sont soit des mutations *non-sens* provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré, soit des mutations *faux-sens* causant la substitution d'un acide aminé,

principalement au niveau du domaine SH2 de la protéine (Morra et al., 2001c; Sumegi et al., 2000). Les mutations *non-sens* et *faux-sens* affectent la structure tertiaire de la protéine, ne permettant plus son repliement adéquate et résultant en une instabilité de la protéine. Cette instabilité va induire une diminution de la demi-vie de la protéine, provoquant une absence ou une forte diminution de l'expression de la protéine. Certaines mutations ponctuelles n'affectent pas l'expression de SAP mais diminuent son affinité pour les récepteurs de la famille SLAM empêchant ainsi leur association. Enfin, les dernières mutations recensées permettent l'association de SAP sur les récepteurs de la famille SLAM mais empêchent le recrutement des protéines à domaine SH3 sur SAP. SAP ne joue donc plus son rôle de protéine adaptatrice et la signalisation médiée par les récepteurs de la famille SLAM se retrouve alors abrogée (Hare et al., 2006; Lewis et al., 2001; Li et al., 2003; Morra et al., 2001c).

La perte génétique de la fonction de SAP souligne donc le dysfonctionnement des cellules du système immunitaire chez les patients XLP. En revanche, une étude approfondie des familles XLP ne permet pas de trouver une corrélation entre le génotype *sh2d1a* et le type ou la sévérité des symptômes des patients XLP, suggérant que d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux, entre en jeu lors de l'apparition des premières manifestations cliniques (Lewis et al., 2001; Morra et al., 2001c).

4. Défauts cellulaires dans le XLP

Les études utilisant les cellules humaines et murines déficientes pour SAP ont permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires dérégulés chez les patients XLP.

a. Réponses humorales défectueuses en absence de SAP

L'induction d'une réponse immunitaire humorale implique la coopération entre les lymphocytes T CD4⁺ activés et les lymphocytes B. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T Th2 activés vont présenter à leur surface différents ligands (CD40-L, OX40, ICOS) et sécréter des cytokines (IL-4, IL-10, IL-21) qui vont permettre l'activation et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs

d'anticorps. Les études actuelles n'ont pas réussi à détecter la présence de SAP dans les lymphocytes B, les défauts de la réponse humorale proviendraient donc d'un défaut d'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T, ce qui a été confirmé récemment dans une étude publiée par Crotty et ses collègues. Ils montrèrent que des lymphocytes B de souris *sap*^{-/-} sont correctement activés par des lymphocytes T de souris WT et permettent de monter une réponse humorale efficace face à une infection par LCMV. Cela prouve également que l'activation des lymphocytes B ne requiert pas la présence de SAP. A l'inverse, des lymphocytes B de souris WT ne montent pas de réponse humorale en présence de lymphocytes T de souris *sap*^{-/-} (Crotty et al., 2003). Un autre groupe a également observé une diminution du taux d'immunoglobulines sanguines lorsque les souris *sap*^{-/-} sont infectées par le gammaherpesvirus 68, l'équivalent de l'EBV chez les rongeurs (Yin et al., 2003). Ces défauts dans la production d'anticorps n'apparaissent pas être limités aux infections virales. En effet, les souris *sap*^{-/-} présentent des taux d'IgG et d'IgE sanguins diminués lorsque les souris sont infectées par *Toxoplasma gondii* ou par *Listeria major*. Dans ces deux études, les auteurs ont prouvé que l'incapacité des souris à monter une réponse humorale adéquate est due à un défaut de production des cytokines de type Th2, telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, de la part des lymphocytes T CD4⁺ (Czar et al., 2001; Wu et al., 2001). Ainsi, en absence de SAP, les lymphocytes T CD4⁺ ne fournissent plus l'aide nécessaire à l'activation des lymphocytes B, conduisant à un taux faible d'immunoglobulines sanguines.

La formation des centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires est une étape critique dans la génération de plasmocytes sécréteurs d'anticorps et de cellules B mémoires (Shlomchik and Weisel, 2012). Les défauts d'activation des lymphocytes B chez les patients XLP et dans les souris *sap*^{-/-} suggèrent un défaut de formation de ces centres germinatifs. Deux études récentes d'imagerie *in vivo* ont permis de révéler les défauts de formation des centres germinatifs associés à l'absence de SAP (Cannons et al., 2010a; Qi et al., 2008). Ces études ont montré qu'après activation, les lymphocytes T CD4⁺ déficients pour SAP interagissent avec les DC présentateurs de l'antigène, prolifèrent, surexpriment les marqueurs d'activation et migrent vers la zone des lymphocytes B de la même manière que les cellules T CD4⁺ WT. Alors que les cellules T CD4⁺ WT forment un contact prolongé avec les cellules B pour les activer, les lymphocytes T CD4⁺ déficients pour SAP ne forment qu'un contact très succinct avec les lymphocytes B. Ce contact trop court empêche les lymphocytes T CD4⁺ déficients pour

SAP à délivrer les signaux responsables de la formation des centres germinatifs et de leur maintenance. Cannons et ses collègues ont ensuite montré que la prolongation du contact entre la cellule T et la cellule B est dépendante de l'interaction homotypique entre les récepteurs CD84 et NTB-A à la surface de ces cellules (Cannons et al., 2010a). Ces différentes études montrent le rôle crucial de SAP dans les mécanismes régulant l'aide fournie par les lymphocytes Th2 pour la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des anticorps. Chez les patients XLP, le nombre de lymphocytes B périphériques est normal (Lindsten et al., 1982), cependant leur différenciation en lymphocytes B CD27⁺ mémoires est très fortement diminuée. Le peu de lymphocytes B mémoires CD27⁺ retrouvés chez les patients XLP sécrètent des IgM, démontrant *in vivo* que la commutation de classe est inhibée (Ma et al., 2006). Ces études expliquent les dysgammaglobulinémies retrouvées chez les patients XLP. L'hypergammaglobulinémie provoquée par l'augmentation du taux d'IgM sanguin peut être expliquée par l'activation des lymphocytes B non dépendante de SAP qui vont alors sécréter des IgM en début de réponse immunitaire. L'hypoglobulinémie est obtenue suite au défaut de formation des centres germinatifs et à l'incapacité des lymphocytes B à effectuer la commutation de classe en cours de réponse immunitaire provoquant l'absence d'IgG et d'IgE dans le sang.

b. Défaut de cytotoxicité en absence de SAP

Un des phénotypes marquant des patients XLP est l'absence de cytotoxicité des cellules NK et T CD8⁺ contre les cellules infectées par l'EBV alors que la cytotoxicité contre d'autres cellules infectées est normale (Bottino et al., 2001; Dupre et al., 2005; Hislop et al., 2010; Parolini et al., 2000). Des tests *in vitro* effectués sur des cellules NK de patients XLP montrent une activité cytotoxique normale lorsque ces cellules sont activées par des récepteurs connus pour ne pas associer SAP comme CD2 ou CD16 (Tangye et al., 2000b). Cependant, l'activité cytotoxique de ces cellules NK n'est pas augmentée lorsque les récepteurs SLAM, comme 2B4 ou NTB-A, sont activés (Flaig et al., 2004; Tangye et al., 2000b). Ainsi, la présence de SAP est nécessaire à l'activation de la cytotoxicité médiée par la co-activation des récepteurs de la famille SLAM dans les cellules NK alors que son absence rend ces récepteurs inhibiteurs (Bottino et al., 2001; Parolini et al., 2000). Les études utilisant les souris *sap*^{-/-} ont confirmé l'implication de SAP dans l'activation des

cellules NK murines *in vitro* et *in vivo* (Bloch-Queyrat et al., 2005). Cependant, les mécanismes moléculaires régulant les fonctions inhibitrices de ces récepteurs ne sont pas encore clairement établis. Le groupe de Veillette, basé sur l'étude de souris déficientes pour EAT-2 et/ou ERT, a proposé que l'absence de SAP favoriserait une signalisation médiée par le recrutement de EAT-2 et/ou ERT sur les récepteurs de la famille SLAM. Ils ont observé après activation par 2B4, une augmentation de la production d'IFN- γ et de la cytotoxicité des cellules NK EAT-2^{-/-} ou ert^{-/-}, suggérant un rôle négatif de ces protéines dans l'activation des cellules NK murines. De plus, ils démontrèrent, en surexprimant EAT-2, que ces mécanismes moléculaires nécessitent la phosphorylation de la queue cytoplasmique de EAT-2 (Roncagalli et al., 2005). Cependant, en utilisant des souris EAT-2^{-/-} et ou ert^{-/-} d'un autre fond génétique, les auteurs d'une étude récente ont montré un rôle positif pour EAT-2 et ERT dans l'activation de la cytotoxicité des cellules NK médiée par 2B4 et CD84 (Wang et al., 2010). Ces résultats suggèrent également que la signalisation médiée par EAT-2 pourrait varier en fonction de la souche de souris étudiée ou d'autres facteurs, comme l'état d'activation des cellules.

Enfin, l'activité inhibitrice des récepteurs SLAM peut être expliquée par l'étude des protéines associées aux récepteurs SLAM en absence de SAP. De nombreuses études ont montré que la protéine SAP régule le recrutement de protéines à domaine SH2 sur les récepteurs SLAM. En absence de SAP, les récepteurs 2B4 et NTB-A recrutent la tyrosine kinase inhibitrice Csk ou les tyrosine phosphatases Shp-1 et Shp-2 et induisent une signalisation inhibitrice conduisant à l'inactivation des cellules NK (Bottino et al., 2001; Eissmann et al., 2005; Parolini et al., 2000; Tangye et al., 1999).

Des études récentes ont montré un rôle similaire pour 2B4 dans les cellules T CD8⁺. Les lymphocytes T CD8⁺ issus de patients XLP montrent une diminution de la production d'IFN- γ et de la cytotoxicité contre des cellules CD48⁺, due à une inhibition de la polarisation de la perforine et de 2B4 au niveau du site de contact entre la cellule T CD8⁺ et la cellule cible (Dupre et al., 2005; Sharifi et al., 2004). Une étude récente a démontré que l'absence de SAP diminue grandement la reconnaissance des cellules B infectées par l'EBV par les cellules T CD8⁺. En effet, les auteurs de cette étude ont montré que des clones de lymphocytes T CD8⁺ dirigés contre l'EBV issus de patients XLP lysent normalement des fibroblastes présentant un peptide antigénique provenant de l'EBV, alors que ces mêmes clones de cellules T présentent une diminution de la cytotoxicité

contre des cellules B infectées par l'EBV. L'utilisation simultanée d'anticorps bloquant dirigés contre 2B4 et NTB-A permet de restaurer la production d'IFN- γ et la cytotoxicité des cellules T CD8⁺ contre les cellules B infectées par l'EBV (Hislop et al., 2010).

Enfin, CD48, le ligand naturel de 2B4, est surexprimé dans les cellules B infectées par l'EBV (Thorley-Lawson et al., 1982). Ainsi, l'inhibition de l'activation des cellules cytotoxiques par 2B4 chez les patients XLP expliquerait la persistance des cellules B infectées par l'EBV pendant la FIM augmentant la fréquence d'apparition des lymphomes B ainsi qu'une réponse T anormale non contrôlée. De nombreuses lignées de cellules B immortalisées expriment NTB-A à leur surface (Bottino et al., 2001). Ainsi, comme pour 2B4, les défauts de signalisation médiée par NTB-A en absence de SAP contribueraient à l'inefficacité de la réponse immunitaire contre les cellules B infectées par l'EBV et favoriseraient l'apparition de la FIM et/ou des lymphomes.

c. Défaut de développement des cellules NKT en absence de SAP

Les cellules NKT forment une lignée séparée de lymphocytes T non conventionnels opérant à la frontière des systèmes immunitaires innée et adaptatif. Il avait déjà été démontré le rôle crucial de la tyrosine kinase Fyn dans le développement des cellules NKT. En effet, les souris déficientes pour Fyn présentent une forte réduction du nombre de cellules NKT (Gadue et al., 1999). De la même manière, les patients XLP et les souris *sap*^{-/-} présentent une absence complète de ces cellules (Nichols et al., 2005a; Pasquier et al., 2005). Ces résultats suggèrent donc un rôle proéminent pour le couple SAP-Fyn dans le développement des cellules NKT. Cela a été confirmé par une étude montrant, *in vitro* et *in vivo*, une forte diminution, mais pas complète, du développement des cellules NKT à partir de cellules souches fœtales ou de souris exprimant la protéine SAP mutée sur le résidu R78 et ne pouvant plus lier Fyn. De plus, les cellules NKT produites pendant ces expériences et exprimant donc une SAP^{R78A}, sécrètent après activation par leur ligand, l'IL-4 et l'IFN- γ de la même façon que les cellules exprimant une SAP WT, indiquant que les voies de signalisation contrôlées par le couple SAP/Fyn sont nécessaires à un développement optimal des cellules NKT mais ne sont pas requises pour la production de cytokines (Nunez-Cruz et al., 2008). Enfin, des études complémentaires ont montré que l'activation de la voie PKC- θ /Bcl10 dépendante de l'association de SAP avec les

récepteurs SLAM et NTB-A est nécessaire au développement des cellules NKT, confirmant l'importance du couple SAP/Fyn dans ce mécanisme (Borowski and Bendelac, 2005; Griewank et al., 2007).

Ainsi, l'absence de cellules NKT chez les patients XLP prédispose à l'apparition des symptômes. La forte production de cytokines de la part de ces cellules permet l'activation des réponses humorales et cytotoxiques et leur dérégulation pourrait mener aux dysgammaglobulinémies ainsi qu'à l'apparition de lymphomes. De plus, des souris déficientes pour CD1d ne possèdent plus de cellules NKT et développent les mêmes hyperproliférations de cellules T CD8⁺ observées chez les souris sap^{-/-} après infection virale, suggérant que les fonctions cytotoxiques contrôlées par les cellules NKT permettent la surveillance du système immunitaire (Roberts et al., 2004).

d. Défaut de l'apoptose des cellules activées en absence de SAP

Deux études récentes ont montré que les hyperproliférations de cellules T CD8⁺ seraient dues à un défaut dans l'AICD, la mort apoptotique des cellules lors de leur réactivation. Tout d'abord, Chen et ses collègues ont montré que l'AICD des lymphocytes T CD8⁺ est fortement diminuée lorsqu'ils éteignent la protéine SAP par ARN interférence. La diminution de l'AICD dans ces cellules est due à une diminution de l'activation de la caspase 9 et de p73, un inducteur de l'apoptose par la voie mitochondriale (Chen et al., 2007). Snow et ses collègues ont par la suite montré que le défaut d'AICD dans les lymphocytes T est dû à une diminution de l'expression de Bim et de FasL dans les cellules de patients XLP ou dans des PBL déficients pour SAP ou pour NTB-A (Snow et al., 2009). Ainsi, les défauts de l'AICD des lymphocytes T CD8⁺ pourraient conduire à l'apparition des infiltrats lymphocytaires observés lors de la FIM.

Les phénotypes des patients XLP pourraient être interprétés par des défauts dans les contacts cellules/cellules médiés par les récepteurs de la famille SLAM. Ainsi, l'absence des interactions entre les cellules T et les cellules B empêche la formation des centres germinatifs et la mise en place d'une réponse humorale efficace. Le développement des cellules NKT, absent chez les patients XLP, est médié par les interactions entre un thymocyte DP et les cellules hématopoïétiques qui composent le thymus. Enfin, la lyse des cellules cibles par les cellules cytotoxiques, déficientes contre les cellules infectées

par l'EBV chez les patients XLP, est également activée par contact entre la cellule cytotoxique et la cellule infectée (Figure 30). Bien que les interactions directes entre lymphocytes dans les phénomènes d'AICD ne sont pas encore bien établies, les patients XLP présentent un grave défaut dans les mécanismes d'apoptose des lymphocytes T activés.

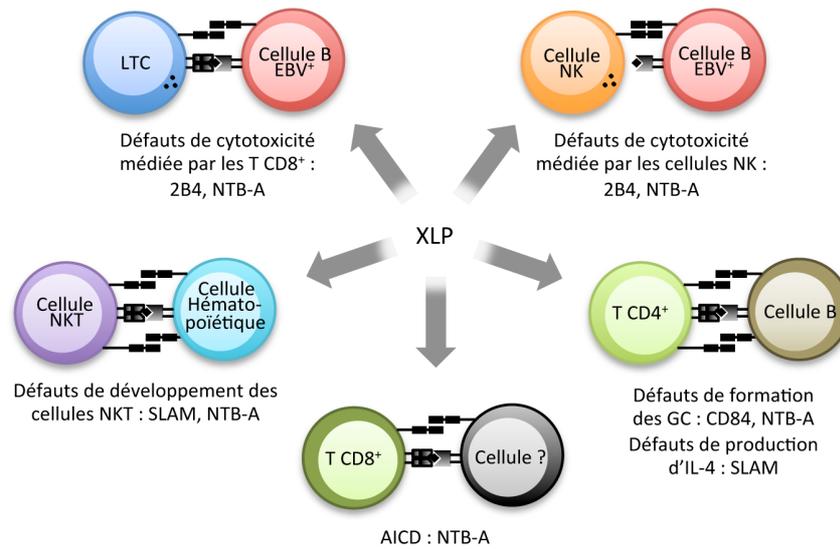


Figure 30 | **Défauts cellulaires retrouvés chez les patients XLP.** Les phénotypes des patients XLP sont montrés dans le cas des défauts d'interaction entre les différents types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire. Les patients XLP présentent des défauts de cytotoxicité médiée par les cellules NK et T CD8⁺ contre les cellules B infectées par l'EBV, une diminution de la réponse humorale due à un défaut d'interaction entre les cellules T et B, à un défaut de développement des cellules NKT et à une sensibilité diminuée à l'AICD. D'après Cannons et al., 2011.

Objectifs du travail

Une réponse immunitaire adaptative fonctionnelle nécessite la coopération entre plusieurs types de cellules immunitaires. Les études de ces dernières années ont montré le rôle crucial des lymphocytes T CD4⁺ dans les mécanismes d'activation des différents acteurs de la réponse immunitaire adaptative. Un lymphocyte T, reconnaissant le peptide antigénique et recevant les bons signaux de co-stimulation, s'active, prolifère, se différencie en lymphocyte T effecteur et sécrète des cytokines dans le but d'activer les différents acteurs de la réponse immunitaire adaptative. Le laboratoire d'accueil étudie ces étapes précoces d'activation des lymphocytes T et plus particulièrement les voies de signalisation induites par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur. Ces dernières années, le laboratoire d'accueil a démontré le rôle fonctionnel des protéines à domaine SH2 dans la signalisation IL-2. En effet, il a été montré que la tyrosine phosphatase Shp-2 interagit, en réponse à l'IL-2, avec un important complexe comprenant les protéines Gab2, PI3K et Crkl (Gesbert et al., 1998a; Gesbert et al., 1998b). La formation de ce complexe est dépendante d'interactions domaine SH2/pTyr (Crouin et al., 2001). Ces travaux ont permis de démontrer que le couple Gab2/Shp-2 est nécessaire à l'activation des voies Erk et Stat5 impliquées dans le contrôle de la prolifération et des fonctions lymphocytaires (Arnaud et al., 2004).

L'analyse du transcriptome d'une lignée lymphocytaire T, dépendante de l'IL-2 pour sa prolifération et sa survie, a mis en évidence une importante régulation du transcrit codant pour la protéine SAP. Cette observation du laboratoire d'accueil a été confirmée en 2007 par Endt *et al*, qui ont montré que l'expression de SAP augmente dans les cellules NK humaines stimulées par l'IL-2 (Endt et al., 2007). Cette petite protéine de 128 acides aminés, produit du gène sh2d1a, est essentiellement composée d'un domaine SH2. Les données de la littérature indiquent que la protéine SAP est recrutée sur les motifs ITSM des récepteurs de la famille SLAM et module la signalisation en aval de ces récepteurs. Ainsi, il a été montré que l'engagement des différents récepteurs SLAM régule un nombre important de fonctions immunitaires, comme la production de cytokines par les lymphocytes T CD4⁺, la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK ou la différenciation des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'anticorps (Cannons et al., 2011).

Plusieurs études ont démontré que SAP pouvait entrer en compétition avec Shp-2 et ainsi inhiber son recrutement sur les récepteurs SLAM (Sayos et al., 1998; Shlapatska et al., 2001; Tangye et al., 1999). Les protéines SAP et Shp-2 possèdent donc des

partenaires communs. Dans le but d'étudier une possible régulation de la fonction de Shp-2 par SAP dans la signalisation IL-2, nous nous sommes intéressés à découvrir de nouveaux partenaires pour la protéine SAP. Cette recherche a été réalisée de deux façons expérimentales, d'une part par des expériences de biochimie, et d'autre part, par le criblage d'une banque d'ADNc de lymphocytes T humains par double hybride conditionnel dans la levure. Les travaux de cette étude ont permis de mettre en évidence l'association de SAP avec deux nouveaux membres : la chaîne de signalisation CD3 ζ du complexe TCR-CD3 et la molécule d'adhésion Pecam-1. Dans une première partie, je discuterai l'association de SAP avec la chaîne CD3 ζ du récepteur à l'antigène et son rôle dans les signaux précoces d'activation des lymphocytes T. Puis, dans une deuxième partie, je détaillerai les résultats que nous avons obtenus sur la caractérisation et la fonction de l'interaction entre SAP et Pecam-1.

Résultats

La protéine adaptatrice SAP s'associe directement avec la chaîne CD3 ζ et régule la signalisation du TCR.

Richard Proust¹, Jacques Bertoglio², Franck Gesbert¹

¹INSERM UMR-S1004, Université Paris Sud, Hôpital Paul Brousse, 94807 Villejuif.

²INSERM UMR-S749, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif.

INTRODUCTION

Le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X est une maladie génétique rare affectant un garçon sur un million et caractérisée par une réponse immunitaire dérégulée face à l'infection par l'EBV. Les patients XLP présentent différentes manifestations cliniques telles que des mononucléoses infectieuses fulminantes, des dysgammaglobulinémies et des désordres lymphoprolifératifs, aboutissant à leur décès. L'altération du gène *sh2d1a* a récemment été identifiée comme étant responsable du syndrome XLP. Ce gène, situé sur le locus Xq25, code pour une protéine de 128 acides aminés appelée SAP. La protéine SAP est composée exclusivement d'un domaine SH2 qui associe les résidus tyrosine d'une séquence consensus T/SxYxxI/V, appelé motif ITSM. Ces motifs ITSM ont été retrouvés dans les parties cytoplasmiques des récepteurs de la famille SLAM et permettent le recrutement de SAP lors de leur activation. Les récepteurs de la famille SLAM sont des co-activateurs de la réponse immunitaire faisant partie de la superfamille CD2 et incluent : SLAM (CD150), 2B4 (CD244), NTB-A, CD84, Ly-9 (CD229) et CRACC (CD319).

Les lymphocytes T sont les acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative. Une activation complète de ces cellules nécessite un premier signal délivré par le complexe TCR-CD3 et un deuxième signal fourni par les molécules de costimulation, comme CD28, CD2 ou les membres de la famille SLAM. L'association de SAP avec les différents récepteurs SLAM régule l'activation de nombreuses fonctions du système immunitaire, telles que la production de cytokines, la cytotoxicité ou le développement des cellules NKT. En absence de SAP chez les patients XLP, l'engagement des récepteurs SLAM induit

leur association avec la tyrosine phosphatase Shp-2. Le recrutement de Shp-2 sur les récepteurs SLAM engendre une signalisation inhibitrice empêchant l'activation des cellules. De plus, une implication de SAP en dehors des voies de signalisation médiées par les récepteurs SLAM n'a jamais été décrite. Dans le but de découvrir de nouvelles voies de signalisation régulées par SAP ainsi qu'une possible régulation de la fonction de Shp-2 par SAP, nous nous sommes intéressés à découvrir de nouveaux interacteurs pour cette protéine. Dans cette étude, nous montrons pour la première fois l'interaction directe entre SAP et la chaîne CD3 ζ du TCR et cette association régule les signaux précoces d'activation des lymphocytes T.

RÉSULTATS

SAP s'associe exclusivement avec des protéines membranaires dans les Jurkat.

SAP est une protéine cytosolique qui a tout d'abord été montrée comme étant associée aux récepteurs transmembranaires de la famille SLAM. Endt et ses collègues ainsi que le laboratoire d'accueil ont observé une forte régulation de la protéine SAP sous IL-2. Cependant, des pêches effectuées à l'aide d'une protéine de fusion GST-SAP ont montré très peu d'interacteurs phosphorylés dans des cellules Kit 225, dépendantes de l'IL-2 pour leur survie et leur croissance, stimulées par l'IL-2 (non montrés). Ces résultats nous ont suggéré que SAP ne devait avoir qu'un rôle mineur dans la signalisation IL-2.

Dans le but d'approfondir les connaissances sur les partenaires de la protéine SAP dans un autre contexte cellulaire, nous avons effectué des expériences similaires sur des cellules Jurkat traitées au pervanadate (PV). Il a été montré que le pervanadate est un puissant inhibiteur de tyrosine phosphatases et permet donc d'augmenter la phosphorylation sur résidus tyrosine des protéines, mimant ainsi une activation des lymphocytes T. Dans un premier temps, nous avons effectué des pêches, à l'aide d'une protéine de fusion GST-SAP, sur des fractions cytosoliques et membranaires de cellules Jurkat traitées au pervanadate. Nous observons alors que SAP associe un grand nombre de protéines phosphorylées, allant de 20 kDa jusqu'à 110 kDa dans la fraction membranaire lorsque les cellules sont traitées au PV (Figure 1A, panneau de gauche). De façon plus surprenante, SAP n'interagit pas ou alors très faiblement avec des protéines tyrosines phosphorylées cytosoliques (Figure 1A, panneau de droite). De plus, un western blot dirigé contre la protéine SAP montre un recrutement de SAP dans la

fraction membranaire lorsque les cellules sont traitées au PV (Figure 1B). Ces résultats prouvent que lorsque les cellules sont activées, la protéine SAP est recrutée à la membrane où elle interagit avec ses partenaires tyrosines phosphorylés.

SAP s'associe avec NTB-A et CD3 ζ dans les lymphocytes T activés.

Dans le but de savoir si les partenaires de SAP sont phosphorylés lors d'un stimulus plus physiologique, nous avons stimulé les cellules Jurkat avec l'anticorps UCHT-1 dirigé contre CD3 ϵ , et qui induit la signalisation du TCR lorsqu'il est ajouté en solution sur des cellules T. Des pêches GST-SAP effectuées sur des lysats de Jurkat stimulées ou non CD3 montrent que la protéine SAP associe le même profil de protéines phosphorylées que dans les fractions membranaires (comparer Figure 1A, panneau de gauche avec la Figure 2A, panneau de gauche). De la même façon, le même profil de protéines est retrouvé dans une pêche GST-SAP effectuée sur des lysats totaux de Jurkat traitées au pervanadate ou sur des lysats totaux de lymphocytes purifiés (Figure 2A). Ces résultats confirment que SAP associe des protéines qui sont phosphorylées en réponse à une activation du TCR. Parmi les protéines précipitées, les p70 et p20-21 sont les deux protéines qui donnent le signal pTyr le plus fort, suggérant que ces protéines sont deux interacteurs principaux de SAP.

La protéine SAP a largement été décrite comme étant associée aux récepteurs de la famille SLAM. D'après les données bibliographiques, les cellules Jurkat n'expriment ni SLAM ni 2B4, les deux principaux interacteurs de SAP. Cependant, en utilisant un anticorps spécifique, nous avons démontré que la p70 est le récepteur NTB-A et que l'association de SAP avec NTB-A augmente légèrement lorsque les cellules sont traitées au PV (Figure 2B).

Comme l'interaction de SAP avec NTB-A a déjà été décrite dans la littérature, nous nous sommes intéressés au doublet p20-21. Ce doublet est observé dans les lysats totaux de cellules stimulées CD3 et ressemble beaucoup dans sa façon de migrer à la chaîne CD3 ζ phosphorylée. En utilisant un anticorps spécifique, nous avons démontré la présence de CD3 ζ dans une pêche GST-SAP effectuée sur des lysats de Jurkat traitées au PV (Figure 2B). La précipitation de CD3 ζ a ensuite été confirmée dans une pêche SAP effectuée sur un lysat de lymphocytes purifiés stimulés CD3 (Figure 2C), confirmant également que les résultats obtenus ne sont pas seulement dus à l'utilisation de lignées cellulaires.

SAP interagit directement avec CD3 ζ .

Dans le but de savoir si l'interaction de SAP avec la chaîne CD3 ζ est directe ou médiée par une protéine faisant partie d'un complexe comprenant CD3 ζ , nous avons effectué une expérience de Far-Western SAP sur des immunoprécipitations de CD3 ζ . Par cette méthode, nous révélons les formes p20-21 de CD3 ζ , démontrant une interaction directe entre SAP et les formes phosphorylées de CD3 ζ (Figure 3A, étoile des panneaux FW GST-SAP et WB pTyr). Dans cette expérience, nous observons également que SAP pourrait s'associer, sous stimulation, avec la forme à 16 kDa de CD3 ζ (Figure 3A, flèche des panneaux FW GST-SAP et WB CD3 ζ). Dans un western-blot anti-phosphotyrosine surexposé effectué sur des immunoprécipitations de CD3 ζ , nous révélons, bien qu'à un plus faible niveau, que la forme p16 de CD3 ζ peut être phosphorylée après stimulation (Figure S1). De plus, nous révélons la protéine SAP dans une immunoprécipitation des chaînes CD3 ζ après traitement des cellules au PV (Figure 3B). Ces données nous ont permis de démontrer pour la première fois que la protéine SAP interagit directement avec les formes phosphorylées de CD3 ζ dans les cellules Jurkat.

SAP interagit avec l'ITAM proximal de la membrane de CD3 ζ .

La chaîne CD3 ζ possède six tyrosines, formant trois ITAMs, qui sont phosphorylées après activation des cellules T. Dans le but de connaître le/les tyrosines responsables de l'association de CD3 ζ avec SAP, nous avons muté, une par une ou ITAM par ITAM, les tyrosines en phénylalanines comme cela a été schématisé dans la Figure 4A. Dans un premier temps, nous avons ré-exprimé dans des cellules HeLa les formes mutées sur les deux tyrosines qui composent chaque ITAM. 48 heures après la transfection, les cellules HeLa sont traitées ou non au PV, lysées puis des pêches SAP sont effectuées sur les différents lysats. SAP n'associe plus CD3 ζ lorsque les tyrosines qui composent le premier ITAM (Y72FY83F) sont mutées alors qu'on précipite autant de CD3 ζ mutées sur les autres ITAMs (Y111FY123F et Y142FY153F) que pour le WT (Figure 4B, étoile du panneau du haut). Comme SAP n'est composé que d'un seul domaine SH2, nous avons effectué des expériences similaires en ré-exprimant les formes mutées sur les tyrosines Y72 ou Y83 qui composent le premier ITAM de CD3 ζ . Une pêche SAP confirme la perte de l'association lorsque les deux tyrosines sont mutées alors qu'on observe qu'une forte diminution, mais pas complète, de l'association lorsqu'une seule des deux tyrosines

(Y72F ou Y83F) est mutée (Figure 4C, panneau du haut). Ces expériences démontrent que SAP interagit avec les tyrosines phosphorylées de l'ITAM proximal de la membrane de CD3 ζ .

Diminution de la réponse des lymphocytes T en absence de SAP.

Comme nous montrons une interaction directe de SAP avec CD3 ζ , nous regardons maintenant l'impact de l'absence de SAP sur la signalisation précoce induite par l'activation du TCR. Pour cela, nous avons généré une lignée de cellules H9 éteignant stablement à environ 80% la protéine SAP par ARN interférence (Figure 5A). Suite à une cinétique d'activation CD3, nous montrons que l'activation de la tyrosine kinase ZAP-70 n'est pas modifiée en absence de SAP. Cependant, nous observons une diminution significative de l'activation des kinases Erk et Akt lorsque la protéine SAP est absente (Figure 5A). Des immunoprécipitations effectuées avec un anticorps anti-pTyr nous permet d'observer, entre autres, la formation de complexes protéiques à la membrane suite à une activation CD3 des cellules. Dans des Jurkat WT, l'activation CD3 induit le recrutement de la PLC- γ , de Slp-76 et de Grb2. Le recrutement de ces protéines au niveau de complexes protéiques est complètement abrogé lorsque la chaîne CD3 ζ est éteinte. L'extinction de SAP induit un phénotype intermédiaire dans lequel le recrutement de Slp-76 est diminué alors que ceux de la PLC- γ et de Grb2 sont complètement abolis suite à l'activation des cellules (Figure 5B). L'absence de SAP conduit donc à une diminution des voies de signalisation impliquant la PLC- γ , Grb2, Erk et Akt qui sont induites après activation du TCR.

Nous avons également démontré que l'absence de SAP conduit à une diminution de l'expression d'IL-2 et d'IL-4 après une stimulation CD3+CD28 (Figure 6).

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que la protéine SAP interagit directement avec les tyrosines phosphorylées Y72 et Y83 qui composent le premier ITAM de la chaîne CD3 ζ du complexe TCR-CD3. Nous démontrons que cette interaction régule les signaux précoces d'activation des lymphocytes T, tels que l'activation des kinases Erk et Akt ainsi que la production de cytokines comme l'IL-2 ou l'IL-4.

The Adaptor Protein SAP Directly Associates with CD3 ζ Chain and Regulates T Cell Receptor Signaling

Richard Proust¹, Jacques Bertoglio², Franck Gesbert^{1*}

1 Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale UMR-S1004, Université Paris-Sud, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France, **2** Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale UMR-S749, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Abstract

Mutations altering the gene encoding the SLAM associated protein (SAP) are responsible for the X-linked lymphoproliferative disease or XLP1. Its absence is correlated with a defective NKT cells development, a decrease in B cell functions and a reduced T cells and NK cells cytotoxic activities, thus leading to an immunodeficiency syndrome. SAP is a small 128 amino-acid long protein that is almost exclusively composed of an SH2 domain. It has been shown to interact with the CD150/SLAM family of receptors, and in a non-canonical manner with SH3 containing proteins such as Fyn, β PIX, PKC θ and Nck1. It would thus play the role of a minimal adaptor protein. It has been shown that SAP plays an important function in the activation of T cells through its interaction with the SLAM family of receptors. Therefore SAP defective T cells display a reduced activation of signaling events downstream of the TCR-CD3 complex triggering. In the present work, we evidence that SAP is a direct interactor of the CD3 ζ chain. This direct interaction occurs through the first ITAM of CD3 ζ , proximal to the membrane. Additionally, we show that, in the context of the TCR-CD3 signaling, an sh-RNA mediated silencing of SAP is responsible for a decrease of several canonical T cell signaling pathways including Erk, Akt and PLC γ 1 and to a reduced induction of IL-2 and IL-4 mRNA. Altogether, we show that SAP plays a central function in the T cell activation processes through a direct association with the CD3 complex.

Citation: Proust R, Bertoglio J, Gesbert F (2012) The Adaptor Protein SAP Directly Associates with CD3 ζ Chain and Regulates T Cell Receptor Signaling. PLoS ONE 7(8): e43200. doi:10.1371/journal.pone.0043200

Editor: Jean Kanellopoulos, University Paris Sud, France

Received: March 15, 2012; **Accepted:** July 18, 2012; **Published:** August 13, 2012

Copyright: © 2012 Proust et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by INSERM, La Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée to JB), association Nouvelles Recherches Biomédicales (NRB)-Vaincre le cancer and université Paris-Sud (FG and RP). RP received a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. RP is funded by the Association pour la Recherche contre le Cancer (aide individuelle) and received the prize Challenge Nathalie from the NRB. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: franck.gesbert@u-psud.fr

Introduction

The signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP) is a small cytoplasmic protein encoded by the gene *sh2d1a*. Mutations or deletions of this gene have recently been shown to be directly responsible for the X-linked lymphoproliferative syndrome-1 (XLP1) [1,2,3,4]. This disease is a rare genetic disorder that only affects young boys and is characterized by an immunodeficiency and an incapacity to mount a proper immune response to Epstein-Barr virus infections [5]. SAP was concomitantly identified as an interactor of the SLAM family of transmembrane molecules. This family of costimulatory receptors includes SLAM (CD150), 2B4 (CD244), NTB-A, CD84, Ly-9 (CD229) and CRACC (CD319) [6,7,8,9]. SAP is a 128 amino-acid long protein and, along with EAT-2 and ERT, it belongs to the SAP family of small adaptor proteins [10]. These small proteins are composed of a single SH2 domain that is followed, in the case of SAP, by a short C-terminal tail. This SH2 domain has been shown to bind to a specific consensus sequence named an Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif (ITSM), TxYxxV/I/L. This sequence was first evidenced in the cytoplasmic tail of the SLAM family of proteins. It has recently been proposed that SAP plays a switch function. Its recruitment to a specific ITSM may compete with the recruitment of the cytosolic SH2 containing tyrosine phosphatase-2 (SHP2), and may favor the recruitment of

SHIP, thus controlling a switch between these two signaling pathways [4,11].

Also, and this is a unique feature for an SH2 domain, it has been shown that SAP binds several SH3 domain containing proteins, including Fyn, β PIX, PKC θ and NCK1 through a region centered on the R78 residue of SAP [12,13,14,15]. This would give SAP the properties of a small adaptor protein, playing a role in the recruitment of signaling molecules to membrane proteins of the SLAM family. Therefore, it is proposed that SAP allows for the recruitment of Fyn to SLAM, and would thus play an activatory role on subsequent signaling mechanisms. The cellular functions of SAP are not yet well understood. SAP is exclusively expressed in T, NK and NKT cells, and its expression in the B cell compartment is still a matter of debate [16,17]. It has been shown, both in XLP-1 patients and in SAP-deficient mice models, that the absence of SAP is responsible for an immunodeficiency that is due to an absence of NKT cell development, a decrease in B cell functions and a reduced T-cell and NK-cell cytotoxic activities [7,18,19,20].

It is known that CD150 provides a co-stimulatory signal to T cells, and this function is partly dependent on the presence of SAP. T cell activation is dependent upon the triggering of the T cell receptor (TCR)-CD3 complex (TCR-CD3) and the subsequent activation of signaling cascades. The TCR is composed of a heterodimer of α and β variable chains that are responsible

for the specific recognition of the antigen properly presented by the MHC molecules [21]. The CD3 complex is composed of a combination of four transmembrane proteins ϵ , γ , δ and ζ that form hetero- or homodimers ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$). The unique feature of the T cell antigen receptor is that each CD3 molecule contains at least one ITAM, whose consensus sequence is xYxxI/L(x)₆₋₈YxxI/L, in its cytoplasmic tail [22,23]. Altogether a TCR-CD3 complex contains 10 ITAMs, one for each ϵ , γ and δ and three for ζ . The triggering of the TCR-CD3 complex leads to a rapid and strong activation of cytosolic tyrosine kinase activity [24,25,26,27]. The Src family kinases Lck and Fyn play a major function in the proximal phosphorylation events mediated by the TCR-CD3 complex. The CD3 molecules are rapidly and sequentially phosphorylated on their ITAM motifs and this leads to an intricate and very organized signaling cascade. The first phosphorylation events that occur on CD3 ζ provide a docking site for the tyrosine kinase ZAP70 that, in turn, strengthens the phosphorylation of the chain and also phosphorylates accessory molecules [28]. Among these molecules are the transmembrane adaptor protein LAT and the cytosolic adaptor SLP-76 that play central and mandatory functions in the TCR-CD3 signaling events [29,30]. Once phosphorylated LAT and SLP-76 allow for the subsequent recruitment, directly or indirectly, of signaling molecules such as PLC γ 1, PI3K, Cbl, Vav or Grb2 [29,31,32,33].

A full T cell activation requires a signal that is delivered by the TCR-CD3 complex and a co-stimulatory signal from other receptors such as CD28, CD2 and the CD150/SLAM family of receptors. Recent studies have shown that members of this family contain ITSM motifs and thus can associate with SAP and this interaction plays a central role in the co-stimulatory action and regulates some of the TCR-CD3 mediated signaling events [34]. Hence it has been proposed that the XLP associated immune deficiency is due to a lack of T cell activation that would be a consequence of the lack of SAP association with CD150, CD84, NTB-A, CD244 and CD229.

In this paper, we show, in various T cell lines as well as in fresh PBLs that SAP exclusively associates with membrane proteins in activated cells. Among these proteins we have identified NTB-A and more surprisingly CD3 ζ . We show that SAP directly binds to residues Y72 and Y83 that compose the first ITAM of CD3 ζ (Y72-Y83). Furthermore, we show that SAP deficient cells display a strong reduction of Erk and Akt activation as well as a strong reduction of the recruitment of PLC γ 1, Grb2 and SLP76 to a phospho-tyrosine containing complex. Additionally, we show that the silencing of SAP is accompanied by a reduced induction of IL-2 and IL-4 mRNA expression in Jurkat cells. Collectively, these data show for the first time that SAP directly associates with CD3 ζ , and this association, in addition to the already described association with SLAM family members, directly regulates TCR-elicited intracellular signaling events and T cell functions.

Methods

Reagents and Antibodies

Chemicals were from SIGMA (St Louis, MO) and Euromedex (Souffelweyersheim, France). Restriction enzymes were from New England Biolabs (Ipswich, MA). Fugene reagent was from Roche (Meylan, FR). Anti-CD3 ζ and anti-myc (9E10) mAbs, anti-Grb2 and anti-SAP purified sera were purchased from Santa Cruz Biotechnology (TEBU, Le Perray en Yvelines, France), anti-NTB-A mAb from Abnova (Wallnut, CA), anti-phosphotyrosine 4G10 mAb from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Monoclonal rabbit Abs against phospho-Akt Ser473 (D9E), phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2, Thr202/Tyr204, D13.14.4E), p44/42 MAPK

(Erk1/2, 137F5), phospho-Zap-70 (Tyr319, 65E4), and Zap70 (D1C10E) were purchased from Cell Signaling (Boston, MA). Polyclonal rabbit anti-PLC γ 1 and anti-Akt antibodies were from Cell Signaling Technologies (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Anti-beta actin mAb was from MBL (Clinisciences, Nanterre, France), anti-GST antibody was from Neobioscience (Clinisciences) and anti SLP76 mAb was from BD transduction laboratories (BD, Le Pont de Claix, France). For cell stimulation, anti-CD3 ϵ (UCHT-1) mAb was purchased from Biogenend (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France).

Sh-RNA constructs were from Open Biosystems (Open Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Two Sh-RNA constructs, targeting different sequences in the SAP transcript, were used in this study. These two constructs, clone ID TRCN0000082710 (Sh-A3) and TRCN0000082712 (Sh-A5), were from the RNAi consortium and their respective sequences are:

5'-CCGGGTGCTGTATCAGCGTTACATTCTCGA-GAATGTAACCGTGATACAGCACTTTTTG-3', and 5'-CCGGCACAAGGTAAGTACTACAGGGATAACTCGAGT-TATCCCTGTAGTACCTTGGTTTTG-3'.

One Sh-RNAiR targeting the 3' UTR sequence of the human CD3 ζ transcript was used, ref#V3LHS_409087, mature sense sequence: 5'-ACCCGTCAATGTACTAGGATA-3'.

Cell lines, Culture Conditions and Transfections

Human peripheral blood mononuclear cells were obtained from volunteer anonymous healthy donors from the "Etablissement Français du Sang". Mononuclear cells were separated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation and treated as described elsewhere [35]. Human samples were collected and handled in the full respect of the declaration of Helsinki.

Jurkat, a human T-ALL derived cell line (ATCC, TIB-152) and H9 (ATCC, HTB-176) a clone derived from the T leukemic cell line Hut-78 were grown in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS).

Jurkat and H9 cells were transfected using a BioRad (Hercules, CA) electroporator according to the manufacturer specifications. Stable clones were obtained after a 2 week puromycin selection and limiting dilution.

HeLa cell lines (ATCC, CCL-2) were maintained in culture in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO/Invitrogen) medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Transfections were performed using FuGENE 6 transfection reagent, according to the manufacturer specifications (Roche Diagnostics, Hoffman Laroche, Basel, Switzerland). The experiments were performed 48 hours post-transfection.

For stimulation experiments, Jurkat and H9 cells were starved over-night in RPMI-1% BSA. The cells were resuspended at 2.10⁷/mL and incubated with either 25 μ M pervanadate for 30 min or 10 μ g/mL of UCHT-1 Ab for 10 min. Stimulations were stopped with two washes in ice-cold PBS and cells were lysed as described below.

Plasmids, constructions and site directed mutagenesis

The human CD3 ζ was cloned by PCR using the following set of primers 5'-CGGGTACCGCCAC-CATGAAAGTG-GAAGGCGCTTTTACC-3' and 5'-GATATCGC-GAGGGGGCAGGGCCTGCATGTG-3' and inserted into pCR4-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer protocol. For eukaryotic expression, all constructs were subcloned into pEF6-Myc expression vector. CD3 ζ Y-F mutants were generated with the QuickChange® II-E Site-Directed Mutagenesis kit according to the manufacturer instructions (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands). The

following primers were used for the generation of each mutant, as indicated.

CD3 ζ -Y72F: 5'AGAACCAGCTCTTTAACGAGCTCAA3' and 5'TTGAGCTCGTTAAAGAGCTGGTTCT3'.

CD3 ζ -Y83F: 5'GAAGAGAGGAGTTTCGATGTTTGGGA3' and 5'TCCAAAACATCGAACTCCTCTCTTC-3'.

CD3 ζ -Y111F: 5'AGGAAGGCCTGTCAATGAACTGCA3' and 5'TGCAGTTCATTGAACAGGCCTTCCT3'.

CD3 ζ -Y123F: 5'TGGCGGAGGCC TTCAGTGA-GATTGG3' and 5'CCAATCTCACT-GAAGGCCTCCGCCA3'.

CD3 ζ -Y142F: 5'ACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAG3' and 5'CTGAGACCTGGAAGGCCATCGT3'.

CD3 ζ -Y153F: 5'CCAAGGACACCTTCGACGCCCTTCA3' and 5'TGAAGGGCGTCAAGGTGCTTGG3'.

All PCR were performed using high fidelity DNA polymerases and the constructs were verified by DNA sequencing.

Immunoprecipitation, pull down and Western blotting

Cells were lysed with ice-cold lysis buffer (50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 0.5% Triton X-100) containing 1mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ and 1/100 Protease Cocktail Inhibitors. Nuclear pellet and debris were removed by centrifugation at 17×10³g 20 min at 4°C. 25 μ g of total proteins from cell lysates were mixed with an equal volume of reducing sample buffer 2x (Laemmli's buffer) and boiled for 5 min. For immunoprecipitation experiments, an equivalent amount of proteins from cell lysates was incubated for 2 h at 4°C with the specified antibodies. Protein-G beads were added to the immune complexes for 45 minutes, washed five times with ice-cold lysis buffer. Purified immuno-precipitates, immobilized on protein-G beads, were mixed with an equal volume of Laemmli's buffer 2x and boiled for 5 min.

For pull down experiments, 2–5 μ g of purified GST fusion proteins were added to precleared lysates for 2 hours at 4°C. 20 μ L of Glutathione-sepharose beads were added for 45 min at 4°C. The beads were washed 5 times with lysis buffer, boiled in Laemmli's buffer.

Proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked for 2 h in TBS-T (TBS/0.2% Tween-20) with 5% BSA prior to being successively probed with the proper primary and secondary Ab in TBS-T. The membranes were washed, and protein detection was conducted using Lycor reagents and Odyssey detection material.

Far Western Blotting

Proteins were immunoprecipitated, separated, and transferred to PVDF membrane as described above. The membrane was incubated with the indicated purified recombinant protein (GST alone or GST-SAP) at 1 μ g/mL in TBS, 0.2% Tween, 3% bovine serum albumin for 1.5 h. The membrane was washed 5 times and the recombinant protein was revealed by western blot against the GST moiety with an anti-GST antibody. The immunoblot was then processed further as described above.

Cell fractionation

After stimulation, cells were resuspended in Dounce Buffer at 2.10⁸/mL (10 mM Tris (pH 7.6), 0.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ and 1/100 Protease Cocktail Inhibitors) for 10 min at 4°C. Cells were broken by 30 strokes in a Dounce homogenizer with a tight-fitting pestle. Tonicity was restored by adding Tonicity Restoration Buffer (10 mM Tris (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ and 1/100 Protease Cocktail Inhibitors). Nuclear fractions were removed by centrifu-

gation at 500 g for 5 min at 4°C. Cytosols and crude membrane fractions were separated by a 45 minutes centrifugation at 110000 g and 4°C in a bench top ultracentrifuge (Optima XL, Beckman- Coulter). The pelleted crude membrane fraction was solubilized in Lysis buffer and the cytosols were equilibrated for the detergent content.

RNA extraction, Reverse transcription and Quantitative PCR

Cells were incubated on ice for 30 minutes with 10 μ g/mL anti-CD3 and 25 μ g/mL anti-CD28. After 2 washes in ice-cold PBS, cells were cross-linked with 50 μ g/mL goat anti-mouse F(ab')₂ for the indicated time at 37°C. RNA was extracted using the SV Total Isolation System according to the manufacturer's protocol (Promega). 2 μ g of RNA were reverse-transcribed using the SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative PCR were performed in a Stratagene Mx3005P Real Time Thermal Cycler, using the Stratagene Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. Transcripts for the ribosomal 60S-subunit protein Rpl38 were used as an internal control. The specific primers used are: Rpl38 forward: 5'-GTTGCTGCTTGCTGTGAGTG-3'; Rpl38 reverse: 5'-CAGATTGGCATCCTTTCGTC-3'; IL-2, forward: 5'-AACT-CACCAGGATGCTCACATTTA-3', reverse: 5'-TCCCTGGGTCTTAAGTAAAAGTTT-3'; IL-4, forward: 5'-TTCTCCTGATAAACTAATTGCCTCACATTGTC-3', reverse: 5'-GGTGATATCGCACTTGTGTCCGTGG-3'. Results were expressed as cytokine/Rpl38 mRNA ratio.

Results

SAP specifically associates with membrane proteins in activated Jurkat cells

SAP is a small adaptor cytosolic protein that is known to associate with the SLAM family of receptors. In order to further explore the SAP associated signalsome in activated T cells a pervanadate stimulation of Jurkat T cells was performed. It has been described that pervanadate forms a permeant inhibitor of tyrosine phosphatases and leads to an increased tyrosine phosphorylation of many cellular proteins, thus mimicking the pattern of phosphorylation in activated T lymphocytes [36]. The cells were fractionated into a crude membrane fraction and a cytosolic fraction, and equivalent amounts of proteins from each fraction were used for pull down experiments with GST-SAP fusion protein or GST as a control. As shown in figure 1A (left panel), the GST-SAP fusion protein interacts with numerous phospho-proteins extracted from the membrane fraction. The major associated proteins displayed apparent molecular weights spanning from 110 to 21 kDa (figure 1, left panel, arrows). Surprisingly, it did not interact, or only very weakly, with cytosolic proteins (Figure 1A, right panel). Total extracts are shown as Total Membrane extract (TME) and Total Cytosolic Extract (TCE) in Figure 1A.

In addition, a western blot directed against SAP reveals that SAP is slightly more abundant in total membrane extracts (TME) upon activation (Fig 1B, upper panel). The equivalent protein loading, within each fraction, was verified by an anti-actin blot (Figure 1B, lower panel). The intensity of each band was numerically quantified. The densitometric analysis of the SAP/actin ratio, averaged on at least four independent experiments, is represented in Figure 1B. Our results repeatedly showed an increase of SAP in the membrane fraction of activated cells (about 34% increase, in average) with a reciprocal decrease in the

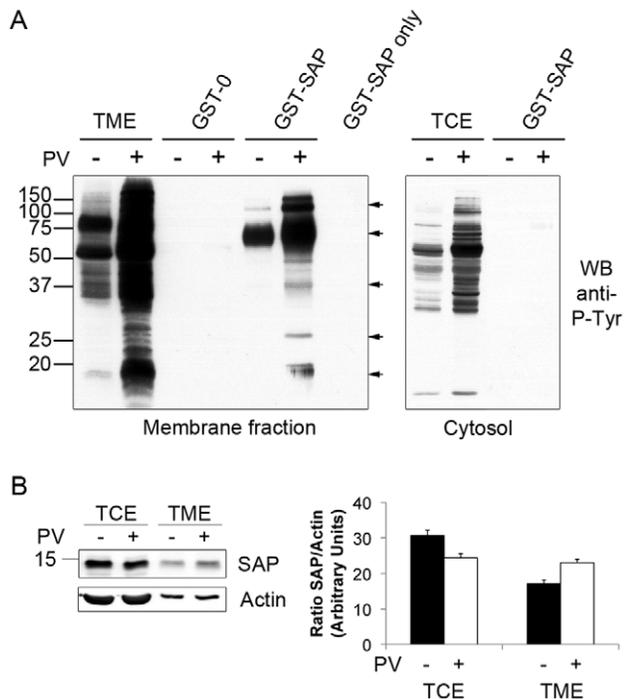


Figure 1. SAP partners are exclusively in the membrane fractions. Jurkat cells were either untreated or treated with 25 μ M of pervanadate for 30 minutes. Cells were fractionated by Dounce homogenization and membranes were purified by ultra centrifugation, resolubilized in lysis buffer, precleared and GST or GST-SAP were incubated with the cytosol or membrane fractions. A, pull downs were separated and immunoblotted with anti-phosphotyrosine antibody (4G10). B, crude membrane or cytosolic fractions from 5×10^5 cells were separated and immunoblotted for SAP. Each band was numerically quantitated (indicated in arbitrary units, a.u.) and the percentages indicate the evolution of the band intensity in the stimulated lysate reported to the non-stimulated lysate in each fraction. These experiments were repeated at least four times. TME: Total Membrane Extract, TCE: Total Cytosolic Extract. doi:10.1371/journal.pone.0043200.g001

cytosolic fraction (about 20% decrease, in average). Altogether, these results indicate that SAP is being recruited at the membrane once its partners are tyrosine phosphorylated. Also these results are the first that demonstrate that SAP exclusively interacts with membrane associated partners and this led us to perform all subsequent experiments with whole cell extracts assuming that all the described interactions occur at the membrane.

SAP associates with NTB-A and CD3 ζ in activated T lymphocytes

It has been shown that SAP binds to the ITSM sequence located in the cytoplasmic region of the SLAM family of receptors. In order to validate our system we investigated which of these receptors were present in our GST-SAP pull down experiments. GST-pull down experiments were performed on whole cell extracts of resting or CD3-activated cells. This was performed by directly adding a purified UCHT-1 monoclonal antibody, directed against the CD3 ϵ chain. This antibody, used in solution, is known to activate the CD3 complex and the downstream signaling cascade. Noticeably, the pattern of associated proteins, from a whole cell extract, is very similar to the one previously observed in a membrane fraction (compare Fig. 1A to Fig. 2A), thus confirming that the majority, if not all, of the SAP associated

proteins is located in the membrane fraction. In more details we could observe several SAP-associated proteins with molecular weights varying from 110, 70, 37, 23 and 20–21 kDa (Fig. 2A arrows). The two stronger signals were obtained with the p70 and the p20–21 phospho-proteins. As a comparison a similar pull down experiment was performed on whole cell lysates from pervanadate-treated Jurkat cells and this produced a very similar pattern of associated phospho-proteins (Figure 2A, compare left and middle panel). This result demonstrates that, in our conditions, a pervanadate activation of T cells perfectly mimics the phospho-signalosome observed with a more physiological TCR-CD3 activation through UCHT1 binding. Also, as shown in figure 2A (right panel) a similar experiment performed on fresh Peripheral Blood Lymphocytes provided similar results, thus excluding the possibility that our observation would be cell line specific.

To our knowledge neither SLAM (CD150) nor 2B4, the two main interactors of SAP, are expressed in Jurkat T cells [37]. Using a specific serum (Figure 2B) we show that NTB-A comigrates with the phosphorylated p70 protein that associates with SAP. Thus NTB-A is at least one component of this heavily tyrosine-phosphorylated p70 band. In accordance with the results obtained in Figure 2A we demonstrate that NTB-A is phosphorylated and associates with SAP in non-activated cells and this association is increased upon activation.

Having confirmed that SAP interacts with a known partner, we turned to the identification of unreported partners. Interestingly, the SAP-associated 20–21 kDa phospho-proteins could be observed in the whole cell lysates of UCHT-1 stimulated cells and were strikingly similar, in their migratory pattern, to the well-known CD3 ζ chain. In figure 2B a specific anti-CD3 ζ western blot demonstrates that the p20–21 protein is indeed a presumably phosphorylated form of CD3 ζ and that it is associated with SAP in activated cells. Additionally, we demonstrate that this SAP-CD3 ζ association is also seen in CD3 activated PBL (Figure 2C), which argues against a possible cell line dependent observation.

SAP directly interacts with CD3 ζ

The association of SAP with the SLAM family of receptors has been extensively described. In our experiments, we show that NTB-A and CD3 ζ precipitate with SAP. The precipitation of CD3 ζ in these experiments could be due to an association of the TCR-CD3 complex with NTB-A at the cell membrane, and, thus, CD3 ζ could be associated with SAP in an indirect manner. In order to study whether the association of SAP with CD3 ζ is direct or indirect, Jurkat T cells were activated with pervanadate and a co-immunoprecipitation assay was performed with an anti-CD3 ζ antibody. The membrane was first subjected to a Far-western assay (also called overlay assay), as described in the material and methods section. This method is a method of choice to determine if an association is direct or not. In our case we can demonstrate that SAP directly interacts with CD3 ζ p20–21 forms, upon stimulation (stars Figure 3A, panel FW: GST-SAP). These p20–21 forms perfectly overlap the phosphorylated forms observed in an anti-phosphotyrosine immunoblot (stars Figure 3A, panel anti-PTyr). In these experiments we observed that SAP may also associate, under stimulation, with the faster migrating p16 CD3 ζ form (arrow Figure 3A, FW GST-SAP and WB CD3 ζ panels). In overexposed anti-phosphotyrosine blots we could detect a faint signal at this 16 kDa position, suggesting that the p16 isoform, although at a low level, is also tyrosine phosphorylated (see Figure S1). Noticeably, we did not detect the p16 form in the non-stimulated sample. This point is important as it also rules out any non-specific binding of our

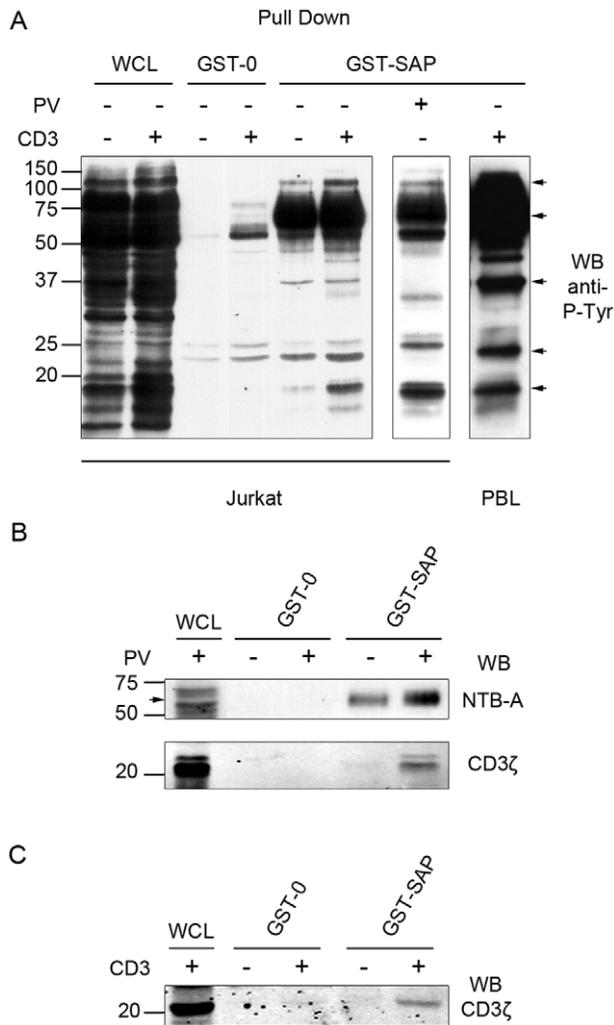


Figure 2. SAP associates with NTB-A and CD3 ζ in activated T lymphocytes. *A*, upper-left panel: Jurkat cells were stimulated or not with the anti-CD3 ϵ mAb UCHT1 for 10 minutes, lysed, precleared and GST or GST-SAP pull down experiments were performed. *Upper-Middle panel*: Jurkat cells were treated with 25 μ M of pervanadate for 30 minutes, lysed, precleared and GST-SAP pull-down was performed as above. *Upper-Right panel*: T-cell blasts were stimulated with UCHT1 for 10 minutes, lysed, precleared and GST-SAP was incubated with cell lysate. Pull downs were immunoblotted with anti-phosphotyrosine (4G10) antibody. *B*, Jurkat cells were either untreated or treated with 25 μ M of pervanadate for 30 minutes, lysed, precleared and GST or GST-SAP were incubated with cell lysates. GST pull downs were immunoblotted for NTB-A or CD3 ζ , as indicated. *C*, T-cell blasts were stimulated or not with UCHT1 for 10 minutes, lysed, precleared and GST or GST-SAP pull downs were performed and immunoblotted for CD3 ζ . These experiments were repeated at least 3 times. The position of NTB-A is indicated by an arrow. doi:10.1371/journal.pone.0043200.g002

fusion protein in the Far-western assay. Also, all the blots were always performed using the same following sequence, FW-GST followed by FW-GST-SAP, followed by immunoblot anti-PTyr and eventually immunoblot anti-CD3 ζ . Furthermore, we show in figure 3B that we can indeed co-immunoprecipitate SAP with an anti-CD3 ζ antibody, which confirms that the SAP/CD3 ζ interaction occurs in vivo and not only in pull down assays. Noticeably, SAP was co-precipitated with CD3 ζ only under stimulation, which would preclude an interaction with the non-

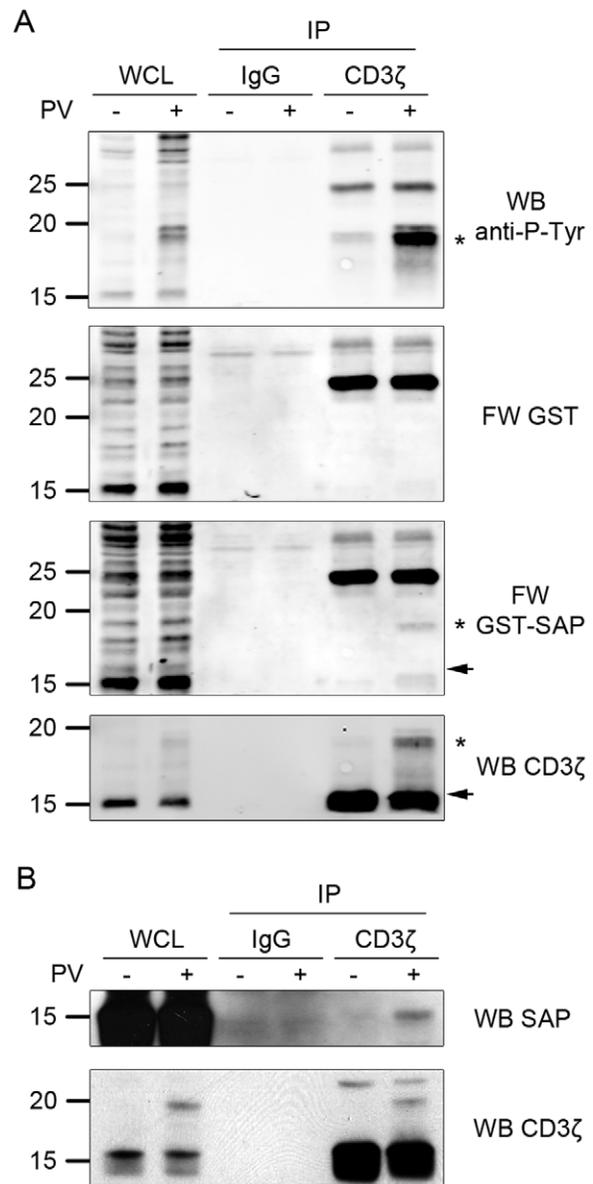


Figure 3. SAP directly associates with phospho-CD3 ζ . *A*, Jurkat cells were untreated or treated with 25 μ M of pervanadate for 30 minutes, lysed and immunoprecipitated with an anti-CD3 ζ antibody. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and transferred, the membranes were subjected to Far-western blotting with GST alone (*panel FW GST*) then GST-SAP fusion protein (*panel FW GST-SAP*), stripped and reprobbed with an anti-phosphotyrosine (4G10) antibody (*upper panel*) and then with an anti-CD3 ζ antibody (*lower panel*). *B*, Jurkat cells were untreated or treated with 25 μ M of pervanadate for 30 minutes, lysed, immunoprecipitated for CD3 ζ and then immunoblotted for SAP (*upper panel*). The equal amount of precipitated CD3 ζ was assessed by an anti CD3 ζ blot (*lower panel*). These experiments were repeated at least 3 times. doi:10.1371/journal.pone.0043200.g003

phosphorylated CD3 ζ form. Altogether, these data demonstrate that SAP directly associates with CD3 ζ in Jurkat cells.

SAP-CD3 ζ interaction is dependent on the first CD3 ζ -ITAM motif

As we demonstrated the direct interaction of SAP with CD3 ζ , mutants of CD3 ζ , in which the cytoplasmic tyrosine residues have

been replaced by phenylalanine residues, were generated by site directed mutagenesis and fused to a myc-tag encoding sequence in a eukaryotic expression plasmid. The tyrosine residues were mutated, one by one or ITAM by ITAM, as schematized in figure 4A. In first instance, and in order not to interfere with the endogenously expressed CD3 ζ , HeLa cells were transfected with these constructs. Forty-eight hours post transfection the cells were stimulated with pervanadate and a GST-SAP pull down assay was performed. The products of the pull down assays were resolved by SDS-PAGE and detected by an anti-myc immuno-blot (figure 4B, upper panel). As shown, CD3 ζ no longer associates with SAP when the first ITAM is mutated (mutant Y72FY83F), whereas the association is not modified when the two other ITAMs are mutated. The apparent molecular weight of CD3 ζ in these experiments appears slightly more important than in figures 2 and 3 because of the presence of a C-terminal Myc/6His tag in these constructs. As shown in figure 4B (middle panel) all the constructs were expressed at comparable amounts in the whole cell lysates. In addition, all the constructs were revealed in an anti-phosphotyrosine blot (Figure 4B, Lower panel), excluding the possibility that a lack of interaction would be due to a lack of global phosphorylation of CD3 ζ .

As SAP contains only one SH2 domain, we tried to further characterize the exact site of interaction within this proximal ITAM. Wild type, single mutant or double mutant forms of CD3 ζ were expressed in HeLa cells treated or not by pervanadate, and the products of a pull down assay were compared (Figure 4C). The equivalent expression of the CD3 ζ proteins and their phosphorylation were verified by anti-CD3 ζ and anti-phosphotyrosine blots, respectively (Figure 4C middle and lower panels). The GST-SAP precipitated CD3 ζ proteins were revealed by an anti-myc immuno-blot (Figure 4C, upper panel). When compared to the WT- CD3 ζ , a single tyrosine mutant can still associate with SAP, although to a much lower extent. This suggests that SAP may associate with both tyrosine residues, independently, and that both residues must be mutated in order to completely abrogate the association with SAP.

Diminished signaling response in T cells in absence of SAP-CD3 ζ association

As we have evidenced a direct association of SAP with CD3 ζ in activated T lymphocytes, we investigated whether we could show an effect of the absence of SAP on the proximal CD3 mediated signaling events. For that purpose we generated H9 cell lines deficient for SAP expression. This was performed through the constitutive expression of Sh-RNA designed to specifically down-modulate the expression of SAP. The cells were selected with the appropriate selection agent and a polyclonal population, that displayed an average 80% down-modulation of SAP expression, was used in our experiments (figure 5A, SAP panel, compare left and right panels). Similar results were obtained with two different Sh-RNA constructs, as specified in the material and methods section. The results shown in figure 5 were obtained with the SAP Sh-A3 and were confirmed with the SAP Sh-A5 (not shown). In order to study proximal signaling events, the cells were stimulated with UCHT-1 for the indicated period of time. At first, we could observe that ZAP 70 phosphorylation, evidenced by a phospho specific antibody, was not modified in cells that do not express SAP (Figure 5A, pZAP70 panel).

Further investigations showed that Δ SAP H9 cells displayed a noticeable and reproducible reduction of both Erk and Akt phosphorylation (figure 5A, pErk and pAkt panels, respectively, compare left and right panels). Similar results were obtained in Sh-SAP expressing Jurkat cells (Not shown). However, as H9 cells are

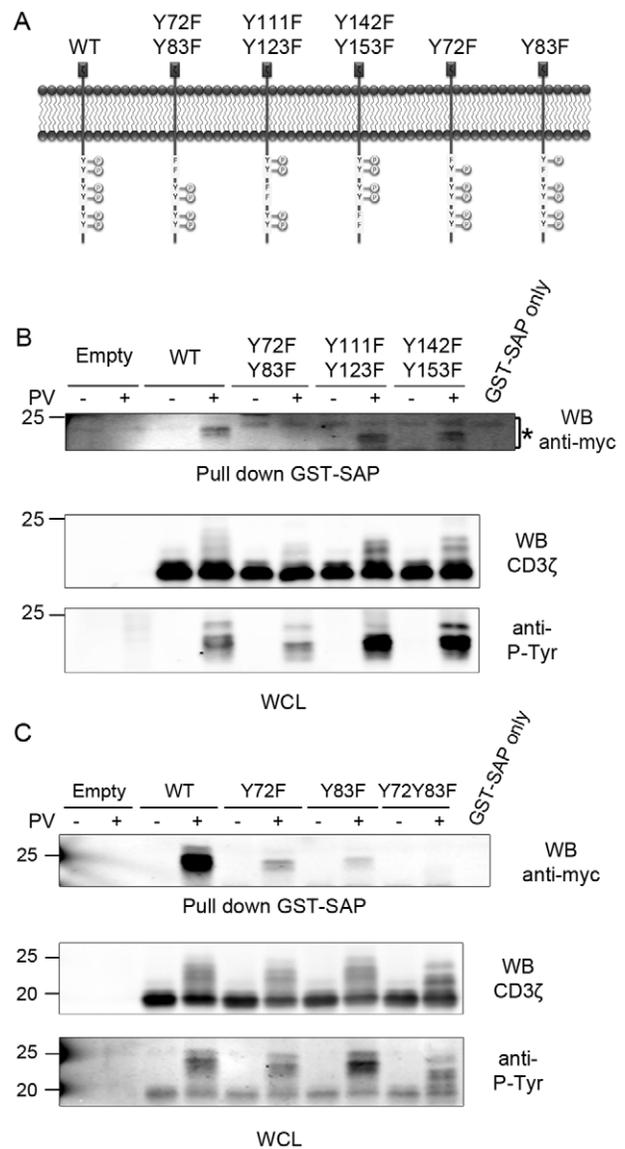


Figure 4. SAP associates with the first CD3 ζ -ITAM motif. *A*, Schematic view of the generated CD3 ζ mutants. *B*, HeLa cells were transfected with either an empty vector, or with myc-CD3 ζ -WT or with mutant myc-CD3 ζ as indicated. Forty-eight hours post-transfection the cells were left untreated or were treated with pervanadate for 10 minutes, lysed, precleared and GST-SAP was incubated with the cell lysates. GST-SAP pull downs were immunoblotted with an anti-Myc (9E10) antibody (upper panel) and lysates were immunoblotted with anti-CD3 ζ and anti-Ptyr antibodies (middle and lower panels, respectively). *C*, HeLa cells were transfected with either an empty vector, or with myc-CD3 ζ -WT or with myc-CD3 ζ - bearing mutations in the first ITAM, and treated as in *B*. This figure is representative of at least three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0043200.g004

known to express both SHIP and PTEN, which is not the case of Jurkat cells, the reduced phosphorylation of Akt was easier to evidence in H9 cells [38]. Similar stimulation assays were performed in the parental Jurkat cell line and in clones that have an Sh-RNA-mediated lower expression level of SAP or CD3 ζ (Δ SAP or Δ ζ respectively). After stimulation, the cells were lysed and subjected to an anti-phosphotyrosine immunoprecipitation. The products were resolved by SDS-PAGE and revealed by

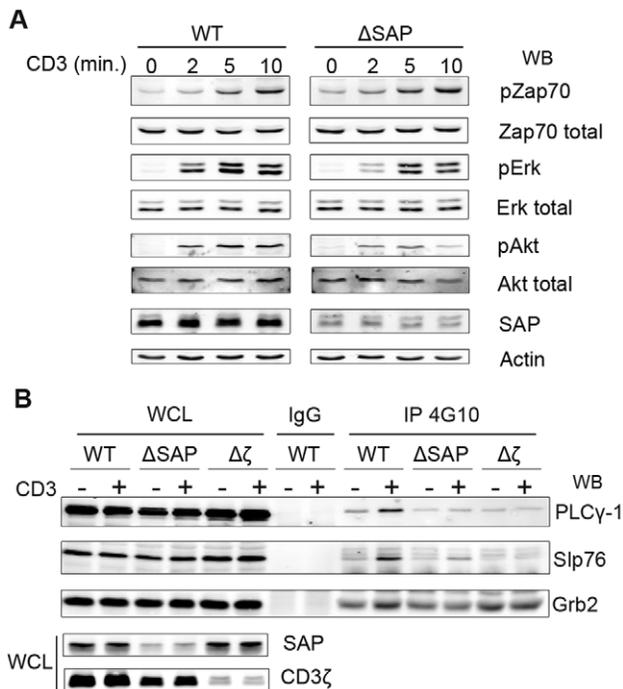


Figure 5. SAP acts in the CD3-mediated activation of Erk, Akt and PLC γ 1 pathways. A, The parental H9 cell (WT) and H9 cells, stably expressing a SAP specific Sh-RNA (Δ SAP), were stimulated with UCHT-1 for the indicated times. 25 μ g of proteins were separated by SDS-PAGE and Zap70, Erk and Akt activations were revealed by Western blotting using specific phospho-antibodies. The total amount of each protein in the lysate was shown for comparison. SAP extinction was controlled by an anti-SAP immunoblotting and equal quantities of proteins in each lane were assessed by an anti-Actin immunoblotting. B, parental Jurkat cells (WT) and Jurkat clones expressing either SAP-targeting or CD3 ζ -targeting Sh-RNAs (Δ SAP and $\Delta\zeta$ respectively) were stimulated or not with UCHT-1 for 10 minutes and lysed. Proteins were immunoprecipitated using a phospho-tyrosine antibody (4G10), separated on SDS-PAGE and transferred. PLC- γ 1, Slp76 and Grb2 were immunoblotted using specific antibodies. This figure is representative of at least eight experiments in different clones and cell lines.
doi:10.1371/journal.pone.0043200.g005

immunoblotting against various signaling molecules known to precipitate or co precipitate in these conditions. In figure 5B we can show that the wild type parental cell line responded nicely to the CD3 stimulation and we could evidence, as expected, a good co precipitation of three major CD3-mediated signaling molecules, namely SLP76, Grb2 and PLC γ 1. As expected, in the cells that do not express CD3 ζ ($\Delta\zeta$), we could barely detect SLP76 and PLC γ 1 in 4G10 IPs. On the contrary, and for reasons that remain unclear, the level of phosphotyrosine associated-Grb2 was constitutively high and did not respond to the stimulation by UCHT1. Interestingly, the Jurkat clones that have a reduced expression level of SAP (Δ SAP) displayed an intermediary pattern, with an important reduction, although not complete, of the 4G10-associated SLP76. More strikingly, the levels of Grb2 and PLC γ 1 were constitutively low and did not increase in response to CD3 stimulation.

As we can evidence a decrease in some signaling events downstream of a TCR-triggering in SAP deficient cells, we sought for a more functional relevance of SAP involvement in this particular cascade. The production of IL-2 and IL-4 is a known functional consequence of the antigen-stimulation of T cells that would eventually lead to Th₂ differentiation [39]. Both cytokines

have been shown to be expressed by CD3/CD28-stimulated Jurkat cells [40]. We used a quantitative PCR method in order to quantitate a possible modulation of IL-2 and IL-4 gene expression in Δ SAP cells compared to wild-type Jurkat cells. The cells were either left untreated or were CD3/CD28-stimulated. RNA was extracted and amplified as described in the material and methods section. In Figure 6, we show that in two different populations of Jurkat cells, independently silenced with two different SAP-targeting Sh-RNAs (Sh-A3 and Sh-A5), the down-modulation of SAP is accompanied by a reduction of the induction of both IL-2 and IL-4 gene expression in response to TCR stimulation. As represented in Figure 6A and 6B, we observed an overall 38% decrease of the induction of IL-2 and IL-4 gene expression, respectively, when the SAP expression is down modulated by about 58% (as represented in Figure 6B).

Altogether our results show that SAP does not modify the activation of a very proximal event such as ZAP70 phosphorylation. However, it plays a role in the activation of canonical signaling pathways such as PLC γ 1, Grb2, Erk and Akt. Furthermore, the absence of SAP expression correlates with a lack of induction of more distal and functional events such as the gene expression of IL-2 and IL-4.

Discussion

In this study we document a novel direct interactor of the CD3 ζ chain, namely the SH2 domain-only molecule SAP. Despite its single SH2 domain structure, SAP has been shown to interact with numerous proteins that mostly belong to the SLAM family of receptors [6,9]. Others have extensively studied the interaction of SAP with the SLAM-CD150 family of proteins.

A full T cell activation requires a signal that is delivered by the TCR-CD3 complex and a co-stimulatory signal from other receptors such as CD28. In addition to CD28, receptors belonging to the ITSM-containing CD150 (SLAM) family have been demonstrated to mediate a co-stimulatory signal. Recent studies have shown that members of this family contain ITSM motifs and thus can associate with SAP and this interaction plays a central role in the co-stimulatory action and regulates some of the TCR-CD3 mediated signaling events. Hence it has been proposed that the XLP associated immune deficiency is due to a lack of T cell activation that would be a consequence of the lack of SAP association with CD150, CD84, NTB-A, CD244 and CD229.

Data obtained by others, in T cells from XLP patients, have suggested that SAP may play a direct role in the TCR-CD3 mediated signal [34]. Through a non-elucidated mechanism, these authors demonstrate that a default of SAP expression is accompanied by a default of activation of some canonical signaling pathways, such as Erk and Vav phosphorylation.

Our work provides a mechanism for the function of SAP in the TCR-CD3 activatory signaling. In the present paper, we show that, in activated T cells, SAP interacts with NTB-A, a CD150 (SLAM) family member, as well as with the CD3 ζ chain. We demonstrate that the CD3 ζ -SAP interaction requires the first ITAM motif in the cytoplasmic tail of CD3 ζ . Furthermore, by the mean of Far Western blotting, we show that this interaction is direct. Additionally, we can exclude the possibility that the interaction between SAP and CD3 ζ would be mediated, in co-immunoprecipitation experiments, through NTB-A. Indeed, we can evidence this interaction in HeLa and Kit-225 cell lines that do not express NTB-A. Altogether, these observations confirm that the SAP-CD3 ζ association described in this paper is not mediated by NTB-A.

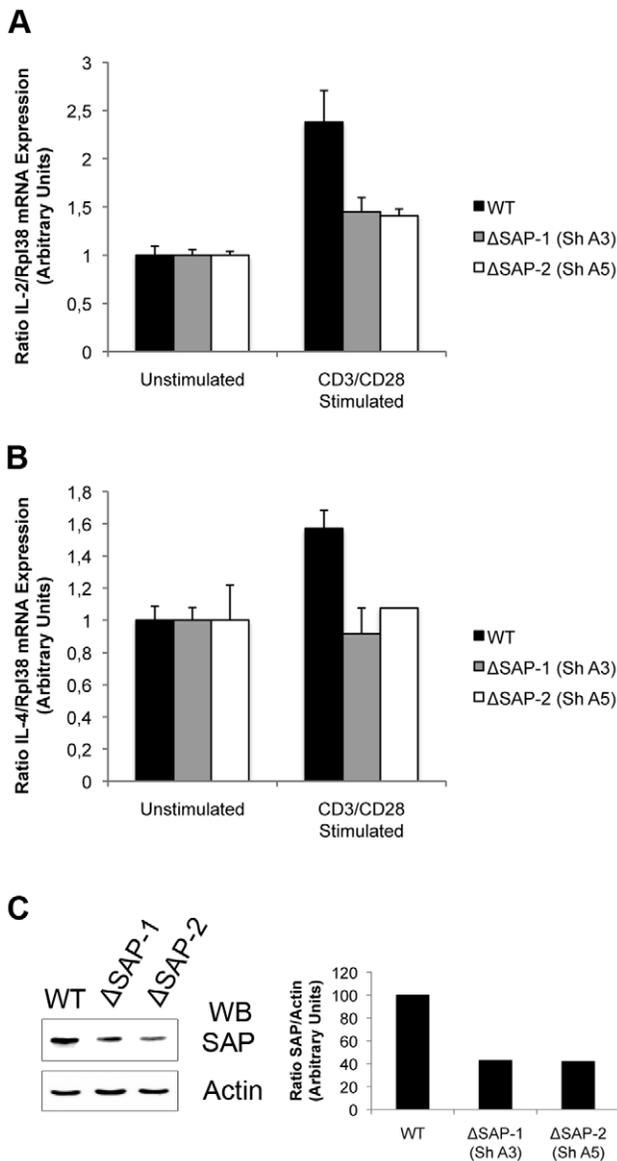


Figure 6. SAP-silencing down-modulates IL-2 and IL-4 gene expression in Jurkat cells.

A and B, The Jurkat parental cell (WT) and two clones (Δ SAP-1 and Δ SAP-2), stably expressing two different SAP specific Sh-RNAs (Sh-A3 and Sh-A5 respectively), were stimulated by CD3/CD28 for 60 min for IL-2 (*A*) or 30 min for IL-4 (*B*). Quantitative RT-PCR was performed for IL-2 (*A*) and IL-4 (*B*) gene expression. Results were normalized to the ribosomal protein, Rpl38, gene expression. Data shown are representative of two independent experiments. *C*, Whole cell lysates of the Jurkat parental cell (WT) and the two clones Δ SAP-1 and Δ SAP-2 were resolved by SDS-PAGE and SAP extinction was controlled by an anti-SAP immunoblotting. Equal amount of proteins in each lane were assessed by an actin-immunoblotting. Each band was numerically quantitated (indicated in arbitrary units, a.u.) and the SAP/Actin ratio for each cell population is graphically presented (normalized to 100% in Jurkat WT). doi:10.1371/journal.pone.0043200.g006

To our knowledge, this is the first demonstration that SAP interacts with CD3 ζ , directly, and that by such an association it directly plays a function in the TCR-CD3 mediated signaling (i.e. not through SLAM receptors). We demonstrate that, when the expression of SAP is down modulated, the phosphorylation of Erk and of Akt is diminished. These results suggest that the function of

SAP is to favor the activation of the Erk and Akt pathways downstream of ZAP70 activation. In agreement with our results, and while this manuscript was in revision, Baldanzi et al, with one of the Sh-RNA construct used in the present study (clone ID TRCN0000082712), showed that the down-modulation of SAP in Jurkat cells leads to a decreased Erk activation in response to a CD3-CD28 stimulation [41]. We show that in absence of SAP the PLC γ 1 protein is not recruited anymore to phosphorylated complexes. This observation could confirm that SAP may inactivate DGK α through the activation of PLC γ 1, as suggested by Baldanzi et al.

Whether SAP functions downstream of ZAP70 or independently of ZAP70 is still a matter that we were not able to address. Altogether our data partly confirm the results obtained by Nakamura *et al.* in HVS-transformed cells from XLP patients [42]. However, these authors described an increase of CD3 ζ and ZAP70 phosphorylation. These discrepancies might be explained by the facts that the patient cells used in their studies were virally transformed and probably in a constitutively activated state. Interestingly the p75 SAP-associated protein described by Nakamura et al. is most probably the NTB-A protein that we identified in the present work.

We provide evidence that in absence of SAP the recruitment of PLC γ 1, Grb2 and SLP76 to phosphotyrosine containing complexes is largely impaired. Additionally we show that the silencing of SAP expression leads to a noticeable down-modulation of IL-2 and IL-4 gene induction, as assessed by quantitative PCR. Altogether, our results demonstrate that SAP directly plays a central function in T cell activation. We have shown that in absence of SAP, the global phosphorylation of ZAP70 remains unchanged when compared to non-modified cells (Figure 5). It would then be of great interest to determine which proximal event is affected by the absence of SAP in the CD3 mediated signaling events.

Also we performed similar experiments in CD3 ζ depleted Jurkat cells re-expressing the various ITAM mutants as described in figure 4 (data not shown). In these cells we did not evidence any dramatic modification of the studied signaling events. This observation would suggest that, in agreement with Malissen *et al.*, when CD3 ζ ITAM motifs are crippled some other CD3 components (i.e. CD3 ϵ or CD3 γ) may participate in the activation events [43]. This could also be true for SAP, and it may be recruited to another component when CD3 ζ is not functional.

The SAP protein has been demonstrated to bind to a consensus sequence T/SxYxxV/I/L, named ITSM that is present in all the SLAM family of receptors [44]. We have identified the site of interaction of SAP on the first ITAM motif of CD3 ζ . This is a strict consensus sequence for an ITAM motif, and it does not present the canonical structure of an ITSM, with a T or S in “-2” from the Y residue.

Thus we provide evidence that, *in-vivo*, SAP may also bind to structures other than ITSM motifs. Li et al showed that the SAP SH2 domain is very flexible and that it adopts a different structure according to the sequence of the peptide it complexes with. Furthermore, Li et al showed that SAP displays various relative affinities depending on the type of interaction it can make with its target motifs [45]. Accordingly, they evidenced that the lowest relative affinity is obtained between the SAP-SH2 domain and a conventional “two-pronged” YxxV/I consensus motif. Thus, our results confirm that SAP may behave as a conventional SH2 domain bearing protein. However, the fact that this interaction may be of a much lower affinity may explain why it has not been described earlier and was probably masked by the association with SLAM family receptors. Additionally, we have shown in a Far-

Western assay that SAP almost exclusively binds directly and in an inducible manner to the phosphorylated p21 form of CD3 ζ (see figure 3A, stars). These various phosphorylated forms of CD3 ζ have been described in the past and are regularly observed [46]. However, we could also detect a slight association of SAP with a p16 form of CD3 ζ , under stimulation. We have observed that this form is slightly phosphorylated (see Figure S1) and also we may favor such an interaction in vitro on a denatured CD3 ζ . In conclusion, we show that SAP interacts in an inducible manner with the phosphorylated CD3 ζ chain, this could make the difference between an ITSM and an ITAM motif, and only an ITSM motif would allow a constitutive interaction with SAP whereas an ITAM needs to be phosphorylated. Furthermore, all the three ITAMs contained in the cytoplasmic tail of CD3 ζ present a similar consensus sequence. It is thus tempting to speculate that either a conformational event or the occupation of the other ITAM motifs by other signaling molecules renders only the first ITAM accessible for SAP binding. However this observation broadens the possible function of ITAM motifs, as it has been suggested they may already overlap the functions of ITIM motifs thus being called inhibitory ITAMs [47,48].

Our study confirms that SAP plays a major role in the regulation of signaling events that control the activation of T lymphocytes. Of note, the results presented here may highlight only a partial image of the function played by SAP in the TCR signaling. SAP has been shown to associate with other partners, through a R78/SH3 interaction, as it does with Fyn. Among these partners are PKC θ and β Pix that have been shown to play important function in T cell signaling. It is indeed tempting to speculate that the function of SAP would be to bring additional partners, such as Fyn or PKC θ , in proximity of the CD3 complex. An association of SAP with Fyn could be confirmed in our investigations (not shown) and it would probably be of interest to further decipher the signalosome that is brought to the TCR through its direct interaction with SAP. It is interesting to note that, in our cellular model, SAP associates with NTB-A and CD3 ζ and seems to participate in proliferation and survival mechanisms. It has been proposed in the past that IL-2 signaling could propagate signals that uncouple the TCR from the CD3 complex and therefore modify the ability of the cells to respond through the full TCR/CD3 complex [49]. It is thus possible that in response to some stimuli (i.e. IL-2), these interactions would be modified and the cells would respond differently to a re-stimulation of their TCR complex leading to an apoptotic signal as recently reported by Snow et al [50].

While this manuscript was in preparation Bida et al showed that 2B4 (a member of the CD150-SLAM family) uses ITAM containing molecules, such as CD3 ζ , to initiate signaling [51].

References

- Morra M, Howie D, Grande MS, Sayos J, Wang N, et al. (2001) X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* 19: 657–682.
- Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, Oohashi T, Howell GR, et al. (1998) Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* 20: 129–135.
- Nichols KE, Harkin DP, Levitz S, Krainer M, Kolquist KA, et al. (1998) Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13765–13770.
- Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, et al. (1998) The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395: 462–469.
- Purtulo DT, Cassel CK, Yang JP, Harper R (1975) X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1: 935–940.
- Detre C, Keszei M, Romero X, Tsokos GC, Terhorst C (2010) SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin Immunopathol* 32: 157–171.
- Ma CS, Nichols KE, Tangye SG (2007) Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* 25: 337–379.
- Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL (2009) SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 9: 39–46.
- Veillette A (2010) SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a002469.
- Veillette A, Dong Z, Perez-Quintero LA, Zhong MC, Cruz-Munoz ME (2009) Importance and mechanism of 'switch' function of SAP family adaptors. *Immunol Rev* 232: 229–239.
- Shlapatska LM, Mikhalap SV, Berdova AG, Zelensky OM, Yun TJ, et al. (2001) CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol* 166: 5480–5487.
- Cannons JL, Wu JZ, Gomez-Rodriguez J, Zhang J, Dong B, et al. (2010) Biochemical and genetic evidence for a SAP-PKC-theta interaction contributing to IL-4 regulation. *J Immunol* 185: 2819–2827.

However, through co-immunoprecipitation experiments they did not demonstrate that SAP directly interacts with CD3 ζ , and it could not be excluded that the SAP-CD3 ζ occurs through the interaction with a common partner. Also, they showed that SAP could be constitutively co-precipitated with CD3 ζ in NK cells. These results are in agreement with our observation, however it seems that this interaction is more inducible in T cells. The observation by Bida *et al.* reinforces the idea that SAP, through its interaction with CD3 ζ , may play a more general role in the activation of cells using CD3 ζ -ITAMs. The association and the functions of SAP that are shown in the present study would be worth being investigated in other cell types using CD3 ζ -ITAM signaling such as NK or B cells expressing CD16-CD3 ζ complexes.

Our data suggest that SAP plays a complex role that cannot exclusively be related to its association with the SLAM family members. Supporting this idea are the recently published data by Li *et al.* [52] that showed that SAP associates with FC γ RIIB in B-lymphocytes and by recruiting Lyn kinase plays an inhibitory function in B cell signaling. It is also possible that this interaction of SAP with CD3 ζ may be crucial for the development and function of NKT cells that have been shown to be absent in XLP1 patients or in SAP deficient mice.

Supporting Information

Figure S1 CD3 ζ migrates as several phosphorylated bands upon pervanadate treatment. Jurkat cells were left untreated or were treated with pervanadate for 30 minutes. Cells were lysed and immunoprecipitates were performed, washed and resolved as described in the material and methods section. After transfer, the membrane was first immunoblotted with an anti-PTyr antibody (upper panel). The presence of CD3 ζ was checked by an anti-CD3 ζ immunoblot (lower panel). Arrows indicate all the CD3 ζ forms. (TIF)

Acknowledgments

The authors wish to thank, A. Trautmann, G. Bismuth and A. Herbelin for their helpful discussions and critical reading of the manuscript and P. Mauduit for his technical advice on qPCR.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RP JB FG. Performed the experiments: RP FG. Analyzed the data: RP JB FG. Contributed reagents/materials/analysis tools: RP JB FG. Wrote the paper: FG.

13. Gu C, Tangye SG, Sun X, Luo Y, Lin Z, et al. (2006) The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP associates with PAK-interacting exchange factor and participates in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14447–14452.
14. Latour S, Roncagalli R, Chen R, Bakinowski M, Shi X, et al. (2003) Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 5: 149–154.
15. Li C, Schibli D, Li S (2009) The XLP syndrome protein SAP interacts with SH3 proteins to regulate T cell signaling and proliferation. *Cellular Signalling* 21: 111–119.
16. Al-Alem U, Li C, Forey N, Relouzat F, Fondaneche MC, et al. (2005) Impaired Ig class switch in mice deficient for the X-linked lymphoproliferative disease gene Sap. *Blood* 106: 2069–2075.
17. Ostrakhovitch EA, Wang Y, Li SS (2009) SAP binds to CD22 and regulates B cell inhibitory signaling and calcium flux. *Cell Signal* 21: 540–550.
18. Pasquier B, Yin L, Fondaneche MC, Relouzat F, Bloch-Queyrat C, et al. (2005) Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* 201: 695–701.
19. Chung B, Aoukaty A, Dutz J, Terhorst C, Tan R (2005) Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *J Immunol* 174: 3153–3157.
20. Nichols KE, Hom J, Gong SY, Ganguly A, Ma CS, et al. (2005) Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* 11: 340–345.
21. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS (2009) T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27: 591–619.
22. Wegener AM, Letourneur F, Hoeveler A, Brocker T, Luton F, et al. (1992) The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 68: 83–95.
23. Irving BA, Chan AC, Weiss A (1993) Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* 177: 1093–1103.
24. Irving BA, Weiss A (1991) The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64: 891–901.
25. Kolantus W, Romeo C, Seed B (1993) T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 74: 171–183.
26. Weiss A, Irving BA, Tan LK, Koretzky GA (1991) Signal transduction by the T cell antigen receptor. *Semin Immunol* 3: 313–324.
27. Abraham RT, Weiss A (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* 4: 301–308.
28. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A (1992) ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71: 649–662.
29. Houtman JC, Houghtling RA, Barda-Saad M, Toda Y, Samelson LE (2005) Early phosphorylation kinetics of proteins involved in proximal TCR-mediated signaling pathways. *J Immunol* 175: 2449–2458.
30. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92: 83–92.
31. Murphy MA, Schnell RG, Venter DJ, Barnett L, Bertonecello I, et al. (1998) Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol Cell Biol* 18: 4872–4882.
32. Reif K, Gout I, Waterfield MD, Cantrell DA (1993) Divergent regulation of phosphatidylinositol 3-kinase P85 alpha and P85 beta isoforms upon T cell activation. *J Biol Chem* 268: 10780–10788.
33. Secrist JP, Karnitz L, Abraham RT (1991) T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. *J Biol Chem* 266: 12135–12139.
34. Sanzane S, Zeyda M, Saemann MD, Soncini M, Holter W, et al. (2003) SLAM-associated protein deficiency causes imbalanced early signal transduction and blocks downstream activation in T cells from X-linked lymphoproliferative disease patients. *J Biol Chem* 278: 29593–29599.
35. Gesbert F, Guenzi C, Bertoglio J (1998) A new tyrosine-phosphorylated 97-kDa adaptor protein mediates interleukin-2-induced association of SHP-2 with p85-phosphatidylinositol 3-kinase in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 273: 18273–18281.
36. Secrist JP, Burns LA, Karnitz L, Koretzky GA, Abraham RT (1993) Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. *J Biol Chem* 268: 5886–5893.
37. Romero X, Benitez D, March S, Vilella R, Miralpeix M, et al. (2004) Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAMF6), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens* 64: 132–144.
38. Astoul E, Edmunds C, Cantrell DA, Ward SG (2001) PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. *Trends Immunol* 22: 490–496.
39. Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A (2006) Regulation of Th2 differentiation and I14 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 24: 607–656.
40. Li-Weber M, Giaisi M, Treiber MK, Krammer PH (2002) The anti-inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide suppresses IL-4 gene expression in peripheral blood T. *Eur J Immunol* 32: 3587–3597.
41. Baldanzi G, Pighini A, Bettio V, Rainero E, Traini S, et al. (2011) SAP-Mediated Inhibition of Diacylglycerol Kinase alpha Regulates TCR-Induced Diacylglycerol Signaling. *J Immunol* 187: 5941–5951.
42. Nakamura H, Zarycki J, Sullivan JL, Jung JU (2001) Abnormal T cell receptor signal transduction of CD4 Th cells in X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol* 167: 2657–2665.
43. Ardouin L, Boyer C, Gillet A, Trucy J, Bernard AM, et al. (1999) Crippling of CD3-zeta ITAMs does not impair T cell receptor signaling. *Immunity* 10: 409–420.
44. Hwang PM, Li C, Morra M, Lillywhite J, Muhandiram DR, et al. (2002) A “three-pronged” binding mechanism for the SAP/SH2D1A SH2 domain: structural basis and relevance to the XLP syndrome. *Embo J* 21: 314–323.
45. Li SC, Gish G, Yang D, Coffey AJ, Forman-Kay JD, et al. (1999) Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A. *Curr Biol* 9: 1355–1362.
46. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A (1991) The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9166–9170.
47. Pinheiro da Silva F, Aloulou M, Benhamou M, Monteiro RC (2008) Inhibitory ITAMs: a matter of life and death. *Trends Immunol* 29: 366–373.
48. Waterman PM, Cambier JC (2010) The conundrum of inhibitory signaling by ITAM-containing immunoreceptors: potential molecular mechanisms. *FEBS Lett* 584: 4878–4882.
49. Haughn L, Leung B, Boise L, Veillette A, Thompson C, et al. (1998) Interleukin 2-mediated uncoupling of T cell receptor alpha/beta from CD3 signaling. *J Exp Med* 188: 1575–1586.
50. Snow AL, Marsh RA, Krummey SM, Roehrs P, Young LR, et al. (2009) Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest* 119: 2976–2989.
51. Bida AT, Upshaw Neff JL, Dick CJ, Schoon RA, Brickshawana A, et al. (2011) 2B4 utilizes ITAM-containing receptor complexes to initiate intracellular signaling and cytolysis. *Mol Immunol* 48: 1149–1159.
52. Li C, Chung B, Tao J, Iosef C, Aoukaty A, et al. (2008) The X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP regulates B cell function through the Fc γ RIIB receptor. *Cellular Signalling* 20: 1960–1967.

Supplementary Information

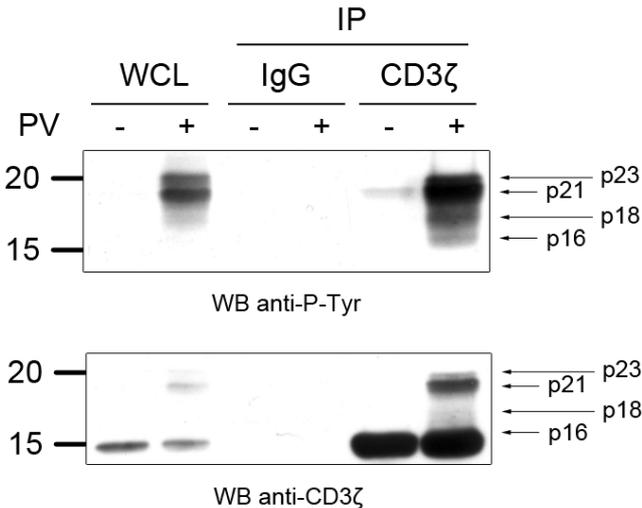


Figure S1. CD3ζ migrates as several phosphorylated bands upon pervanadate treatment. Jurkat cells were left untreated or were treated with pervanadate for 30 minutes. Cells were lysed and immunoprecipitates were performed, washed and resolved as described in the material and methods section. After transfer, the membrane was first immunoblotted with an anti-P-Tyr antibody (upper panel). The presence of CD3ζ was checked by an anti-CD3ζ immunoblot (lower panel). Arrows indicate all the CD3ζ forms.

L'adhésion des lymphocytes T médiée par Pecam-1 est régulée par son association avec la protéine adaptatrice SAP.

Richard Proust¹, Catherine Crouin², Jacques Bertoglio², Franck Gesbert¹

¹INSERM UMR-S1004, Université Paris Sud, Hôpital Paul Brousse, 94807 Villejuif.

²INSERM UMR-S749, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif.

INTRODUCTION

L'inflammation est une réaction complexe mise en place en réponse aux dommages des tissus ou aux infections. Les réponses inflammatoires sont protectives et concernent à la fois les acteurs du système immunitaire inné et adaptatif. Cependant, des réactions inflammatoires dérégulées conduisent à l'apparition de pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux, la sclérodermie ou des vascularites...

Les réponses inflammatoires sont caractérisées par deux étapes principales : d'une part par une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'autre part par la migration, l'accumulation et l'activation de leucocytes au niveau du site inflammatoire. La variation de la perméabilité vasculaire et le recrutement des leucocytes dépendent des communications intercellulaires médiées par les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) entre les cellules endothéliales adjacentes et entre les cellules endothéliales et les leucocytes. Les interactions médiées par les CAM permettent l'infiltration des leucocytes au niveau du site inflammatoire et induisent la libération de cytokines pro-inflammatoires qui activent à la fois les cellules endothéliales et les leucocytes et qui sont également importantes pour la maintenance des fonctions de la barrière vasculaire. Pecam-1 est une de ces molécules d'adhésion dont la fonction est la régulation des réponses inflammatoires.

Pecam-1 est une molécule d'adhésion faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. Pecam-1 est exprimée dans la plupart des cellules de la lignée hématopoïétique et plus particulièrement dans les plaquettes, les monocytes, les

neutrophiles et quelques sous populations de lymphocytes T (Newman and Newman, 2003). Pecam-1 est aussi fortement exprimée par les cellules endothéliales où c'est un constituant majeur des jonctions intercellulaires (Albelda et al., 1990; Muller et al., 1989; Newman et al., 1990).

Pecam-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 constituée d'une région extracellulaire composée de six domaines de type immunoglobuline, d'une région transmembranaire de 19 acides aminés et d'une queue cytoplasmique de 118 acides aminés (Newman and Newman, 2003). Le domaine N-Terminal de type Ig permet les associations homotypiques Pecam-1/Pecam-1 alors que les domaines de type Ig 5 et 6 proximal de la membrane modulent des interactions hétérotypiques. Deux molécules ont été décrites comme associant Pecam-1 de façon hétérotypique et dont les interactions ont été montrées physiologiquement pertinentes. Ces deux molécules sont CD177 (NB1), un antigène exprimé exclusivement sur les neutrophiles, et CD38, exprimé sur les lymphocytes T et B ainsi que sur les cellules NK (Deaglio et al., 1998; Sachs et al., 2007).

La partie cytoplasmique de Pecam-1 contient des résidus qui sont des sites potentiels de palmitoylation, de phosphorylation et d'accrochage pour des molécules de signalisation cytosoliques (Newman and Newman, 2003). Plus particulièrement, Pecam-1 possède deux tyrosines intracellulaires Y663 et Y686 qui composent deux motifs ITIM et qui, lors de l'engagement de Pecam-1, sont phosphorylées et recrutent la tyrosine phosphatase Shp-2 (Newman and Newman, 2003). Il a également été montré que les tyrosines kinases Src et Fyn, les phosphatases Shp-1, et SHIP-1 ainsi que la PLC- γ 1 peuvent associer Pecam-1 phosphorylée (Henshall et al., 2001; Lu et al., 1997; Masuda et al., 1997; Pumphrey et al., 1999).

Pecam-1 a tout d'abord été montrée comme ayant une fonction pro-inflammatoire en ayant un rôle crucial dans la transmigration des leucocytes au niveau du site inflammatoire (Muller et al., 1993; Vaporciyan et al., 1993). En effet, Pecam-1 promeut le chimiotactisme des leucocytes en augmentant la polymérisation d'actine, l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales par ses interactions homotypiques, l'activation des intégrines sur les leucocytes et son recyclage à la surface des cellules endothéliales (Privratsky et al., 2010).

Pecam-1 possède également une fonction anti-inflammatoire en recrutant des phosphatases sur les tyrosines phosphorylées des motifs ITIM, ce qui a été montré

comme diminuant l'activation des leucocytes. Pecam-1 diminue également la production de cytokines pro-inflammatoires et restaure l'intégrité de la barrière vasculaire (Ferrero et al., 1995; Newton-Nash and Newman, 1999; Rui et al., 2007; Wilkinson et al., 2002; Wong et al., 2002).

Cependant, les mécanismes régulant les fonctions pro et anti-inflammatoires de Pecam-1 ne sont pas encore très bien connus. Dans cette étude, nous avons découvert grâce au criblage d'une banque d'ADNc de lymphocytes T humains activés par double hybride conditionnel dans la levure que la protéine adaptatrice SAP interagit avec Pecam-1. Nous avons caractérisé cette interaction et avons démontré que SAP interagit directement avec la tyrosine Y686 phosphorylée de Pecam-1. Enfin, nous avons démontré qu'en absence de SAP, l'adhésion médiée par Pecam-1 des lymphocytes T est diminuée.

MATERIELS ET METHODES

Anticorps et réactifs

Les réactifs chimiques proviennent de chez Sigma (Lyon, France) ou Euromedex (Souffelweyersheim, France). Le réactif de transfection Fugene provient de chez Promega (Charbonnières, France).

Les anticorps anti-Pecam-1 C20-R et anti-Myc (9E10) proviennent de chez Santa Cruz (TEBU, Le Perray en Yvelines, France), l'anti-phosphotyrosine 4G10 vient de chez Upstate Biotechnology (Millipore, Molsheim, France), l'anti-CD31 clone B-B38 provient de chez Diaclone (Abcys, Les Ulis, France) et l'anti-GST est de chez MBL (Clinisciences, Nanterre, France).

Lignées Cellulaires, Stimulations et Transfections

Les cellules Jurkat, une lignée de lymphocytes T issue de leucémie lymphoblastique aigüe (ATCC, TIB-152) et les cellules H9 (ATCC, HTB-176), un clone de la lignée Hut-78 issue d'une leucémie T, sont cultivées dans du milieu RPMI en présence de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et maintenues en culture à 37°C et 5% de CO₂.

Pour les expériences de stimulation, les cellules Jurkat sont sevrées OVN dans du RPMI 1% BSA. Pour les stimulations au pervanadate les cellules sont resuspendues à 2.10⁷/mL et incubées ou non avec 25 µM de pervanadate pendant 30 min. Pour les

expériences d'agrégation de Pecam-1, les cellules Jurkat sont resuspendues à 4.10^7 /mL dans du RPMI froid et incubées avec 25 μ g/mL d'anti-CD31 B-B38 pendant 30 min. Après 2 lavages avec du PBS froid, les cellules sont resuspendues à 4.10^7 /mL dans du PBS puis incubées avec 50 μ g/mL de GAM Fab'₂ pendant 10 min à 4°C puis 10 min à 37°C. Toutes les stimulations sont arrêtées par 2 lavages en PBS froid puis les cellules sont lysées comme décrit ci-dessous.

Les cellules HeLa (ATCC, CCL-2) sont maintenues en culture dans du milieu DMEM (PAA, Les Mureaux, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Les transfections s'effectuent en utilisant le réactif Fugene 6 suivant le protocole du fabricant.

Plasmides, Construction et Mutagenèse Dirigée

Pour le double-hybride, la séquence codante pour SAP ou ses différents mutants est insérée dans le vecteur pLexA. Une banque d'ADNc de lymphocytes T humains activés a été inséré dans le vecteur pGad.

La séquence codante pour Pecam-1 humain a été clonée par PCR en utilisant la paire d'oligonucléotides suivants : 5'-GCAAGCTTATGCAGCCGAGGTG-3' et 5'-GCGATATCAGTTCCATCAAGGGAGCCTTCC-3' et insérée dans le vecteur d'expression pEF6-Myc. Les mutants Pecam-1Y-F ont été produits avec le kit QuickChange® II-E Site-Directed Mutagenesis de chez Stratagène (Amsterdam, Pays-Bas) suivant le protocole du fabricant. Les oligonucléotides suivants ont été utilisés pour produire chaque mutant :

	Sens	Antisens
Pecam-1 Y663F	5'-CAGACGTGCAGTTCACGGAAGTTCA-3'	5'-TGAACCTCCGTGAACTGCACGTCTG-3'
Pecam-1 Y686F	5'-CAGAGACAGTGTTCAGTGAAGTCCG-3'	5'-CGGACTTCACTGAACACTGTCTCTG-3'

Toutes les PCR ont été réalisées avec des ADN polymérases de haute fidélité (NEB, Ipswich, MA) et vérifiées par séquençage.

Immunoprécipitation, Pêche GST et Western-blot

Les cellules sont lysées en tampon de lyse froid (50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA et 0,5% Triton X-100) supplémenté avec 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ et un cocktail d'inhibiteurs de protéases au 1/100. Le culot nucléaire et les débris sont retirés par centrifugation à 17.10^3 g pendant 20 min à 4°C.

Pour les immunoprécipitations, une quantité équivalente de protéines du lysat cellulaire est incubée avec 1 µg d'anticorps spécifiés pendant 2h à 4°C sur roue. Les billes de protéines G sont ajoutées aux complexes immuns pendant 45 min à 4°C sur roue, lavées 5 fois dans du tampon de lyse froid puis bouillies pendant 5 min dans un volume équivalent de tampon Laemmli.

Pour les expériences de pêches, 2 µg de protéines de fusion GST ou GST-SAP sont ajoutés aux lysats pré-lavés pendant 2h à 4°C sur roue. 20 µL de billes sépharose couplées à la glutathion sont ajoutées pendant 45 min à 4°C sur roue puis les billes sont lavées 5 fois et bouillies dans du tampon Laemmli.

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide et transférées sur une membrane PVDF. Les membranes sont bloquées pendant 2h dans du TBS-T (TBS/Tween 20 0,2%) avec 5% de BSA avant incubation avec les anticorps primaires et secondaires spécifiques dilués dans du TBS-T. Les membranes sont lavées et la révélation des protéines s'effectue avec l'utilisation des réactifs Lycor et le système d'imagerie Odyssey.

Far-Western

Les protéines sont immunoprécipitées, séparées et transférées sur une membrane PVDF comme décrit ci-dessus. La membrane est incubée avec les protéines de fusion GST ou GST-SAP à 1 µg/mL dans du TBS-T pendant 90 min puis lavée 5 fois et la protéine de fusion est révélée par un western blot classique avec un anti-GST comme décrit ci-dessus.

Double-Hybride et Tests β -Galactosidase sur Filtres

Les levures sont transformées par la méthode d'acétate de lithium. La souche TAT7 de *Saccharomyces cerevisiae* (*MATa, his3 leu2 trp1 ade2 LYS2::lex(op)-HIS3 ura3::lex(op)-LacZ*) a été transformée soit avec les constructions pLex ou pGad ou les deux puis les levures sont sélectionnées sur le milieu approprié (-Trp et/ou -Leu). Pour l'expression de la kinase Lyn, les levures TAT7 sont conjuguées avec la souche de levure W303-1 *A/D* (*MAT α his3 leu2 trp1 ade2 ura3*) transformée avec le pMET416-Lyn ou le pMET416 vide qui contient le marqueur de sélection URA3. Après une conjugaison OVN dans du milieu YPDA, les levures sont étalées sur boîtes manquant Ura, Trp et Leu pour la sélection des diploïdes.

Pour les tests β -galactosidase sur filtres, les levures sont étalées sur du papier filtre Whatman 40 préalablement déposé sur un milieu agar sélectif puis incubées à 30°C pendant 24h. Après congélation à l'azote liquide, les filtres sont étalés sur un papier filtre Whatman 3 humidifié dans du tampon Z (50 mM Na₃PO₄, pH 7.0, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄) supplémenté avec 0,5% β -Mercaptoéthanol et 0,2 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal). Après 4h d'incubation à 30°C, la réaction est stoppée en transférant les filtres dans une solution de Na₂CO₃ à 1M.

Test d'adhérence

Pour les tests d'adhérence, les puits de plaques 96 puits sont coâtés avec 20 μ g/mL d'anticorps spécifiés en présence ou non de 5 μ g/mL de fibronectine ou de PBS OVN. Après 3 lavages des puits au PBS, 50.10³ cellules par puits sont incubées pendant 20 min à 37°C. Les puits sont lavés 3 fois en PBS et l'adhérence des cellules est quantifiée par dosage colorimétrique par ajout de WST-1 (Roche, Mannheim, Allemagne) dilué dans du milieu RPMI suivant les conditions du fabricant. Après une incubation d'1h à 37°C, l'absorbance est mesurée sur un lecteur microplaques STAT FAX 2100.

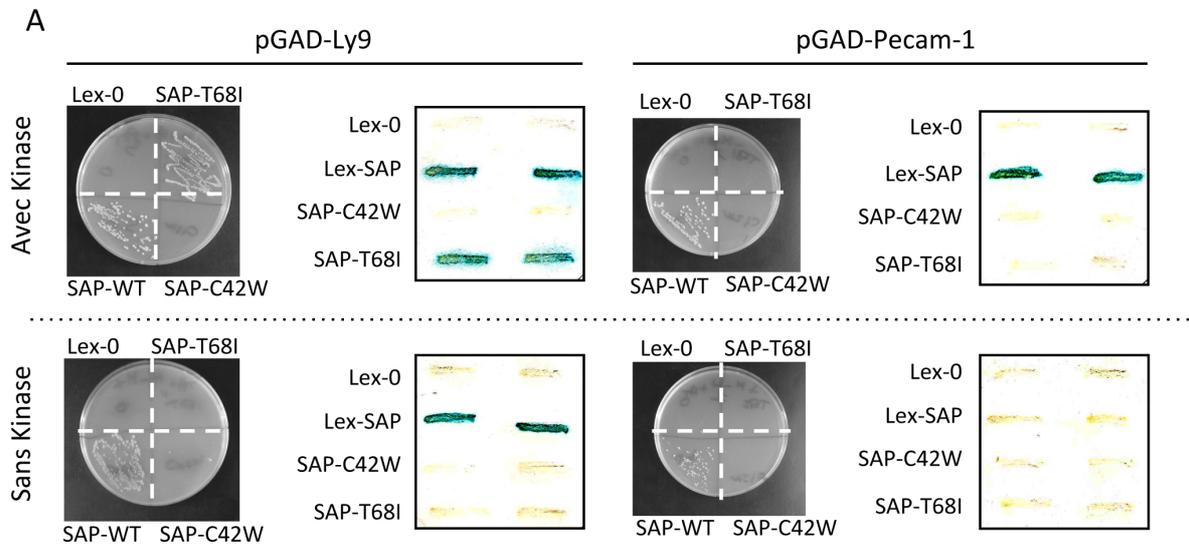
RÉSULTATS

Identification de Pecam-1 comme partenaire de SAP par double-hybride.

Dans le but de découvrir de nouveaux partenaires pour la protéine SAP, nous avons effectué le criblage d'une banque d'ADNc de lymphocytes humains activés par double hybride conditionnel dans la levure en utilisant la protéine SAP comme appât. Comme la protéine SAP n'est composée que d'un domaine SH2, nous recherchons donc des partenaires phosphorylés sur des résidus tyrosine. Nous avons utilisé une technique de double hybride conditionnel dans lequel nous avons ré-exprimé le domaine kinase de la tyrosine kinase Lyn sous un promoteur inductible par la méthionine. Cette technique de double hybride conditionnel a déjà été utilisée dans le laboratoire avec succès (Crouin et al., 2001). Parmi les résultats obtenus, deux ADNc semblent intéressants. Tout d'abord, nous avons révélé l'interaction de SAP avec Ly9, un récepteur de la famille SLAM. Cette interaction est déjà connue mais elle nous a permis de valider le double-hybride. Nous observons une activité de la β -galactosidase, dépendante de l'association de SAP avec sa proie, dans les levures exprimant une SAP-WT ou une SAP-T68I (une forme mutée de

SAP qui associe les motifs ITSM dont la tyrosine phosphorylée ne possède pas de résidu valine en +3 (Morra et al., 2001c)) (Figure 1, Panneau pGAD-Ly9). Cependant, lorsque nous éteignons l'expression de la kinase, nous observons une activité de la β -galactosidase uniquement dans les levures exprimant la SAP-WT, suggérant que SAP peut associer Ly9 sur un motif ITSM indépendamment de la phosphorylation de la tyrosine comme ce qui a été démontré pour le récepteur SLAM (Figure 1, Panneau pGAD-Ly9). Une forme mutée de SAP n'associant plus les résidus tyrosine qu'ils soient phosphorylés ou non (SAP-C42W) ne permet pas l'activité de la β -galactosidase en présence ou non de la kinase (Figure 1A, Panneau pGAD-Ly9). Ces résultats démontrent que SAP peut associer constitutivement, par son domaine SH2, le récepteur Ly9.

Pendant ce test double hybride nous avons également cloné un ADNc codant pour la partie cytoplasmique de Pecam-1. En présence de la kinase, une activité de la β -galactosidase n'est observée que lorsque les levures expriment la SAP-WT (Figure 1A, Panneau pGAD-Pecam-1 avec kinase). En revanche, lorsque nous exprimons une forme mutée de SAP (SAP-C42W ou SAP-T68I) en présence de la kinase (Figure 1A, panneau pGAD-Pecam-1 avec kinase), nous observons aucune activité de la β -galactosidase. De plus, lorsque la kinase n'est plus exprimée, aucune activité de la β -galactosidase n'est également observée, quelque soit la forme de SAP exprimée (WT ou mutée) (Figure 1A, Panneau pGAD-Pecam-1 sans kinase). Ces résultats suggèrent que SAP, par son domaine SH2, associe Pecam-1 et que cette association est strictement dépendante de la phosphorylation de Pecam-1. De plus, nous pouvons supposer que SAP associe Pecam-1 sur un domaine ITSM ayant une séquence en acides aminés différente que celle retrouvée dans Ly9. En effet, le mutant SAP-T68I n'associe pas Pecam-1, nous suggérant que le motif ITSM de Pecam-1 possède un résidu valine en +3 de la tyrosine, ce qui a été confirmé par le séquençage du plasmide pGAD contenant l'insert qui code pour la partie cytoplasmique de Pecam-1. La séquence en acides aminés issue de cet ADNc comporte quatre tyrosines, montrées en rouge, dont deux qui font parties d'un motif ITIM (en vert) et d'un motif ITSM (en rouge) dont le résidu en +3 est une valine (Figure 1B).



B

```

1 T P P N P K K E I L E L V G I R H E A K
1 AACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCCTAGAACTAGTCGGAATTCGGCACGAGGCCAA
21 Q M P V E M S R P A V P L L N S N N E K
61 GCAGATGCCAGTGGAAATGTCCAGGCCAGCAGTACCCTTCTGAACTCCAACAACGAGAA
41 M S D P N M E A N S H Y G H N D D V R N
121 AATGTCAGATCCCAATATGGAAGCTAACAGTCATTACGGTCACAATGACGATGTCAGAAA
61 H A M K P I N D N K E P L N S D V Q Y T
181 CCATGCAATGAAACCAATAAATGATAATAAAGAGCCTCTGAACTCAGACGTGCAGTACAC
81 E V Q V S S A E S H K D L G K K D T E T
241 GGAAGTTCAGTGTCCCTCAGCTGAGTCTCACAAAGATCTAGGAAAAGAAGGACACAGAGAC
101 V Y S E V R K A V P D A V E S R Y S R T
301 AGTGTACAGTGAAGTCCGGAAAGCTGTCCCTGATGCCGTGGAAGCAGATACTCTAGAAC
121 E G S L D G T * T A R P D A H P W K D I
361 GGAAGGCTCCCTTGATGGAACCTTAGACAGCAAGGCCAGATGCACATCCCTGGAAGGACAT
141 H V P R R T D N P C I S R P L C T Y L *
421 CCATGTTCCGAGAAGAACAGATAATCCCTGTATTTCAAGACCTCTGTGCACTTATTTATG
161 T C P A P T E H S N S S G * A A G S * I
481 AACCTGCCCTGCTCCACAGAACACAGCAATTCCTCAGGCTAAGCTGCCGGTTCTTAAAT
181 H P A K L M L G R K R Y R G A V E F P T
541 CCATCCTGCTAAGTTAATGTTGGGTAGAAAGAGATACAGAGGGGCTGTTGAATTTCCAC
201 Y P P S T K L E H P W K L E E H K R R S
601 ATACCCTCCTTCCACCAAGTTGGAACATCCTTGGAAATGGAAGAGCACAAGAGGAGATC
221 R A R P L G Y S E T * I F C F V Q R * R
661 CAGGGCAAGGCCATTGGGATATTCTGAAACTTGAATATTTTGTGTTTGTGCAGAGATAAAG
241 P F P C T L T K K K K
721 ACCTTTTCCATGCACCCTCACAAAAA

```

Figure 1. **SAP associe Ly9 et Pecam-1 en double-hybride.** *A et B.* Les levures diploïdes sont incubées en milieu sélectif (-His, -Leu, -Trp, -Ura) en présence ou non de Met pour réprimer ou non l'expression de la kinase Lyn. Les tests β-galactosidase sur filtres sont décrits dans la section matériels et méthodes. *C.* Séquence de la partie intra-cytoplasmique de Pecam-1 (en bleue) clonée par double-hybride. Le motif ITIM est représenté en vert et le motif ITSM en rouge.

SAP associe directement Pecam-1 dans les Jurkat.

La technique du double-hybride suggère une interaction directe entre SAP et Pecam-1. Dans le but de le confirmer, nous avons effectué des expériences de Far-Western à l'aide d'une protéine de fusion GST-SAP sur des immunoprécipitations de Pecam-1 issues de lysats activés par divers stimuli (Figure 2A et B). Dans la figure 2A, nous avons confirmé une interaction directe entre SAP et la forme phosphorylée de Pecam-1 par un traitement pervanadate des cellules.

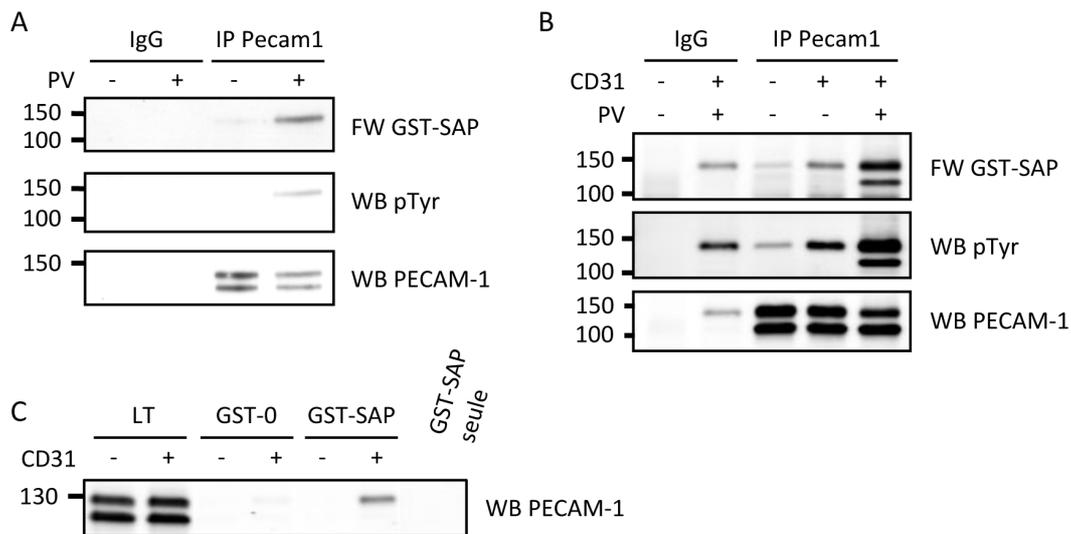


Figure 2. SAP interagit directement avec la forme phosphorylée de Pecam-1 dans les Jurkat.

A. Les cellules Jurkat sont traitées ou non avec 25 μ M de pervanadate pendant 30 min, lysées puis Pecam-1 est immunoprécipitée comme décrit dans le matériel et méthodes. Les immunoprécipitations sont séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane PVDF. Le Far-Western GST-SAP est d'abord révélé (panneau du haut) puis la membrane est strippée et révélée par un western blot anti-phosphotyrosine (4G10 – panneau du milieu) puis anti-Pecam-1 (panneau du bas). B. Les cellules Jurkat sont stimulées ou non par agrégation de Pecam-1 pendant 10 min en présence ou non de pervanadate (25 μ M) puis traitées comme en A. C. Les cellules Jurkat sont stimulées ou non par agrégation de Pecam-1 pendant 10 min, lysées. Les lysats sont pré-lavés puis les pêches SAP sont effectuées comme décrit dans le matériel et méthodes. Les pêches sont séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane PVDF puis révélées par un western-blot anti-Pecam-1.

Nous confirmons de la même manière cette association directe lors d'une agrégation de Pecam-1 en présence ou non de pervanadate (Figure 2B). Enfin, nous révélons la présence de Pecam-1 dans une pêche GST-SAP effectuée sur des lysats de cellules activées par agrégation de Pecam-1 (Figure 2C). Ces résultats démontrent que la protéine SAP associe directement la forme phosphorylée de Pecam-1 dans les cellules Jurkat.

SAP associe uniquement la tyrosine Y686 de Pecam-1.

Pecam-1 possède plusieurs tyrosines dans sa partie intracytoplasmique dont deux qui forment deux motifs ITIM dont la séquence est proche de celle d'un ITSM (Figure 3A). Dans le but de découvrir si SAP associe une ou les deux tyrosines qui composent ces ITIM, nous avons muté les tyrosines en phénylalanines puis ré-exprimé ces formes mutées dans les cellules HeLa. Après traitement ou non des cellules au pervanadate, les formes mutées sont immunoprécipitées et une expérience de Far-western est réalisée.

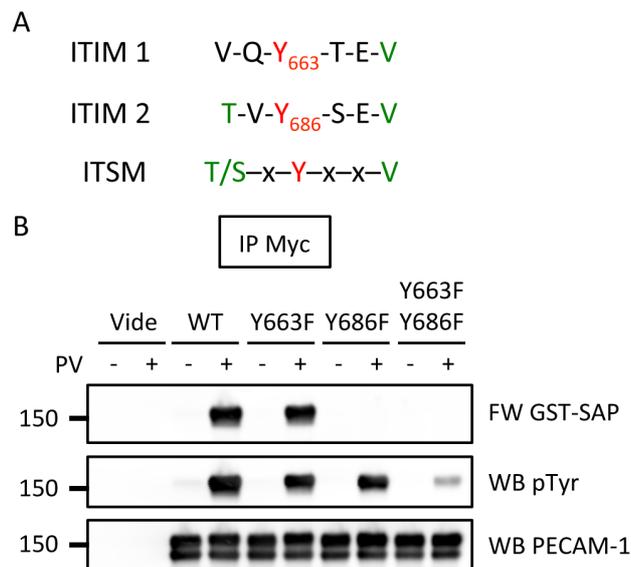


Figure 3. **SAP interagit directement avec la tyrosine Y686 de Pecam-1.** A. Alignement des séquences des motifs ITIM 1 et 2 retrouvés dans la partie cytoplasmique de Pecam-1 avec la séquence d'un motif ITSM. B. Les cellules HeLa sont transfectées avec un vecteur vide, ou avec un Myc-Pecam1-WT ou avec des mutants Myc-Pecam-1 comme indiqués. 48 heures après transfections, les cellules HeLa sont traitées ou non avec 25 μ M de pervanadate pendant 10 min, lysées puis Pecam-1 est immunoprécipitée par son tag Myc. Les immunoprécipitations sont séparées par SDS-PAGE et transférées sur membrane PVDF. Le Far-Western GST-SAP est d'abord révélé (panneau du haut) puis la membrane est strippée et révélée par un western blot anti-phosphotyrosine (4G10 – panneau du milieu) puis anti-Pecam-1 (panneau du bas).

Comme attendu, nous ne révélons rien lorsque les cellules ont été transfectées avec un vecteur vide et nous observons l'association de SAP avec la forme sauvage de Pecam-1 lorsque les cellules sont traitées au PV (Figure 3B, pistes Vide et WT). Nous révélons également l'association de SAP avec Pecam-1 lorsque la tyrosine Y663 est mutée (Figure 3B, piste Y663F). Cependant, nous perdons l'interaction lorsque la tyrosine Y686 ou les deux tyrosines Y663 et Y686 sont mutées (Figure 3B, pistes Y686F et Y663FY686F). La

forme mutée de Pecam-1 sur la tyrosine Y686 présente un niveau de phosphorylation équivalent à la forme WT, suggérant que les autres tyrosines présentes dans la partie cytoplasmique de Pecam-1 sont toujours phosphorylées. De plus, on observe une diminution drastique, mais pas complète, de la phosphorylation de Pecam-1 lorsque les deux tyrosines Y663 et Y686 sont mutées, suggérant que d'autres résidus tyrosine sont phosphorylés suite au traitement des cellules au PV (Figure 3B, panneau anti-pTyr). Ces résultats prouvent que la protéine SAP associe directement la tyrosine Y686 phosphorylée de Pecam-1.

Diminution de l'adhérence des cellules médiée par Pecam-1 en absence de SAP.

Pecam-1 est connue pour permettre l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales et ainsi permettre la transmigration des leucocytes à travers la barrière endothéliale. Pour étudier le rôle de SAP dans ce processus, nous avons généré différentes populations de cellules H9, initialement déficientes pour Pecam-1 (H9), dans lesquelles nous avons ré-exprimé la forme sauvage de Pecam-1 (H9-CD31) puis éteint la protéine SAP (H9-CD31- Δ SAP) (Figure 4B et C). Nous avons ensuite étudié l'adhérence de ces cellules sur fibronectine en présence ou non d'anti-CD31 ou d'un anticorps irrelevant (RAM) par dosage colorimétrique à l'aide du sel de tétrazolium WST-1. De la même manière que le MTT, ce sel incolore est clivé par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes pour obtenir un dérivé formazan de couleur jaune, quantifiable par spectrophotométrie à 450 nm. Cependant le dérivé formazan obtenu par le clivage du WST-1 possède l'avantage d'être soluble dans l'eau et donc plus facile d'utilisation que le MTT. Comme montré dans la Figure 4A, les cellules H9 sauvages présentent une adhérence basale dans toutes les conditions. L'expression de Pecam-1 dans ces cellules (H9-CD31) augmente fortement l'adhérence sur les anticorps anti-CD31. Cette adhérence est encore augmentée (+39%) lorsque les cellules sont mises à adhérer sur fibronectine en présence d'anti-CD31 alors que l'adhérence de ces cellules sur le RAM ou sur fibronectine + RAM reste à l'état basal. L'extinction de la protéine SAP (H9-CD31- Δ SAP) diminue d'environ 26% l'adhérence des cellules sur l'anti-CD31 et de 21% sur fibronectine + CD31.

Ces résultats suggèrent que l'adhérence médiée par Pecam-1 initie un signal dépendant de SAP pour permettre l'accrochage des cellules.

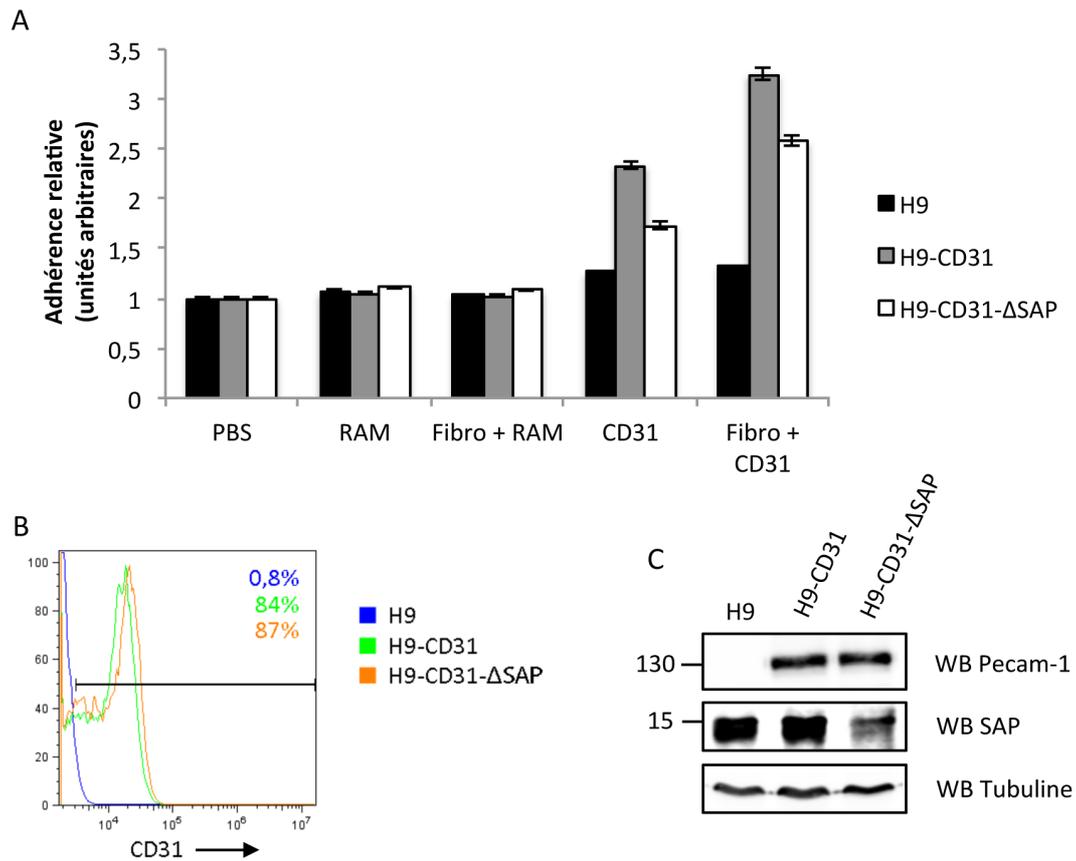


Figure 4. Diminution de l'adhérence médiée par Pecam-1 en absence de SAP. *A.* Les cellules H9 parentales (barres noires), les cellules H9 exprimant stablement Pecam-1 (H9-CD31 – barres grises) et les cellules H9-CD31 éteignant stablement SAP (H9-CD31-ΔSAP – barres blanches) sont incubées à $5 \cdot 10^5$ cellules/mL dans des puits coâtés OVN avec du PBS, un anticorps irrelevant (RAM), ou avec un anti-CD31 en présence ou non de fibronectine pendant 20 min à 37°C. Après 3 lavages PBS, l'adhérence des cellules est quantifiée par ajout de WST-1 pendant 1h puis l'absorbance est relevée. *B.* Analyse de l'expression de Pecam-1 à la surface des cellules H9 parentales (bleu), H9-CD31 (vert) et des H9-CD31-ΔSAP (orange) par FACS. *C.* Analyse de l'expression de Pecam-1 et de SAP dans les différentes populations de cellules par western-blot.

Discussion générale et perspectives

Depuis sa découverte en 1998, de nombreuses études ont montré le rôle crucial de la protéine SAP, par son association avec les co-récepteurs de la famille SLAM, dans les mécanismes d'activation des lymphocytes T. SAP est une petite protéine composée uniquement d'un domaine SH2 particulier qui peut à la fois associer des résidus tyrosine phosphorylés ou non et des protéines à domaine SH3. Ce domaine SH2 confère à la protéine SAP les propriétés d'une protéine adaptatrice. Ainsi SAP recrute des protéines à activités enzymatiques, telles que les kinases Fyn ou PKC- θ ou le facteur d'échange β -Pix sur les récepteurs de la famille SLAM, induisant alors la signalisation en aval de ces récepteurs (Cannons et al., 2011). Cependant, le rôle de SAP en dehors du contexte des récepteurs SLAM n'a été que très peu étudié.

Le domaine SH2 de SAP établit des liaisons de types trois « crochets » avec le motif ITSM alors que l'interaction entre un domaine SH2 conventionnel et une tyrosine phosphorylée n'établit des liaisons qu'avec la tyrosine phosphorylée et le résidu en +3. Cependant, des études de modélisation ont permis de caractériser les différentes affinités entre le domaine SH2 de SAP et un motif ITSM. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence que SAP interagit également de façon classique avec les motifs ITSM, mais avec une affinité beaucoup plus faible. Ainsi, le domaine SH2 de SAP a la capacité d'effectuer des associations de types deux ou trois « crochets » avec les motifs à base de tyrosine (Li et al., 1999b). De plus, les séquences des motifs ITSM, T/SxYxxI/V/L, ressemblent beaucoup aux séquences des motifs ITAM et ITIM, présents sur de nombreux récepteurs transmembranaires. A la différence des motifs ITAM ou ITIM, les motifs ITSM possèdent un résidu (thréonine ou sérine) en -2 de la tyrosine qui renforce l'interaction avec le domaine SH2 de SAP. Enfin, deux études récentes ont montré que SAP, surexprimée dans les lymphocytes B, interagit avec CD22 et le récepteur Fc γ RIIB et induit une signalisation en aval de ces récepteurs qui inhibe l'activation des cellules (Li et al., 2008; Ostrakhovitch et al., 2009). Toutes ces données suggèrent que SAP pourrait associer de nouvelles protéines possédant des motifs à base de tyrosine autres que les récepteurs de la famille SLAM.

A l'aide des deux études de ce manuscrit, nous avons découvert, par des approches différentes, deux nouveaux partenaires pour la protéine SAP et avons identifié de nouvelles voies de signalisation régulées par SAP. Dans un premier temps, nous avons

démontré, par des expériences de co-précipitation, l'interaction entre SAP et la chaîne CD3 ζ du complexe TCR-CD3. Puis à l'aide du criblage par double hybride dans la levure d'une banque d'ADNc de lymphocytes T humains activés, nous avons identifié la molécule d'adhésion Pecam-1 comme nouvel interacteur de SAP. Ces deux études montrent pour la première fois l'association directe de SAP avec des récepteurs autres que ceux de la famille SLAM. Dans chacune de ces études, nous avons également validé l'approche expérimentale en révélant l'interaction de SAP avec un membre de la famille SLAM. Dans la première étude, nous avons montré que SAP interagit avec NTB-A (SLAMF6) (Figure 2B) alors que dans la deuxième étude nous avons validé le double hybride en révélant l'interaction de SAP avec Ly9 (SLAMF3) (Figure 1). Nous avons également démontré que les interactions entre SAP et CD3 ζ ou Pecam-1 sont des interactions classiques domaine SH2/pTyr. En effet, les mutations des tyrosines responsables des interactions (CD3 ζ -Y72, CD3 ζ -Y83 et Pecam-1-Y686) en phénylalanines inhibent fortement les interactions. Dans le cas de l'interaction entre SAP et CD3 ζ , la double mutation CD3 ζ -Y72FY83F est nécessaire pour abroger complètement l'interaction, suggérant que SAP interagit avec les deux tyrosines Y72 et Y83 de CD3 ζ . Cependant, les interactions SAP/CD3 ζ et SAP/Pecam-1 diffèrent en un point. La chaîne CD3 ζ ne possède pas de motifs ITSM mais trois motifs ITAMs alors que Pecam-1 possède deux motifs ITIM dont un qui possède également la séquence d'un motif ITSM. Les tyrosines des motifs ITAM de CD3 ζ sont au nombre de six et possèdent, pour cinq d'entre elles, une séquence consensus YxxL.

SAP possède un domaine SH2 particulier.

La protéine SAP associe donc les tyrosines phosphorylées d'un motif ITAM de CD3 ζ et la tyrosine phosphorylée d'un motif ITIM de Pecam-1. D'après la séquence du motif ITAM de CD3 ζ , la protéine SAP associe ce motif tel un domaine SH2 conventionnel en effectuant des liaisons avec la tyrosine phosphorylée et le résidu en +3 de la tyrosine.

La protéine SAP associe le motif ITIM de Pecam-1, qui possède la même séquence qu'un motif ITSM, suggérant que SAP interagit avec ce motif en effectuant des liaisons avec la tyrosine phosphorylée et les résidus en -2 et +3 de la tyrosine. Cette hypothèse est renforcée par la présence d'un deuxième motif ITIM classique dans la partie cytoplasmique de Pecam-1. Ce deuxième motif ITIM ne possède donc pas de thréonine

ou de sérine en -2 de la tyrosine et n'associe pas SAP alors que le résidu en +3 de la tyrosine est identique entre les deux motifs.

La protéine SAP interagit donc avec un motif ITAM différemment qu'avec un motif ITIM ou qu'avec un motif ITSM. La cause de cette spécificité d'interaction n'est pas encore connue mais on peut supposer que le résidu en +3 de la tyrosine a son importance. En comparant les séquences des motifs ITSM des récepteurs SLAM et des séquences connues pour associer SAP, comme les motifs à base de tyrosine sur CD3 ζ , Pecam-1, CD22 ou Fc γ RIIB, on peut s'apercevoir que SAP établit des liaisons de type deux « crochets » lorsqu'un résidu leucine est situé en +3 de la tyrosine alors que SAP établit des liaisons de type trois « crochets » lorsqu'un résidu valine est situé en +3. Ces observations suggèrent la possibilité de découvrir de nouveaux partenaires et ainsi de nouvelles voies de signalisation pouvant être régulées par SAP.

Rôle de SAP dans la signalisation du TCR.

D'après notre étude, seules les tyrosines Y72 et Y83, qui composent l'ITAM-1 de CD3 ζ , associent SAP. Or, il a été montré que le partenaire majoritaire de CD3 ζ est la tyrosine kinase ZAP-70 qui possède une plus grande affinité pour l'ITAM-1 de CD3 ζ en comparaison avec le second et le troisième ITAM. Cependant, l'association CD3 ζ /ZAP-70 nécessite l'interaction des deux domaines SH2 de la kinase avec les deux tyrosines phosphorylées de CD3 ζ (Isakov et al., 1995). Il va donc y avoir une compétition entre la protéine SAP et la kinase ZAP-70 pour l'association avec l'ITAM-1 de CD3 ζ . Comme la protéine SAP ne possède qu'un seul domaine SH2, elle n'associera qu'une tyrosine phosphorylée de l'ITAM-1, empêchant le recrutement de ZAP-70 et permettant le recrutement d'autres molécules de signalisation lorsque la deuxième tyrosine est phosphorylée comme la PI3Kinase. En effet, il a été montré que la sous-unité régulatrice p85 de la PI3Kinase associe exclusivement l'ITAM-1 de CD3 ζ et que cette association nécessite la phosphorylation de l'ITAM (Exley et al., 1994). On pourrait donc supposer que SAP régule le recrutement de la PI3Kinase sur la chaîne CD3 ζ . L'étude du recrutement de la PI3Kinase sur CD3 ζ lors d'une surexpression ou lors de l'extinction de SAP devrait nous permettre de tester facilement cette hypothèse. En effet, une surexpression de SAP devrait faciliter et augmenter le recrutement de la PI3K alors qu'à

l'inverse, si SAP est vraiment impliquée, son absence devrait inhiber le recrutement de la PI3K sur CD3 ζ .

La cinétique de phosphorylation des motifs ITAM n'est pas encore très claire. En effet, Van Oers et ses collègues ont montré que la phosphorylation de CD3 ζ commence par les deux motifs ITAM distaux de la membrane de CD3 ζ pour générer la forme à 21 kDa. La phosphorylation de l'ITAM proximal de la membrane intervient ensuite pour générer la forme à 23 kDa de CD3 ζ (van Oers et al., 2000). A l'inverse, Kersh et ses collègues ont démontré que la phosphorylation des deux motifs ITAM distaux de la membrane nécessite la phosphorylation de l'ITAM-1 de CD3 ζ (Kersh et al., 1998). Dans notre étude, nous avons observé que la protéine SAP interagit principalement avec l'ITAM-1 de la forme à 21 kDa de CD3 ζ . De plus, nous avons également observé que SAP interagit faiblement avec la forme de CD3 ζ à 16 kDa qui est légèrement phosphorylée. Ces observations suggèrent que l'ITAM-1 des formes à 16 kDa et à 21 kDa de CD3 ζ est phosphorylé. De plus, on peut supposer que la forme à 16 kDa de CD3 ζ qui associe SAP faiblement est uniquement phosphorylée sur un ou sur les deux résidus tyrosine de l'ITAM-1, ne provoquant pas alors le shift de la protéine vers la forme à 21 kDa. Nos résultats confirmeraient donc le modèle de Kersh et ses collègues qui démontre que CD3 ζ est tout d'abord phosphorylée sur l'ITAM proximal de la membrane suite à l'activation des cellules. Cependant, nous n'avons pas observé de diminution globale de la phosphorylation de CD3 ζ en absence de SAP lorsque les cellules sont activées, suggérant que SAP ne régule pas la phosphorylation de CD3 ζ mais permettrait seulement le recrutement de protéines à domaines SH2 sur CD3 ζ autres que la tyrosine kinase ZAP-70. L'analyse des différents partenaires de CD3 ζ en présence ou en absence de SAP permettrait d'identifier les partenaires recrutés sur CD3 ζ à l'aide de SAP et ainsi de mieux caractériser les voies de signalisation régulées par l'association de SAP avec CD3 ζ .

L'implication de SAP dans la signalisation TCR-CD3 a déjà été évoquée par Sanzone *et al*, qui ont démontré, à travers un mécanisme non élucidé dans leur étude, un défaut d'activation de Erk et de Vav1 dans des cellules T issues de patients XLP (Sanzone et al., 2003). Dans notre étude nous montrons pour la première fois que SAP interagit

directement avec les deux tyrosines qui composent l'ITAM proximal de la chaîne de signalisation CD3 ζ du complexe TCR-CD3. Nous avons montré, par des expériences où l'expression de SAP est diminuée par ARN interférence, que cette interaction régule les voies de signalisation précoces suite à une activation CD3 des cellules. Nous avons observé une diminution du recrutement des protéines clés dans les voies de signalisation induites par l'engagement du TCR, telles que la PLC- γ , Slp-76 ou Grb2, suggérant un défaut d'organisation des complexes protéiques à la membrane lors de l'absence de SAP (Figure 5B). Ces complexes protéiques sont médiés, en partie, par des interactions de type domaine SH2/pTyr. Nous avons pu observer une interaction constitutive entre SAP et la tyrosine kinase Fyn (non montrée) dans les cellules Jurkat, suggérant que SAP pourrait recruter Fyn sur le complexe TCR-CD3 et ainsi permettre la phosphorylation des protéines pour permettre la formation de ces complexes à la membrane. Nous avons également observé une diminution de l'activation des kinases Erk et Akt suite à une cinétique d'activation CD3 (Figure 5A), certainement en conséquence du défaut de formation des complexes protéiques. Ces résultats suggèrent que la fonction de SAP est de promouvoir un signal permettant l'activation complète des voies Erk et Akt, aboutissant ainsi à une production optimale d'IL-2 et d'IL-4 par les lymphocytes T (Figure 6). Ces résultats sont en accord avec l'étude très récente de Baldanzi *et al*, qui ont montré que l'activation, en absence de SAP, de la DGK α (pour DiacylGlycérol Kinase α) inhibe l'activation de la voie Erk. Ces auteurs ont suggéré que SAP, à travers l'activation de la PLC- γ , régule négativement la DGK α (Baldanzi et al., 2011). Notre étude complète ces travaux en montrant qu'en absence de SAP, le recrutement de la PLC- γ au niveau des complexes protéiques est diminué aboutissant à une diminution de son activation (Figure 5B).

Notre étude confirme le rôle majeur de SAP dans la régulation des événements de signalisation qui contrôlent l'activation des lymphocytes T. Il a été proposé dans le passé que la signalisation IL-2 modifie les signaux induits par le complexe TCR-CD3 (Haughn et al., 1998). En effet, nous n'avons pu observer l'association de SAP avec CD3 ζ dans des les Kit 225, qui sont dépendantes de l'IL-2 pour leur survie et leur croissance, stimulées par l'IL-2. Cependant, nous avons observé l'interaction de SAP avec la forme de 16 kDa de CD3 ζ lorsque ces cellules sont sevrées en IL-2 pendant 72h (Figure S1). Le sevrage en IL-2 induit l'apoptose des Kit 225, suggérant que le couple SAP/CD3 ζ régulerait les

signaux apoptotiques. Il n'est pas encore clair si l'interaction SAP/CD3 ζ est induite rapidement après le sevrage pour activer une signalisation anti-apoptotique prolongeant la survie des cellules ou si l'interaction est induite plus tard lors du sevrage et activerait une signalisation pro-apoptotique conduisant à la mort des cellules. Nous pourrions étudier très facilement l'apoptose des cellules en cytométrie en flux par un marquage Annexine V associé à un marquage à l'iodure de propidium en absence de SAP lors d'une cinétique de sevrage des cellules sans IL-2. L'étude de l'expression de protéines clés des voies apoptotiques en absence de SAP, comme les membres de la famille Bcl2 ou l'activation des caspases, nous éclairerait grandement sur le rôle de SAP dans ce mécanisme. Un rôle de SAP dans les mécanismes d'apoptose induits par déprivation de cytokines confirmerait alors les travaux de Nagy *et al* ainsi que ceux de Snow *et al* montrant le rôle positif de SAP dans les mécanismes d'AICD (Nagy et al., 2009; Snow et al., 2009). L'absence de SAP contribuerait alors à l'apparition des hyperproliférations de lymphocytes T CD8⁺ observées chez les patients XLP.

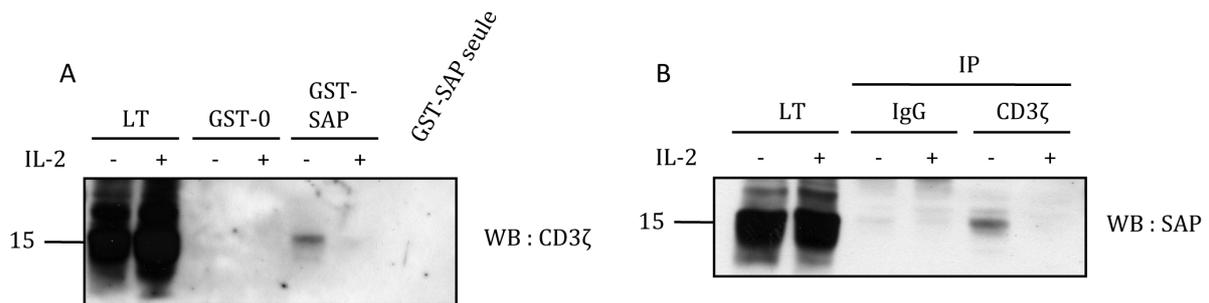


Figure S1 | **Association de SAP avec CD3 ζ lors d'un sevrage sans IL-2.** Après un sevrage sans IL-2 pendant 48h, les cellules Kit 225 sont stimulées ou non à l'IL-2 (200 pM) pendant 24h. La stimulation est arrêtée par 2 lavages en PBS froid puis les cellules sont lysées et les différentes précipitations (A, pêches GST-SAP et B, IP CD3 ζ) sont effectuées. SAP et CD3 ζ sont ensuite révélées par western-blot.

Le rôle de SAP, par son association avec les récepteurs SLAM et NTB-A, est maintenant clairement établi dans le développement des cellules NKT. En effet, les souris *sap*^{-/-} ou les patients XLP ne développent pas de cellules NKT (Nichols et al., 2005a; Pasquier et al., 2005). Cependant, les souris doubles déficientes *slam*^{-/-} et *ntba*^{-/-} présentent un défaut important de développement de ces cellules mais pas total. De plus, le développement des cellules NKT requiert également une signalisation par le complexe TCR-CD3 (Bendelac et al., 2007). On peut donc supposer qu'un mécanisme

complémentaire régulé par l'association de SAP avec CD3 ζ intervient dans le développement des cellules NKT.

Il a été suggéré que l'absence de cellules NKT est le défaut cellulaire majoritaire responsable de l'apparition des phénotypes chez les patients XLP. En effet, il a été montré récemment qu'environ 20% des patients XLP ne possèdent pas de mutations sur le gène *sh2d1a* mais présentent une altération du gène codant pour la protéine inhibitrice de l'apoptose XIAP et développent le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X-2 (XLP-2). Les patients XLP-2 présentent les mêmes manifestations cliniques que les patients XLP-1, dont une absence de cellules NKT et la sensibilité à l'EBV, c'est pourquoi la mutation du gène XIAP n'a été caractérisée que très récemment (Rigaud et al., 2006). Cependant, les mécanismes moléculaires régulés par XIAP sont différents que ceux régulés par SAP. Il a été évoqué que l'apparition des phénotypes des patients XLP-2 serait due à une apoptose dérégulée des cellules immunes suite à l'infection par l'EBV. L'activation excessive des voies apoptotique aboutirait à une absence de cellules cytotoxiques dirigées contre les lymphocytes B infectées, une absence de cellule NKT ainsi qu'une augmentation de l'AICD des lymphocytes B. Ces défauts cellulaires conduiraient aux phénotypes des patients XLP comme les lymphohistiocytoses hémophagocytiques ou les hypogammaglobulinémies.

Ces phénotypes cliniques ont été retrouvés chez deux patientes possédant une mutation sur le domaine SH2 de la tyrosine kinase I κ k résultant en une instabilité de la protéine et à son absence. De façon identique que chez les patients XLP-1 et XLP-2, ces deux patientes présentent une absence de cellules NKT et une grande sensibilité à l'infection par l'EBV (Huck et al., 2009).

Ces données suggèreraient donc un rôle de SAP sur les voies de signalisation régulées par la kinase I κ k ainsi que sur les voies de signalisation régulant l'apoptose des cellules. L'association de SAP avec la chaîne CD3 ζ régulerait donc un signal permettant la formation de complexes protéiques nécessaires à l'activation d'I κ k impliquée dans la maturation des cellules NKT.

SAP agit comme un compétiteur et inhibe le recrutement des phosphatases Shp1 et Shp2.

Les données de la littérature montrent que les récepteurs de la famille SLAM sont recrutés à la synapse immunologique et co-localisent avec SAP pour médier des signaux

activateurs (Cannons et al., 2004; Howie et al., 2002; Roda-Navarro et al., 2004). Zhao *et al.*, ont récemment démontré qu'en absence de SAP, les récepteurs Ly108 (l'équivalent de NTB-A chez la souris) et 2B4 sont toujours recrutés à la synapse immunologique des lymphocytes T cytotoxiques et co-localisent avec la tyrosine phosphatase Shp1 provoquant une diminution d'activation des kinases de la famille Src et de la cytotoxicité des cellules (Zhao et al., 2012). Ce modèle confirme le rôle bien connu de SAP en tant que compétiteur. On pourrait supposer que SAP interagit avec CD3 ζ et inhibe le recrutement de Shp1 sur le complexe TCR-CD3 permettant ainsi de prolonger l'activation de la signalisation induite par l'engagement du TCR. L'étude de la phosphorylation des protéines clés de l'activation TCR, comme CD3 ζ , LAT ou Slp-76, sur des cinétiques d'activation plus longues (entre 30 et 60 min) et des expériences de co-précipitations CD3 ζ /Shp1 en absence de SAP pourraient nous donner une idée plus précise d'un possible rôle de SAP dans les mécanismes de rétrocontrôle négatif du signal TCR. En effet, si SAP empêche réellement le recrutement de la phosphatase Shp1 sur CD3 ζ , celle-ci devrait être plus rapidement déphosphorylée après une activation des cellules en absence de SAP.

Il a également été rapporté que Pecam-1 recrute la tyrosine phosphatase Shp2 pour réguler négativement les signaux induits par l'engagement du TCR (Newman et al., 2001; Newton-Nash and Newman, 1999). Cependant, le recrutement de Shp2 sur Pecam-1 nécessite l'interaction des deux domaines SH2 de Shp2 avec les deux tyrosines phosphorylées de Pecam-1 (Pumphrey et al., 1999). L'association de SAP avec la tyrosine Y686 de Pecam-1, observée dans notre étude (Figure 3), pourrait suggérer une compétition avec le recrutement de Shp2 sur Pecam-1. En inhibant l'association de Shp2 avec Pecam-1, ce mécanisme prolongerait l'activation des lymphocytes T lors de leur recrutement au niveau du site infectieux. L'étude de l'activation des protéines clés de la signalisation induite par une co-activation CD3+CD31 dans des cellules déficientes en SAP pourrait valider ce mécanisme.

Régulation de l'adhérence des cellules par SAP.

Les défauts cellulaires retrouvés chez les patients XLP sont dus, pour la majorité, à des défauts de contact médiés par les récepteurs SLAM, entre les cellules hématopoïétiques. Ainsi, les interactions homotypiques (ou hétérotypique dans le cas de l'interaction

2B4/CD48) entre les récepteurs SLAM régulent la cytotoxicité des cellules NK et des CTL, le développement des cellules NKT et la formation des centres germinatifs (Cannons et al., 2011). Ces mécanismes sont dépendants du recrutement de SAP sur les différents récepteurs SLAM, suggérant à un rôle pour SAP dans les voies de signalisation qui régulent l'adhérence des cellules. De plus, Gu *et al.*, ont montré que SAP interagit, via son résidu R78, avec le facteur d'échange β -Pix, suggérant que SAP pourrait réguler l'activation des petites G comme Rac ou Cdc42, connues pour leur rôle dans les réarrangements du cytosquelette d'actine et dans l'adhérence des lymphocytes T (Gu et al., 2006). Il a déjà été démontré que la petite G Rap1 est activée et régule l'adhérence et la transmigration médiée par Pecam-1 des leucocytes au niveau du site infectieux (Muller et al., 1993; Reedquist et al., 2000; Vaporciyan et al., 1993). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'activation de Rap1 ou dans l'adhérence médiée par Pecam-1 sont encore méconnus. Dans notre étude, nous avons démontré que SAP interagit directement sur Pecam-1 (Figure 2), et avons également observé une diminution de l'adhérence des cellules médiée par Pecam-1 en absence de SAP. Ces données suggèrent que SAP régulerait les voies de signalisation en aval de Pecam-1 pour moduler l'adhérence des cellules T. L'identification des protéines G (Rap1, Rac, Cdc42 ?) et des facteurs d'échanges (β -Pix ?) activés suite à une adhérence des cellules médiées par Pecam-1 pourrait nous donner de plus amples informations sur un possible rôle de SAP dans l'adhérence des lymphocytes T médiée par Pecam-1.

Au début de mon travail de thèse, l'association de SAP avec Pecam-1 a été décrite succinctement dans un cas particulier d'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Quiroga et al., 2007). Les auteurs ont démontré que cette association, en réponse à l'infection, diminue la production d'IFN- γ des lymphocytes T. Ils ont également observé que l'infection par *M. tuberculosis* induit la diminution d'expression de Pecam-1 et de SAP dans les lymphocytes T. Cependant, l'ajout d'un anticorps anti-Pecam-1 ou d'une protéine recombinante pour Pecam-1 inhibe la diminution d'expression de Pecam-1 induite par l'infection. On pourrait alors supposer que l'association SAP/Pecam-1 régulerait également le recyclage de Pecam-1. L'implication de SAP dans le recyclage de Pecam-1 pourrait être démontrée par des observations, en microscopie, de la localisation de Pecam-1 dans des lymphocytes T adhérents sur des anticorps anti-CD31 en présence ou non de fibronectine. Nous pourrions également étudier par biochimie

l'ubiquitination du récepteur en présence ou non de SAP. Enfin, ces démonstrations pourraient expliquer une observation faite dans notre laboratoire. En effet, nous avons remarqué que des cellules H9 qui ré-expriment stablement Pecam-1 mutée sur la tyrosine Y686, qui associe SAP, perdaient plus rapidement l'expression de Pecam-1 au cours du temps de culture cellulaire en comparaison avec les cellules ré-exprimant une Pecam-1 WT ou une Pecam-1 mutée sur la tyrosine Y663, et alors que ces cellules sont cultivées en présence d'un agent de sélection pour maintenir la pression de sélection (non montrée).

Potentielle fonction de SAP dans les lymphocytes Treg ?

Enfin, il serait également intéressant d'étudier les lymphocytes Treg dans le cas du XLP. En effet, il n'existe, à notre connaissance, aucune étude sur une possible implication des lymphocytes Treg dans l'apparition des phénotypes des patients XLP. Tout d'abord, il serait important de savoir si les patients XLP ou les souris *sap*^{-/-} possèdent des lymphocytes Treg en nombre suffisant. Il existent deux sous populations de lymphocytes Treg issues de deux mécanismes de développement différents. Les iTreg dérivent de lymphocytes T CD4⁺ naïfs conventionnels dont le développement n'est pas dépendant de SAP. Cependant, les nTreg proviennent de cellules T CD4⁺ naïfs ayant échappé à la sélection négative dans le thymus par un mécanisme peu compris. Si SAP est impliquée dans ce mécanisme, on pourrait supposer que les patients XLP et les souris *sap*^{-/-} possèderaient une absence de nTreg et donc un déficit de lymphocytes Treg en général. Ce déficit en cellules Treg contribuerait à l'apparition des hyperproliférations de cellules T cytotoxiques ainsi qu'à l'hyperactivation des macrophages observée pendant la FIM. Un déficit d'activation des lymphocytes Treg pourrait également être envisagé chez les patients XLP. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression des différents membres de la famille SLAM dans lymphocytes Treg. On pourrait supposer que l'association de SAP avec les récepteurs SLAM et/ou avec la chaîne CD3 ζ , décrite dans cette étude, pourrait réguler la différenciation et/ou l'activation des lymphocytes Treg. L'implication de SAP sur la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Treg pourrait être étudiée en comparant la culture de thymocytes issus de souris WT et de souris *sap*^{-/-} en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, de TGF- β et d'IL-2. De plus, SAP, par son association avec la chaîne CD3 ζ ou avec les membres de la famille SLAM, pourrait également réguler la production de cytokines, telles que l'IL-10 ou le TGF- β dans ces cellules. Les

lymphocytes Treg ont pour principale fonction de contrôler la réponse immunitaire en supprimant l'activité des cellules T effectrices et des cellules de l'immunité innée. Ce contrôle de la réponse immunitaire est médiée par la production de cytokines anti-inflammatoire et par des contacts cellules-cellules. Ces deux mécanismes d'actions sont défectueux dans les lymphocytes T CD4⁺ helper des patients XLP. On pourrait alors supposer que ces mécanismes sont également défectueux dans les lymphocytes Treg, les rendant inefficaces à contrôler les réponses des macrophages et des lymphocytes T CD8⁺ dérégulées chez les patients XLP. De plus, les lymphocytes Treg sont des cellules qui sécrètent peu d'IL-2 et sont donc dépendantes de l'IL-2 extracellulaire pour leur différenciation. Or nous avons démontré dans notre étude une diminution de la production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺ activés en absence de SAP. La diminution de la production d'IL-2 pourrait alors aboutir à une diminution de la différenciation des cellules en lymphocytes Treg et contribuer à l'apparition des symptômes chez les patients XLP.

Les patients XLP-2 présentent, pour 17% d'entre eux, une susceptibilité accrue aux colites inflammatoires. Des cas de colites ont également été rapportés chez les patients XLP-1, mais à des taux plus faibles (Booth et al., 2011). Il est maintenant bien connu que l'IL-10 sécrétée par les lymphocytes Treg supprime les colites (Asseman et al., 1999). Ces observations suggèrent qu'un défaut d'activation des lymphocytes Treg dû à l'absence de SAP ou l'absence de Treg due aux mutations sur XIAP contribueraient aux manifestations cliniques observées chez les patients XLP.

Références bibliographiques

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* *383*, 787-793.
- Abraham, N., and Veillette, A. (1990). Activation of p56lck through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation. *Molecular and cellular biology* *10*, 5197-5206.
- Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature reviews. Immunology* *3*, 939-951.
- Aivazian, D., and Stern, L.J. (2000). Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition. *Nature structural biology* *7*, 1023-1026.
- Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (2000). Canonical structures for the hypervariable regions of T cell alphabeta receptors. *Journal of molecular biology* *295*, 979-995.
- Alarcon, B., Berkhout, B., Breitmeyer, J., and Terhorst, C. (1988). Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-gamma.delta.epsilon core and single T cell receptor alpha or beta chains. *The Journal of biological chemistry* *263*, 2953-2961.
- Albelda, S.M., Oliver, P.D., Romer, L.H., and Buck, C.A. (1990). EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *The Journal of cell biology* *110*, 1227-1237.
- Alcover, A., Mariuzza, R.A., Ermonval, M., and Acuto, O. (1990). Lysine 271 in the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization. *The Journal of biological chemistry* *265*, 4131-4135.
- Allenspach, E.J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A.G., Cannon, J.L., Takahashi, S.M., Morgan, R., Burkhardt, J.K., and Sperling, A.I. (2001). ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* *15*, 739-750.
- Aoukaty, A., and Tan, R. (2002). Association of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP/SH2D1A with 2B4, a natural killer cell-activating molecule, is dependent on phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* *277*, 13331-13337.
- Arnaud, M., Crouin, C., Deon, C., Loyaux, D., and Bertoglio, J. (2004). Phosphorylation of Grb2-associated binder 2 on serine 623 by ERK MAPK regulates its association with the phosphatase SHP-2 and decreases STAT5 activation. *J Immunol* *173*, 3962-3971.
- Arnett, K.L., Harrison, S.C., and Wiley, D.C. (2004). Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 16268-16273.

- Aruffo, A., and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *84*, 8573-8577.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* *190*, 995-1004.
- Au-Yeung, B.B., Deindl, S., Hsu, L.Y., Palacios, E.H., Levin, S.E., Kuriyan, J., and Weiss, A. (2009). The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunological reviews* *228*, 41-57.
- August, A., Gibson, S., Kawakami, Y., Kawakami, T., Mills, G.B., and Dupont, B. (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 9347-9351.
- Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., *et al.* (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine* *14*, 275-281.
- Awane, M., Andres, P.G., Li, D.J., and Reinecker, H.C. (1999). NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* *162*, 5337-5344.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* *366*, 76-79.
- Baker, R.G., Hsu, C.J., Lee, D., Jordan, M.S., Maltzman, J.S., Hammer, D.A., Baumgart, T., and Koretzky, G.A. (2009). The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells. *Molecular and cellular biology* *29*, 5578-5589.
- Balagopalan, L., Coussens, N.P., Sherman, E., Samelson, L.E., and Sommers, C.L. (2010). The LAT story: a tale of cooperativity, coordination, and choreography. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a005512.
- Baldanzi, G., Pighini, A., Bettio, V., Rainero, E., Traini, S., Chianale, F., Porporato, P.E., Filigheddu, N., Mesturini, R., Song, S., *et al.* (2011). SAP-mediated inhibition of diacylglycerol kinase alpha regulates TCR-induced diacylglycerol signaling. *J Immunol* *187*, 5941-5951.
- Barber, E.K., Dasgupta, J.D., Schlossman, S.F., Trevillyan, J.M., and Rudd, C.E. (1989). The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 3277-3281.
- Barda-Saad, M., Braiman, A., Titerence, R., Bunnell, S.C., Barr, V.A., and Samelson, L.E. (2005). Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nature immunology* *6*, 80-89.

- Barry, M., Heibein, J.A., Pinkoski, M.J., Lee, S.F., Moyer, R.W., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and cellular biology* 20, 3781-3794.
- Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45-55.
- Beach, D., Gonen, R., Bogin, Y., Reischl, I.G., and Yablonski, D. (2007). Dual role of SLP-76 in mediating T cell receptor-induced activation of phospholipase C-gamma1. *The Journal of biological chemistry* 282, 2937-2946.
- Beddoe, T., Chen, Z., Clements, C.S., Ely, L.K., Bushell, S.R., Vivian, J.P., Kjer-Nielsen, L., Pang, S.S., Dunstone, M.A., Liu, Y.C., *et al.* (2009). Antigen ligation triggers a conformational change within the constant domain of the alphabeta T cell receptor. *Immunity* 30, 777-788.
- Bendelac, A. (1995). Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 182, 2091-2096.
- Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annual review of immunology* 25, 297-336.
- Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296, 553-555.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *The Journal of experimental medicine* 186, 65-70.
- Bentley, G.A., Boulot, G., Karjalainen, K., and Mariuzza, R.A. (1995). Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor. *Science* 267, 1984-1987.
- Bentley, G.A., and Mariuzza, R.A. (1996). The structure of the T cell antigen receptor. *Annual review of immunology* 14, 563-590.
- Bergman, M., Mustelin, T., Oetken, C., Partanen, J., Flint, N.A., Amrein, K.E., Autero, M., Burn, P., and Alitalo, K. (1992). The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *The EMBO journal* 11, 2919-2924.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Bezbradica, J.S., Hill, T., Stanic, A.K., Van Kaer, L., and Joyce, S. (2005). Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4+8+ stage of thymic ontogeny.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 5114-5119.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* *329*, 506-512.

Bleharski, J.R., Niazi, K.R., Sieling, P.A., Cheng, G., and Modlin, R.L. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* *167*, 3174-3181.

Bloch-Queyrat, C., Fondaneche, M.C., Chen, R., Yin, L., Relouzat, F., Veillette, A., Fischer, A., and Latour, S. (2005). Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *The Journal of experimental medicine* *202*, 181-192.

Blom, B., Verschuren, M.C., Heemskerk, M.H., Bakker, A.Q., van Gastel-Mol, E.J., Wolvers-Tettero, I.L., van Dongen, J.J., and Spits, H. (1999). TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* *93*, 3033-3043.

Blomberg, K.E., Boucheron, N., Lindvall, J.M., Yu, L., Raberger, J., Berglof, A., Ellmeier, W., and Smith, C.E. (2009). Transcriptional signatures of Itk-deficient CD3+, CD4+ and CD8+ T-cells. *BMC genomics* *10*, 233.

Blumberg, R.S., Alarcon, B., Sancho, J., McDermott, F.V., Lopez, P., Breitmeyer, J., and Terhorst, C. (1990). Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain. *The Journal of biological chemistry* *265*, 14036-14043.

Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nature cell biology* *2*, 241-243.

Boggon, T.J., and Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* *23*, 7918-7927.

Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* *3*, 87-98.

Booth, C., Gilmour, K.C., Veys, P., Gennery, A.R., Slatter, M.A., Chapel, H., Heath, P.T., Steward, C.G., Smith, O., O'Meara, A., *et al.* (2011). X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood* *117*, 53-62.

Borowski, C., and Bendelac, A. (2005). Signaling for NKT cell development: the SAP-FynT connection. *The Journal of experimental medicine* *201*, 833-836.

Boss, J.M., and Jensen, P.E. (2003). Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Current opinion in immunology* *15*, 105-111.

- Bottino, C., Augugliaro, R., Castriconi, R., Nanni, M., Biassoni, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2000). Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells. *European journal of immunology* *30*, 3718-3722.
- Bottino, C., Falco, M., Parolini, S., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Sivori, S., Landi, E., Biassoni, R., Notarangelo, L.D., Moretta, L., and Moretta, A. (2001). NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *The Journal of experimental medicine* *194*, 235-246.
- Brown, M.H., Boles, K., van der Merwe, P.A., Kumar, V., Mathew, P.A., and Barclay, A.N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *The Journal of experimental medicine* *188*, 2083-2090.
- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* *107*, 159-166.
- Buday, L., Egan, S.E., Rodriguez Viciano, P., Cantrell, D.A., and Downward, J. (1994). A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *The Journal of biological chemistry* *269*, 9019-9023.
- Bunnell, S.C. (2002). T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *The Journal of cell biology* *158*, 1263-1275.
- Bunnell, S.C., Diehn, M., Yaffe, M.B., Findell, P.R., Cantley, L.C., and Berg, L.J. (2000). Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *The Journal of biological chemistry* *275*, 2219-2230.
- Burr, J.S., Savage, N.D., Messah, G.E., Kimzey, S.L., Shaw, A.S., Arch, R.H., and Green, J.M. (2001). Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol* *166*, 5331-5335.
- Cai, Y.C., Cefai, D., Schneider, H., Raab, M., Nabavi, N., and Rudd, C.E. (1995). Selective CD28pYMN mutations implicate phosphatidylinositol 3-kinase in CD86-CD28-mediated costimulation. *Immunity* *3*, 417-426.
- Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., and Wucherpfennig, K.W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* *111*, 967-979.
- Call, M.E., Pyrdol, J., and Wucherpfennig, K.W. (2004). Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal* *23*, 2348-2357.
- Call, M.E., Schnell, J.R., Xu, C., Lutz, R.A., Chou, J.J., and Wucherpfennig, K.W. (2006). The structure of the zeta-zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell* *127*, 355-368.

- Calpe, S., Erdos, E., Liao, G., Wang, N., Rietdijk, S., Simarro, M., Scholtz, B., Mooney, J., Lee, C.H., Shin, M.S., *et al.* (2006). Identification and characterization of two related murine genes, EAT-2a and EAT-2b, encoding single SH2-domain adapters. *Immunogenetics* 58, 15-25.
- Calpe, S., Wang, N., Romero, X., Berger, S.B., Lanyi, A., Engel, P., and Terhorst, C. (2008). The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology* 97, 177-250.
- Campi, G., Varma, R., and Dustin, M.L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *The Journal of experimental medicine* 202, 1031-1036.
- Cannons, J.L., Qi, H., Lu, K.T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Wakeland, E.K., Germain, R.N., and Schwartzberg, P.L. (2010a). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* 32, 253-265.
- Cannons, J.L., Tangye, S.G., and Schwartzberg, P.L. (2011). SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual review of immunology* 29, 665-705.
- Cannons, J.L., Wu, J.Z., Gomez-Rodriguez, J., Zhang, J., Dong, B., Liu, Y., Shaw, S., Siminovitch, K.A., and Schwartzberg, P.L. (2010b). Biochemical and genetic evidence for a SAP-PKC-theta interaction contributing to IL-4 regulation. *J Immunol* 185, 2819-2827.
- Cannons, J.L., Yu, L.J., Hill, B., Mijares, L.A., Dombroski, D., Nichols, K.E., Antonellis, A., Koretzky, G.A., Gardner, K., and Schwartzberg, P.L. (2004). SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity* 21, 693-706.
- Cefai, D., Cai, Y.C., Hu, H., and Rudd, C. (1996). CD28 co-stimulatory regimes differ in their dependence on phosphatidylinositol 3-kinase: common co-signals induced by CD80 and CD86. *International immunology* 8, 1609-1616.
- Cemerski, S., Das, J., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2008). The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity* 29, 414-422.
- Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R., and Kurosaki, T. (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *The EMBO journal* 14, 2499-2508.
- Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., and Weiss, A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-662.
- Chan, B., Lanyi, A., Song, H.K., Griesbach, J., Simarro-Grande, M., Poy, F., Howie, D., Sumegi, J., Terhorst, C., and Eck, M.J. (2003). SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nature cell biology* 5, 155-160.

- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology* 6, 15-25.
- Chen, G., Tai, A.K., Lin, M., Chang, F., Terhorst, C., and Huber, B.T. (2007). Increased proliferation of CD8⁺ T cells in SAP-deficient mice is associated with impaired activation-induced cell death. *European journal of immunology* 37, 663-674.
- Chen, R., Relouzat, F., Roncagalli, R., Aoukaty, A., Tan, R., Latour, S., and Veillette, A. (2004). Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Molecular and cellular biology* 24, 5144-5156.
- Chothia, C., Boswell, D.R., and Lesk, A.M. (1988). The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *The EMBO journal* 7, 3745-3755.
- Choudhuri, K., Parker, M., Milicic, A., Cole, D.K., Shaw, M.K., Sewell, A.K., Stewart-Jones, G., Dong, T., Gould, K.G., and van der Merwe, P.A. (2009). Peptide-major histocompatibility complex dimensions control proximal kinase-phosphatase balance during T cell activation. *The Journal of biological chemistry* 284, 26096-26105.
- Choudhuri, K., Wiseman, D., Brown, M.H., Gould, K., and van der Merwe, P.A. (2005). T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand. *Nature* 436, 578-582.
- Clarkson, N.G., Simmonds, S.J., Puklavec, M.J., and Brown, M.H. (2007). Direct and indirect interactions of the cytoplasmic region of CD244 (2B4) in mice and humans with FYN kinase. *The Journal of biological chemistry* 282, 25385-25394.
- Clements, J.L., Yang, B., Ross-Barta, S.E., Eliason, S.L., Hrstka, R.F., Williamson, R.A., and Koretzky, G.A. (1998). Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 281, 416-419.
- Coffey, A.J., Brooksbank, R.A., Brandau, O., Oohashi, T., Howell, G.R., Bye, J.M., Cahn, A.P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., *et al.* (1998). Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nature genetics* 20, 129-135.
- Cohen, G.B., Ren, R., and Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80, 237-248.
- Combs, J., Kim, S.J., Tan, S., Ligon, L.A., Holzbaur, E.L., Kuhn, J., and Poenie, M. (2006). Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14883-14888.
- Costello, P.S., Gallagher, M., and Cantrell, D.A. (2002). Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nature immunology* 3, 1082-1089.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.

- Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., and Ahmed, R. (2003). SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 421, 282-287.
- Crouin, C., Arnaud, M., Gesbert, F., Camonis, J., and Bertoglio, J. (2001). A yeast two-hybrid study of human p97/Gab2 interactions with its SH2 domain-containing binding partners. *FEBS letters* 495, 148-153.
- Cruz-Munoz, M.E., Dong, Z., Shi, X., Zhang, S., and Veillette, A. (2009). Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nature immunology* 10, 297-305.
- Cruz-Orcutt, N., and Houtman, J.C. (2009). PI3 kinase function is vital for the function but not formation of LAT-mediated signaling complexes. *Molecular immunology* 46, 2274-2283.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., Johnson, C.M., and Mescher, M.F. (2005). Signal 3 tolerant CD8 T cells degranulate in response to antigen but lack granzyme B to mediate cytotoxicity. *J Immunol* 175, 4392-4399.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *The Journal of experimental medicine* 197, 1141-1151.
- Czar, M.J., Kersh, E.N., Mijares, L.A., Lanier, G., Lewis, J., Yap, G., Chen, A., Sher, A., Duckett, C.S., Ahmed, R., and Schwartzberg, P.L. (2001). Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7449-7454.
- da Silva, A.J., Li, Z., de Vera, C., Canto, E., Findell, P., and Rudd, C.E. (1997). Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7493-7498.
- Darmon, A.J., Ley, T.J., Nicholson, D.W., and Bleackley, R.C. (1996). Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *The Journal of biological chemistry* 271, 21709-21712.
- Das, R., Sant'Angelo, D.B., and Nichols, K.E. (2010). Transcriptional control of invariant NKT cell development. *Immunological reviews* 238, 195-215.
- Davidson, D., Shi, X., Zhang, S., Wang, H., Nemer, M., Ono, N., Ohno, S., Yanagi, Y., and Veillette, A. (2004). Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* 21, 707-717.
- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178, 4022-4026.
- Davis, S.J., and van der Merwe, P.A. (2006). The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nature immunology* 7, 803-809.

Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C.M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., and Malavasi, F. (1998). Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol* *160*, 395-402.

Decker, E.L., Skerka, C., and Zipfel, P.F. (1998). The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *The Journal of biological chemistry* *273*, 26923-26930.

Del Valle, J.M., Engel, P., and Martin, M. (2003). The cell surface expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *The Journal of biological chemistry* *278*, 17430-17437.

Diehn, M., Alizadeh, A.A., Rando, O.J., Liu, C.L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G.R., and Brown, P.O. (2002). Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 11796-11801.

Dik, W.A., Pike-Overzet, K., Weerkamp, F., de Ridder, D., de Haas, E.F., Baert, M.R., van der Spek, P., Koster, E.E., Reinders, M.J., van Dongen, J.J., *et al.* (2005). New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *The Journal of experimental medicine* *201*, 1715-1723.

Dupre, L., Andolfi, G., Tangye, S.G., Clementi, R., Locatelli, F., Arico, M., Aiuti, A., and Roncarolo, M.G. (2005). SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* *105*, 4383-4389.

Dustin, M.L., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2010). Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a002311.

Dutz, J.P., Benoit, L., Wang, X., Demetrick, D.J., Junker, A., de Sa, D., and Tan, R. (2001). Lymphocytic vasculitis in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* *97*, 95-100.

Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J., and Stone, J.C. (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* *280*, 1082-1086.

Egeler, R.M., de Kraker, J., Slater, R., and Purtilo, D.T. (1992). Documentation of Burkitt lymphoma with t(8;14) (q24;q32) in X-linked lymphoproliferative disease. *Cancer* *70*, 683-687.

Eissmann, P., Beauchamp, L., Wooters, J., Tilton, J.C., Long, E.O., and Watzl, C. (2005). Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood* *105*, 4722-4729.

Eissmann, P., and Watzl, C. (2006). Molecular analysis of NTB-A signaling: a role for EAT-2 in NTB-A-mediated activation of human NK cells. *J Immunol* *177*, 3170-3177.

Endt, J., Eissmann, P., Hoffmann, S.C., Meinke, S., Giese, T., and Watzl, C. (2007). Modulation of 2B4 (CD244) activity and regulated SAP expression in human NK cells. *European journal of immunology* *37*, 193-198.

- Exley, M., Varticovski, L., Peter, M., Sancho, J., and Terhorst, C. (1994). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *The Journal of biological chemistry* 269, 15140-15146.
- Falco, M., Marcenaro, E., Romeo, E., Bellora, F., Marras, D., Vely, F., Ferracci, G., Moretta, L., Moretta, A., and Bottino, C. (2004). Homophilic interaction of NTB-A, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *European journal of immunology* 34, 1663-1672.
- Ferrero, E., Ferrero, M.E., Pardi, R., and Zocchi, M.R. (1995). The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS letters* 374, 323-326.
- Feske, S., Draeger, R., Peter, H.H., Eichmann, K., and Rao, A. (2000). The duration of nuclear residence of NFAT determines the pattern of cytokine expression in human SCID T cells. *J Immunol* 165, 297-305.
- Feske, S., Giltneane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L.M., and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature immunology* 2, 316-324.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.
- Fields, B.A., Ober, B., Malchiodi, E.L., Lebedeva, M.I., Braden, B.C., Ysern, X., Kim, J.K., Shao, X., Ward, E.S., and Mariuzza, R.A. (1995). Crystal structure of the V alpha domain of a T cell antigen receptor. *Science* 270, 1821-1824.
- Finco, T.S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L.E., and Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617-626.
- Flaig, R.M., Stark, S., and Watzl, C. (2004). Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* 172, 6524-6527.
- Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *The Journal of experimental medicine* 202, 901-906.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., *et al.* (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine* 183, 2593-2603.
- Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R.V., Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H., and Thompson, C.B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16, 769-777.
- Fremont, D.H., Hendrickson, W.A., Marrack, P., and Kappler, J. (1996). Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272, 1001-1004.

- Fruman, D.A., and Bismuth, G. (2009). Fine tuning the immune response with PI3K. *Immunological reviews* 228, 253-272.
- Fukazawa, T., Reedquist, K.A., Panchamoorthy, G., Soltoff, S., Trub, T., Druker, B., Cantley, L., Shoelson, S.E., and Band, H. (1995). T cell activation-dependent association between the p85 subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2/phospholipase C-gamma 1-binding phosphotyrosyl protein pp36/38. *The Journal of biological chemistry* 270, 20177-20182.
- Gadue, P., Morton, N., and Stein, P.L. (1999). The Src family tyrosine kinase Fyn regulates natural killer T cell development. *The Journal of experimental medicine* 190, 1189-1196.
- Galvin, J.P., Spaeny-Dekking, L.H., Wang, B., Seth, P., Hack, C.E., and Froelich, C.J. (1999). Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis in vivo. *J Immunol* 162, 5345-5350.
- Gao, G.F., Rao, Z., and Bell, J.I. (2002). Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends in immunology* 23, 408-413.
- Gapin, L., Matsuda, J.L., Surh, C.D., and Kronenberg, M. (2001). NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nature immunology* 2, 971-978.
- Garcia, K.C. (1999). Molecular interactions between extracellular components of the T-cell receptor signaling complex. *Immunological reviews* 172, 73-85.
- Geisler, C., Kuhlmann, J., and Rubin, B. (1989). Assembly, intracellular processing, and expression at the cell surface of the human alpha beta T cell receptor/CD3 complex. Function of the CD3-zeta chain. *J Immunol* 143, 4069-4077.
- Genot, E., and Cantrell, D.A. (2000). Ras regulation and function in lymphocytes. *Current opinion in immunology* 12, 289-294.
- Geppert, T.D., and Lipsky, P.E. (1987). Accessory cell independent proliferation of human T4 cells stimulated by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J Immunol* 138, 1660-1666.
- Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews. Immunology* 2, 309-322.
- Gesbert, F., Garbay, C., and Bertoglio, J. (1998a). Interleukin-2 stimulation induces tyrosine phosphorylation of p120-Cbl and CrkL and formation of multimolecular signaling complexes in T lymphocytes and natural killer cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 3986-3993.
- Gesbert, F., Guenzi, C., and Bertoglio, J. (1998b). A new tyrosine-phosphorylated 97-kDa adaptor protein mediates interleukin-2-induced association of SHP-2 with p85-phosphatidylinositol 3-kinase in human T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 273, 18273-18281.

- Gibson, S., August, A., Branch, D., Dupont, B., and Mills, G.M. (1996). Functional LCK is required for optimal CD28-mediated activation of the TEC family tyrosine kinase EMT/ITK. *The Journal of biological chemistry* *271*, 7079-7083.
- Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., and Alarcon, B. (2002). Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* *109*, 901-912.
- Gil, D., Schrum, A.G., Alarcon, B., and Palmer, E. (2005). T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *The Journal of experimental medicine* *201*, 517-522.
- Gilliland, L.K., Schieven, G.L., Norris, N.A., Kanner, S.B., Aruffo, A., and Ledbetter, J.A. (1992). Lymphocyte lineage-restricted tyrosine-phosphorylated proteins that bind PLC gamma 1 SH2 domains. *The Journal of biological chemistry* *267*, 13610-13616.
- Glebov, O.O., and Nichols, B.J. (2004). Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nature cell biology* *6*, 238-243.
- Gmunder, H., and Lesslauer, W. (1984). A 45-kDa human T-cell membrane glycoprotein functions in the regulation of cell proliferative responses. *European journal of biochemistry / FEBS* *142*, 153-160.
- Godfrey, D.I., Stankovic, S., and Baxter, A.G. (2010). Raising the NKT cell family. *Nature immunology* *11*, 197-206.
- Graham, D.B., Bell, M.P., McCausland, M.M., Huntoon, C.J., van Deursen, J., Faubion, W.A., Crotty, S., and McKean, D.J. (2006). Ly9 (CD229)-deficient mice exhibit T cell defects yet do not share several phenotypic characteristics associated with SLAM- and SAP-deficient mice. *J Immunol* *176*, 291-300.
- Griewank, K., Borowski, C., Rietdijk, S., Wang, N., Julien, A., Wei, D.G., Mamchak, A.A., Terhorst, C., and Bendelac, A. (2007). Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* *27*, 751-762.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* *21*, 589-601.
- Gu, C., Tangye, S.G., Sun, X., Luo, Y., Lin, Z., and Wu, J. (2006). The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP associates with PAK-interacting exchange factor and participates in T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 14447-14452.
- Gumperz, J.E., Miyake, S., Yamamura, T., and Brenner, M.B. (2002). Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *The Journal of experimental medicine* *195*, 625-636.
- Hao, Q.L. (2001). Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood* *97*, 3683-3690.

- Hare, N.J., Ma, C.S., Alvaro, F., Nichols, K.E., and Tangye, S.G. (2006). Missense mutations in SH2D1A identified in patients with X-linked lymphoproliferative disease differentially affect the expression and function of SAP. *International immunology* 18, 1055-1065.
- Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., Mattei, M.G., Luciani, M.F., and Golstein, P. (1991). CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147, 1037-1044.
- Harriague, J., and Bismuth, G. (2002). Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. *Nature immunology* 3, 1090-1096.
- Harrington, D.S., Weisenburger, D.D., and Purtilo, D.T. (1987). Malignant lymphoma in the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Cancer* 59, 1419-1429.
- Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Ishihara, C., Sakuma, M., Kobayashi, W., and Saito, T. (2010). T-cell receptor microclusters critical for T-cell activation are formed independently of lipid raft clustering. *Molecular and cellular biology* 30, 3421-3429.
- Haughn, L., Leung, B., Boise, L., Veillette, A., Thompson, C., and Julius, M. (1998). Interleukin 2-mediated uncoupling of T cell receptor alpha/beta from CD3 signaling. *The Journal of experimental medicine* 188, 1575-1586.
- Hayashi, K., and Altman, A. (2006). Filamin A is required for T cell activation mediated by protein kinase C-theta. *J Immunol* 177, 1721-1728.
- Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *The Journal of experimental medicine* 192, 1391-1402.
- Henning, G., Kraft, M.S., Derfuss, T., Pirzer, R., de Saint-Basile, G., Aversa, G., Fleckenstein, B., and Meinel, E. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *European journal of immunology* 31, 2741-2750.
- Henshall, T.L., Jones, K.L., Wilkinson, R., and Jackson, D.E. (2001). Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2, are required for platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD31-mediated inhibitory signaling. *J Immunol* 166, 3098-3106.
- Hislop, A.D., Palendira, U., Leese, A.M., Arkwright, P.D., Rohrlich, P.S., Tangye, S.G., Gaspar, H.B., Lankester, A.C., Moretta, A., and Rickinson, A.B. (2010). Impaired Epstein-Barr virus-specific CD8+ T-cell function in X-linked lymphoproliferative disease is restricted to SLAM family-positive B-cell targets. *Blood* 116, 3249-3257.
- Hodge, M.R., Ranger, A.M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1996). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4, 397-405.
- Holdorf, A.D., Green, J.M., Levin, S.D., Denny, M.F., Straus, D.B., Link, V., Changelian, P.S., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (1999). Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3

domain of Lck are required for T cell costimulation. *The Journal of experimental medicine* *190*, 375-384.

Horn, J., Wang, X., Reichardt, P., Stradal, T.E., Warnecke, N., Simeoni, L., Gunzer, M., Yablonski, D., Schraven, B., and Kliche, S. (2009). Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells. *J Immunol* *183*, 5756-5767.

Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S. (2004). Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cellular signalling* *16*, 1-11.

Houtman, J.C., Higashimoto, Y., Dimasi, N., Cho, S., Yamaguchi, H., Bowden, B., Regan, C., Malchiodi, E.L., Mariuzza, R., Schuck, P., *et al.* (2004). Binding specificity of multiprotein signaling complexes is determined by both cooperative interactions and affinity preferences. *Biochemistry* *43*, 4170-4178.

Howie, D., Simarro, M., Sayos, J., Guirado, M., Sancho, J., and Terhorst, C. (2002). Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* *99*, 957-965.

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

Hu, C.M., Jang, S.Y., Fanzo, J.C., and Pernis, A.B. (2002). Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. *The Journal of biological chemistry* *277*, 49238-49246.

Huang, G.N., Huso, D.L., Bouyain, S., Tu, J., McCorkell, K.A., May, M.J., Zhu, Y., Lutz, M., Collins, S., Dehoff, M., *et al.* (2008). NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins. *Science* *319*, 476-481.

Huck, K., Feyen, O., Niehues, T., Rüschemdorf, F., Hübner, N., Laws, H.-J., Teliëps, T., Knapp, S., Wacker, H.-H., Meindl, A., *et al.* (2009). Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *Journal of Clinical Investigation* *119*, 1350-1358.

Ilani, T., Khanna, C., Zhou, M., Veenstra, T.D., and Bretscher, A. (2007). Immune synapse formation requires ZAP-70 recruitment by ezrin and CD43 removal by moesin. *The Journal of cell biology* *179*, 733-746.

Irles, C., Symons, A., Michel, F., Bakker, T.R., van der Merwe, P.A., and Acuto, O. (2003). CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nature immunology* *4*, 189-197.

Irving, B.A., Chan, A.C., and Weiss, A. (1993). Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *The Journal of experimental medicine* *177*, 1093-1103.

- Isakov, N., Wange, R.L., Burgess, W.H., Watts, J.D., Aebersold, R., and Samelson, L.E. (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. *The Journal of experimental medicine* *181*, 375-380.
- Jacobs, S.R., Herman, C.E., Maciver, N.J., Wofford, J.A., Wieman, H.L., Hammen, J.J., and Rathmell, J.C. (2008). Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol* *180*, 4476-4486.
- Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T., and Rao, A. (1993). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* *365*, 352-355.
- Jiang, Y., and Cheng, H. (2007). Evidence of LAT as a dual substrate for Lck and Syk in T lymphocytes. *Leukemia research* *31*, 541-545.
- Jones, R.G., Elford, A.R., Parsons, M.J., Wu, L., Krawczyk, C.M., Yeh, W.C., Hakem, R., Rottapel, R., Woodgett, J.R., and Ohashi, P.S. (2002). CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *The Journal of experimental medicine* *196*, 335-348.
- Jores, R., Alzari, P.M., and Meo, T. (1990). Resolution of hypervariable regions in T-cell receptor beta chains by a modified Wu-Kabat index of amino acid diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 9138-9142.
- Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., and Pelletier, J.P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* *160*, 3513-3521.
- Kabouridis, P.S., Magee, A.I., and Ley, S.C. (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *The EMBO journal* *16*, 4983-4998.
- Kambayashi, T., Assarsson, E., Chambers, B.J., and Ljunggren, H.G. (2001). Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* *167*, 6706-6710.
- Katzav, S. (2009). Vav1: a hematopoietic signal transduction molecule involved in human malignancies. *The international journal of biochemistry & cell biology* *41*, 1245-1248.
- Kersh, E.N., Shaw, A.S., and Allen, P.M. (1998). Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* *281*, 572-575.
- Kiani, A., Viola, J.P., Lichtman, A.H., and Rao, A. (1997). Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* *7*, 849-860.

- Kim, H.H., Tharayil, M., and Rudd, C.E. (1998). Growth factor receptor-bound protein 2 SH2/SH3 domain binding to CD28 and its role in co-signaling. *The Journal of biological chemistry* 273, 296-301.
- Kim, P.W., Sun, Z.Y., Blacklow, S.C., Wagner, G., and Eck, M.J. (2003). A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science* 301, 1725-1728.
- Kingsbury, G.A., Feeney, L.A., Nong, Y., Calandra, S.A., Murphy, C.J., Corcoran, J.M., Wang, Y., Prabhu Das, M.R., Busfield, S.J., Fraser, C.C., and Villeval, J.L. (2001). Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol* 166, 5675-5680.
- Kingsmore, S.F., Souryal, C.A., Watson, M.L., Patel, D.D., and Seldin, M.F. (1995). Physical and genetic linkage of the genes encoding Ly-9 and CD48 on mouse and human chromosomes 1. *Immunogenetics* 42, 59-62.
- Kirchhoff, S., Muller, W.W., Li-Weber, M., and Krammer, P.H. (2000). Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *European journal of immunology* 30, 2765-2774.
- Kjer-Nielsen, L., Clements, C.S., Purcell, A.W., Brooks, A.G., Whisstock, J.C., Burrows, S.R., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2003). A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity* 18, 53-64.
- Kjer-Nielsen, L., Dunstone, M.A., Kostenko, L., Ely, L.K., Beddoe, T., Mifsud, N.A., Purcell, A.W., Brooks, A.G., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2004). Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7675-7680.
- Klem, J., Verrett, P.C., Kumar, V., and Schatzle, J.D. (2002). 2B4 is constitutively associated with linker for the activation of T cells in glycolipid-enriched microdomains: properties required for 2B4 lytic function. *J Immunol* 169, 55-62.
- Kong, K.F., Yokosuka, T., Canonigo-Balancio, A.J., Isakov, N., Saito, T., and Altman, A. (2011). A motif in the V3 domain of the kinase PKC-theta determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nature immunology* 12, 1105-1112.
- Koretzky, G.A., Abtahian, F., and Silverman, M.A. (2006). SLP-76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nature reviews. Immunology* 6, 67-78.
- Koretzky, G.A., and Myung, P.S. (2001). Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nature reviews. Immunology* 1, 95-107.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448, 484-487.

- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krogsgaard, M., Li, Q.J., Sumen, C., Huppa, J.B., Huse, M., and Davis, M.M. (2005). Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* 434, 238-243.
- Kuhns, M.S., Girvin, A.T., Klein, L.O., Chen, R., Jensen, K.D., Newell, E.W., Huppa, J.B., Lillemeier, B.F., Huse, M., Chien, Y.H., *et al.* (2010). Evidence for a functional sidedness to the alphabetaTCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5094-5099.
- Kumaresan, P.R., Lai, W.C., Chuang, S.S., Bennett, M., and Mathew, P.A. (2002). CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Molecular immunology* 39, 1-8.
- Kupfer, A., Swain, S.L., and Singer, S.J. (1987). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *The Journal of experimental medicine* 165, 1565-1580.
- Laan, M., Cui, Z.H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D.C., Skoogh, B.E., and Linden, A. (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 162, 2347-2352.
- Lappalainen, I., Giliani, S., Franceschini, R., Bonnefoy, J.Y., Duckett, C., Notarangelo, L.D., and Vihinen, M. (2000). Structural basis for SH2D1A mutations in X-linked lymphoproliferative disease. *Biochemical and biophysical research communications* 269, 124-130.
- Latour, S., Gish, G., Helgason, C.D., Humphries, R.K., Pawson, T., and Veillette, A. (2001). Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nature immunology* 2, 681-690.
- Latour, S., Roncagalli, R., Chen, R., Bakinowski, M., Shi, X., Schwartzberg, P.L., Davidson, D., and Veillette, A. (2003). Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nature cell biology* 5, 149-154.
- Latour, S., and Veillette, A. (2004). The SAP family of adaptors in immune regulation. *Seminars in immunology* 16, 409-419.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., and Paul, W.E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine* 172, 921-929.
- Lee, C., Kang, H.S., Chung, J.K., Sekiya, F., Kim, J.R., Han, J.S., Kim, S.R., Bae, Y.S., Morris, A.J., and Rhee, S.G. (1997). Inhibition of phospholipase D by clathrin assembly protein 3 (AP3). *The Journal of biological chemistry* 272, 15986-15992.

- Lee, D.U., Avni, O., Chen, L., and Rao, A. (2004). A distal enhancer in the interferon-gamma (IFN-gamma) locus revealed by genome sequence comparison. *The Journal of biological chemistry* 279, 4802-4810.
- Lee, J.K., Mathew, S.O., Vaidya, S.V., Kumaresan, P.R., and Mathew, P.A. (2007). CS1 (CRACC, CD319) induces proliferation and autocrine cytokine expression on human B lymphocytes. *J Immunol* 179, 4672-4678.
- Lee, K.H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., Wang, J., *et al.* (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 302, 1218-1222.
- Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (2002a). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.
- Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002b). Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *The Journal of experimental medicine* 195, 637-641.
- Leonard, W.J., and Spolski, R. (2005). Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature reviews. Immunology* 5, 688-698.
- Lesslauer, W., Koning, F., Ottenhoff, T., Giphart, M., Goulmy, E., and van Rood, J.J. (1986). T90/44 (9.3 antigen). A cell surface molecule with a function in human T cell activation. *European journal of immunology* 16, 1289-1296.
- Lewis, J., Eiben, L.J., Nelson, D.L., Cohen, J.I., Nichols, K.E., Ochs, H.D., Notarangelo, L.D., and Duckett, C.S. (2001). Distinct interactions of the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP with cytoplasmic domains of members of the CD2 receptor family. *Clin Immunol* 100, 15-23.
- Li, B., Tournier, C., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (1999a). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *The EMBO journal* 18, 420-432.
- Li, C., Chung, B., Tao, J., Iosef, C., Aoukaty, A., Wang, Y., Tan, R., and Li, S.S. (2008). The X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP regulates B cell function through the FcgammaRIIB receptor. *Cellular signalling* 20, 1960-1967.
- Li, C., Iosef, C., Jia, C.Y., Gkourasas, T., Han, V.K., and Shun-Cheng Li, S. (2003). Disease-causing SAP mutants are defective in ligand binding and protein folding. *Biochemistry* 42, 14885-14892.
- Li, C., Schibli, D., and Li, S.S. (2009). The XLP syndrome protein SAP interacts with SH3 proteins to regulate T cell signaling and proliferation. *Cellular signalling* 21, 111-119.
- Li, C.R., and Berg, L.J. (2005). Itk is not essential for CD28 signaling in naive T cells. *J Immunol* 174, 4475-4479.

- Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26, 579-591.
- Li, S.C., Gish, G., Yang, D., Coffey, A.J., Forman-Kay, J.D., Ernberg, I., Kay, L.E., and Pawson, T. (1999b). Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A. *Current biology* : CB 9, 1355-1362.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., *et al.* (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180, 5916-5926.
- Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* 203, 2271-2279.
- Lin, J., and Weiss, A. (2003). The tyrosine phosphatase CD148 is excluded from the immunologic synapse and down-regulates prolonged T cell signaling. *The Journal of cell biology* 162, 673-682.
- Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *The Journal of experimental medicine* 194, 127-134.
- Lindholm, C.K., Gylfe, E., Zhang, W., Samelson, L.E., and Welsh, M. (1999). Requirement of the Src homology 2 domain protein Shb for T cell receptor-dependent activation of the interleukin-2 gene nuclear factor for activation of T cells element in Jurkat T cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 28050-28057.
- Lindholm, C.K., Henriksson, M.L., Hallberg, B., and Welsh, M. (2002). Shb links SLP-76 and Vav with the CD3 complex in Jurkat T cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 269, 3279-3288.
- Lindstedt, R., Monk, N., Lombardi, G., and Lechler, R. (2001). Amino acid substitutions in the putative MHC class II "dimer of dimers" interface inhibit CD4+ T cell activation. *J Immunol* 166, 800-808.
- Lindsten, T., Seeley, J.K., Ballow, M., Sakamoto, K., St Onge, S., Yetz, J., Aman, P., and Purtilo, D.T. (1982). Immune deficiency in the X-linked lymphoproliferative syndrome. II. Immunoregulatory T cell defects. *J Immunol* 129, 2536-2540.
- Linsley, P.S., Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5031-5035.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9301-9306.

- Lioudyno, M.I., Kozak, J.A., Penna, A., Safrina, O., Zhang, S.L., Sen, D., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2008). Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 2011-2016.
- Liu, S.K., Fang, N., Koretzky, G.A., and McGlade, C.J. (1999). The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Current biology : CB* *9*, 67-75.
- Lopez-Rodriguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A.S., and Rao, A. (1999). NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 7214-7219.
- Lu, T.T., Barreuther, M., Davis, S., and Madri, J.A. (1997). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is phosphorylatable by c-Src, binds Src-Src homology 2 domain, and exhibits immunoreceptor tyrosine-based activation motif-like properties. *The Journal of biological chemistry* *272*, 14442-14446.
- Luescher, I.F., Vivier, E., Layer, A., Mahiou, J., Godeau, F., Malissen, B., and Romero, P. (1995). CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* *373*, 353-356.
- Ma, C.S., Nichols, K.E., and Tangye, S.G. (2007). Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annual review of immunology* *25*, 337-379.
- Ma, C.S., Pittaluga, S., Avery, D.T., Hare, N.J., Maric, I., Klion, A.D., Nichols, K.E., and Tangye, S.G. (2006). Selective generation of functional somatically mutated IgM+CD27+, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *The Journal of clinical investigation* *116*, 322-333.
- Ma, Z., Sharp, K.A., Janmey, P.A., and Finkel, T.H. (2008). Surface-anchored monomeric agonist pMHCs alone trigger TCR with high sensitivity. *PLoS biology* *6*, e43.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* *20*, 2476-2489.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* *441*, 231-234.
- Marengere, L.E., Okkenhaug, K., Clavreul, A., Couez, D., Gibson, S., Mills, G.B., Mak, T.W., and Rottapel, R. (1997). The SH3 domain of Itk/Etk binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of the T cell costimulatory receptor CD28. *J Immunol* *159*, 3220-3229.
- Marti, F., Garcia, G.G., Lapinski, P.E., MacGregor, J.N., and King, P.D. (2006). Essential role of the T cell-specific adapter protein in the activation of LCK in peripheral T cells. *The Journal of experimental medicine* *203*, 281-287.

- Martin, M., Del Valle, J.M., Saborit, I., and Engel, P. (2005). Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J Immunol* *174*, 5977-5986.
- Martin, M., Romero, X., de la Fuente, M.A., Tovar, V., Zapater, N., Esplugues, E., Pizcueta, P., Bosch, J., and Engel, P. (2001). CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J Immunol* *167*, 3668-3676.
- Masuda, M., Osawa, M., Shigematsu, H., Harada, N., and Fujiwara, K. (1997). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a major SH-PTP2 binding protein in vascular endothelial cells. *FEBS letters* *408*, 331-336.
- Matsumoto, R., Wang, D., Blonska, M., Li, H., Kobayashi, M., Pappu, B., Chen, Y., Wang, D., and Lin, X. (2005). Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* *23*, 575-585.
- McCausland, M.M., Yusuf, I., Tran, H., Ono, N., Yanagi, Y., and Crotty, S. (2007). SAP regulation of follicular helper CD4 T cell development and humoral immunity is independent of SLAM and Fyn kinase. *J Immunol* *178*, 817-828.
- McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J., and Cua, D.J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature immunology* *10*, 314-324.
- Melowic, H.R., Stahelin, R.V., Blatner, N.R., Tian, W., Hayashi, K., Altman, A., and Cho, W. (2007). Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Ctheta. *The Journal of biological chemistry* *282*, 21467-21476.
- Mingueneau, M., Sansoni, A., Gregoire, C., Roncagalli, R., Aguado, E., Weiss, A., Malissen, M., and Malissen, B. (2008). The proline-rich sequence of CD3epsilon controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4+CD8+ thymocytes. *Nature immunology* *9*, 522-532.
- Minguet, S., and Schamel, W.W. (2008). A permissive geometry model for TCR-CD3 activation. *Trends in biochemical sciences* *33*, 51-57.
- Miyakawa, H., Woo, S.K., Dahl, S.C., Handler, J.S., and Kwon, H.M. (1999). Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 2538-2542.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869-877.
- Morra, M., Howie, D., Grande, M.S., Sayos, J., Wang, N., Wu, C., Engel, P., and Terhorst, C. (2001a). X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annual review of immunology* *19*, 657-682.

- Morra, M., Lu, J., Poy, F., Martin, M., Sayos, J., Calpe, S., Gullo, C., Howie, D., Rietdijk, S., Thompson, A., *et al.* (2001b). Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *The EMBO journal* *20*, 5840-5852.
- Morra, M., Simarro-Grande, M., Martin, M., Chen, A.S., Lanyi, A., Silander, O., Calpe, S., Davis, J., Pawson, T., Eck, M.J., *et al.* (2001c). Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *The Journal of biological chemistry* *276*, 36809-36816.
- Muller, W.A., Ratti, C.M., McDonnell, S.L., and Cohn, Z.A. (1989). A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *The Journal of experimental medicine* *170*, 399-414.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., and Phillips, D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *The Journal of experimental medicine* *178*, 449-460.
- Munitz, A., Bachelet, I., Fraenkel, S., Katz, G., Mandelboim, O., Simon, H.U., Moretta, L., Colonna, M., and Levi-Schaffer, F. (2005). 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* *174*, 110-118.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* *115*, 377-388.
- Nagy, N., Cerboni, C., Mattsson, K., Maeda, A., Gogolak, P., Sumegi, J., Lanyi, A., Szekely, L., Carbone, E., Klein, G., and Klein, E. (2000). SH2D1A and SLAM protein expression in human lymphocytes and derived cell lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer* *88*, 439-447.
- Nagy, N., Maeda, A., Bandobashi, K., Kis, L.L., Nishikawa, J., Trivedi, P., Faggioni, A., Klein, G., and Klein, E. (2002a). SH2D1A expression in Burkitt lymphoma cells is restricted to EBV positive group I lines and is downregulated in parallel with immunoblastic transformation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* *100*, 433-440.
- Nagy, N., Matskova, L., Hellman, U., Klein, G., and Klein, E. (2009). The apoptosis modulating role of SAP (SLAM associated protein) contributes to the symptomatology of the X linked lymphoproliferative disease. *Cell Cycle* *8*, 3086-3090.
- Nagy, N., Mattsson, K., Maeda, A., Liu, A., Szekely, L., and Klein, E. (2002b). The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP is expressed in activated T and NK cells. *Immunology letters* *82*, 141-147.
- Nanda, N., Andre, P., Bao, M., Clauser, K., Deguzman, F., Howie, D., Conley, P.B., Terhorst, C., and Phillips, D.R. (2005). Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood* *106*, 3028-3034.
- Narayan, P., Holt, B., Tosti, R., and Kane, L.P. (2006). CARMA1 is required for Akt-mediated NF-kappaB activation in T cells. *Molecular and cellular biology* *26*, 2327-2336.

- Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A.C., and Loh, D.Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376, 435-438.
- Newman, D.K., Hamilton, C., and Newman, P.J. (2001). Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck). *Blood* 97, 2351-2357.
- Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., 2nd, Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247, 1219-1222.
- Newman, P.J., and Newman, D.K. (2003). Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 953-964.
- Newton-Nash, D.K., and Newman, P.J. (1999). A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction. *J Immunol* 163, 682-688.
- Nichols, K.E., Harkin, D.P., Levitz, S., Krainer, M., Kolquist, K.A., Genovese, C., Bernard, A., Ferguson, M., Zuo, L., Snyder, E., *et al.* (1998). Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13765-13770.
- Nichols, K.E., Hom, J., Gong, S.Y., Ganguly, A., Ma, C.S., Cannons, J.L., Tangye, S.G., Schwartzberg, P.L., Koretzky, G.A., and Stein, P.L. (2005a). Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nature medicine* 11, 340-345.
- Nichols, K.E., Ma, C.S., Cannons, J.L., Schwartzberg, P.L., and Tangye, S.G. (2005b). Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunological reviews* 203, 180-199.
- Nunez-Cruz, S., Yeo, W.C., Rothman, J., Ojha, P., Bassiri, H., Juntilla, M., Davidson, D., Veillette, A., Koretzky, G.A., and Nichols, K.E. (2008). Differential requirement for the SAP-Fyn interaction during NK T cell development and function. *J Immunol* 181, 2311-2320.
- Okamoto, S., Ji, H., Howie, D., Clarke, K., Gullo, C., Manning, S., Coyle, A.J., and Terhorst, C. (2004). Expression of the SH2D1A gene is regulated by a combination of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *European journal of immunology* 34, 3176-3186.
- Okkenhaug, K., and Rottapel, R. (1998). Grb2 forms an inducible protein complex with CD28 through a Src homology 3 domain-proline interaction. *The Journal of biological chemistry* 273, 21194-21202.
- Okkenhaug, K., Wu, L., Garza, K.M., La Rose, J., Khoo, W., Odermatt, B., Mak, T.W., Ohashi, P.S., and Rottapel, R. (2001). A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nature immunology* 2, 325-332.

- Onodera, H., Motto, D.G., Koretzky, G.A., and Rothstein, D.M. (1996). Differential regulation of activation-induced tyrosine phosphorylation and recruitment of SLP-76 to Vav by distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 271, 22225-22230.
- Osman, N., Turner, H., Lucas, S., Reif, K., and Cantrell, D.A. (1996). The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains. *European journal of immunology* 26, 1063-1068.
- Ostrakhovitch, E.A., and Li, S.S. (2006). The role of SLAM family receptors in immune cell signaling. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 84, 832-843.
- Ostrakhovitch, E.A., Wang, Y., and Li, S.S. (2009). SAP binds to CD22 and regulates B cell inhibitory signaling and calcium flux. *Cellular signalling* 21, 540-550.
- Oukka, M., Ho, I.C., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 9, 295-304.
- Pages, F., Ragueneau, M., Rottapel, R., Truneh, A., Nunes, J., Imbert, J., and Olive, D. (1994). Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* 369, 327-329.
- Pardo, J., Perez-Galan, P., Gamen, S., Marzo, I., Monleon, I., Kaspar, A.A., Susin, S.A., Kroemer, G., Krensky, A.M., Naval, J., and Anel, A. (2001). A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* 167, 1222-1229.
- Park, J., Yaseen, N.R., Hogan, P.G., Rao, A., and Sharma, S. (1995). Phosphorylation of the transcription factor NFATp inhibits its DNA binding activity in cyclosporin A-treated human B and T cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 20653-20659.
- Parolini, S., Bottino, C., Falco, M., Augugliaro, R., Giliani, S., Franceschini, R., Ochs, H.D., Wolf, H., Bonnefoy, J.Y., Biassoni, R., *et al.* (2000). X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *The Journal of experimental medicine* 192, 337-346.
- Pasquier, B., Yin, L., Fondaneche, M.C., Relouzat, F., Bloch-Queyrat, C., Lambert, N., Fischer, A., de Saint-Basile, G., and Latour, S. (2005). Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *The Journal of experimental medicine* 201, 695-701.
- Paul, W.E., and Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology* 10, 225-235.
- Paz, P.E., Wang, S., Clarke, H., Lu, X., Stokoe, D., and Abo, A. (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. *The Biochemical journal* 356, 461-471.

- Peach, R.J., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J., and Linsley, P.S. (1994). Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *The Journal of experimental medicine* *180*, 2049-2058.
- Pellicci, D.G., Hammond, K.J., Uldrich, A.P., Baxter, A.G., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2002). A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *The Journal of experimental medicine* *195*, 835-844.
- Peng, S.L., Gerth, A.J., Ranger, A.M., and Glimcher, L.H. (2001). NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* *14*, 13-20.
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* *456*, 116-120.
- Perez-Villar, J.J., Whitney, G.S., Sitnick, M.T., Dunn, R.J., Venkatesan, S., O'Day, K., Schieven, G.L., Lin, T.A., and Kanner, S.B. (2002). Phosphorylation of the linker for activation of T-cells by Itk promotes recruitment of Vav. *Biochemistry* *41*, 10732-10740.
- Poy, F., Yaffe, M.B., Sayos, J., Saxena, K., Morra, M., Sumegi, J., Cantley, L.C., Terhorst, C., and Eck, M.J. (1999). Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Molecular cell* *4*, 555-561.
- Prasad, K.V., Cai, Y.C., Raab, M., Duckworth, B., Cantley, L., Shoelson, S.E., and Rudd, C.E. (1994). T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 2834-2838.
- Privratsky, J.R., Newman, D.K., and Newman, P.J. (2010). PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life sciences* *87*, 69-82.
- Pumphrey, N.J., Taylor, V., Freeman, S., Douglas, M.R., Bradfield, P.F., Young, S.P., Lord, J.M., Wakelam, M.J., Bird, I.N., Salmon, M., and Buckley, C.D. (1999). Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C-gamma1 with PECAM-1/CD31. *FEBS letters* *450*, 77-83.
- Punnonen, J., Cocks, B.G., Carballido, J.M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G., and de Vries, J.E. (1997). Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *185*, 993-1004.
- Purtilo, D.T., Cassel, C.K., Yang, J.P., and Harper, R. (1975). X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* *1*, 935-940.
- Purtilo, D.T., Sakamoto, K., Barnabei, V., Seeley, J., Bechtold, T., Rogers, G., Yetz, J., and Harada, S. (1982). Epstein-Barr virus-induced diseases in boys with the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP): update on studies of the registry. *The American journal of medicine* *73*, 49-56.

- Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764-769.
- Qiao, G., Li, Z., Molinero, L., Alegre, M.L., Ying, H., Sun, Z., Penninger, J.M., and Zhang, J. (2008). T-cell receptor-induced NF-kappaB activation is negatively regulated by E3 ubiquitin ligase Cbl-b. *Molecular and cellular biology* 28, 2470-2480.
- Quiroga, M.F., Jurado, J.O., Martinez, G.J., Pasquinelli, V., Musella, R.M., Abbate, E., Issekutz, A.C., Bracco, M.M., Malbran, A., Sieling, P.A., *et al.* (2007). Cross-talk between CD31 and the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein during interferon- gamma production against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of infectious diseases* 196, 1369-1378.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., *et al.* (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600-603.
- Raab, M., Cai, Y.C., Bunnell, S.C., Heyeck, S.D., Berg, L.J., and Rudd, C.E. (1995). p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8891-8895.
- Radvanyi, L.G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G.B., and Miller, R.G. (1996). CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 156, 1788-1798.
- Randriamampita, C., Mouchacca, P., Malissen, B., Marguet, D., Trautmann, A., and Lellouch, A.C. (2008). A novel ZAP-70 dependent FRET based biosensor reveals kinase activity at both the immunological synapse and the antisynapse. *PloS one* 3, e1521.
- Ranger, A.M., Oukka, M., Rengarajan, J., and Glimcher, L.H. (1998). Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 9, 627-635.
- Reedquist, K.A., Ross, E., Koop, E.A., Wolthuis, R.M., Zwartkruis, F.J., van Kooyk, Y., Salmon, M., Buckley, C.D., and Bos, J.L. (2000). The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *The Journal of cell biology* 148, 1151-1158.
- Rengarajan, J. (2002). Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) Interacts with NFATc2 to Modulate Interleukin 4 Gene Expression. *Journal of Experimental Medicine* 195, 1003-1012.
- Rengarajan, J., Tang, B., and Glimcher, L.H. (2002). NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells. *Nature immunology* 3, 48-54.
- Res, P., Martinez-Caceres, E., Cristina Jaleco, A., Staal, F., Noteboom, E., Weijer, K., and Spits, H. (1996). CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T,

natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 87, 5196-5206.

Rethi, B., Gogolak, P., Szatmari, I., Veres, A., Erdos, E., Nagy, L., Rajnavolgyi, E., Terhorst, C., and Lanyi, A. (2006). SLAMF8/SLAMF8 interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 107, 2821-2829.

Reynolds, L.F., Smyth, L.A., Norton, T., Freshney, N., Downward, J., Kioussis, D., and Tybulewicz, V.L. (2002). Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *The Journal of experimental medicine* 195, 1103-1114.

Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.

Rigaud, S., Fondaneche, M.C., Lambert, N., Pasquier, B., Mateo, V., Soulas, P., Galicier, L., Le Deist, F., Rieux-Laucat, F., Revy, P., *et al.* (2006). XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 444, 110-114.

Risueno, R.M., Schamel, W.W., and Alarcon, B. (2008). T cell receptor engagement triggers its CD3epsilon and CD3zeta subunits to adopt a compact, locked conformation. *PloS one* 3, e1747.

Rivero-Lezcano, O.M., Marcilla, A., Sameshima, J.H., and Robbins, K.C. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Molecular and cellular biology* 15, 5725-5731.

Roberts, T.J., Lin, Y., Spence, P.M., Van Kaer, L., and Brutkiewicz, R.R. (2004). CD1d1-dependent control of the magnitude of an acute antiviral immune response. *J Immunol* 172, 3454-3461.

Roda-Navarro, P., Mittelbrunn, M., Ortega, M., Howie, D., Terhorst, C., Sanchez-Madrid, F., and Fernandez-Ruiz, E. (2004). Dynamic redistribution of the activating 2B4/SAP complex at the cytotoxic NK cell immune synapse. *J Immunol* 173, 3640-3646.

Romashkova, J.A., and Makarov, S.S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90.

Romero, X., Zapater, N., Calvo, M., Kalko, S.G., de la Fuente, M.A., Tovar, V., Ockeloen, C., Pizcueta, P., and Engel, P. (2005). CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse. *J Immunol* 174, 7033-7042.

Roncagalli, R., Taylor, J.E., Zhang, S., Shi, X., Chen, R., Cruz-Munoz, M.E., Yin, L., Latour, S., and Veillette, A. (2005). Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nature immunology* 6, 1002-1010.

Roose, J.P., Mollenauer, M., Gupta, V.A., Stone, J., and Weiss, A. (2005). A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Molecular and cellular biology* 25, 4426-4441.

- Roose, J.P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T., and Weiss, A. (2007). Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes. *Molecular and cellular biology* 27, 2732-2745.
- Rothenberg, M.E., and Hogan, S.P. (2006). The eosinophil. *Annual review of immunology* 24, 147-174.
- Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews* 229, 12-26.
- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology* 24, 419-466.
- Rui, Y., Liu, X., Li, N., Jiang, Y., Chen, G., Cao, X., and Wang, J. (2007). PECAM-1 ligation negatively regulates TLR4 signaling in macrophages. *J Immunol* 179, 7344-7351.
- Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* 20, 323-370.
- Rutledge, T., Cosson, P., Manolios, N., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. (1992). Transmembrane helical interactions: zeta chain dimerization and functional association with the T cell antigen receptor. *The EMBO journal* 11, 3245-3254.
- Sachs, U.J., Andrei-Selmer, C.L., Maniar, A., Weiss, T., Paddock, C., Orlova, V.V., Choi, E.Y., Newman, P.J., Preissner, K.T., Chavakis, T., and Santoso, S. (2007). The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *The Journal of biological chemistry* 282, 23603-23612.
- Sad, S., Marcotte, R., and Mosmann, T.R. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2, 271-279.
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266, 1208-1212.
- Sanchez-Lockhart, M., Graf, B., and Miller, J. (2008). Signals and sequences that control CD28 localization to the central region of the immunological synapse. *J Immunol* 181, 7639-7648.
- Sandrin, M.S., Gumley, T.P., Henning, M.M., Vaughan, H.A., Gonez, L.J., Trapani, J.A., and McKenzie, I.F. (1992). Isolation and characterization of cDNA clones for mouse Ly-9. *J Immunol* 149, 1636-1641.
- Sanzone, S., Zeyda, M., Saemann, M.D., Soncini, M., Holter, W., Fritsch, G., Knapp, W., Candotti, F., Stulnig, T.M., and Parolini, O. (2003). SLAM-associated protein deficiency causes imbalanced early signal transduction and blocks downstream activation in T cells from X-linked lymphoproliferative disease patients. *The Journal of biological chemistry* 278, 29593-29599.

- Savignac, M., Mellstrom, B., and Naranjo, J.R. (2007). Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454, 523-533.
- Sayos, J., Martin, M., Chen, A., Simarro, M., Howie, D., Morra, M., Engel, P., and Terhorst, C. (2001). Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* 97, 3867-3874.
- Sayos, J., Nguyen, K.B., Wu, C., Stepp, S.E., Howie, D., Schatzle, J.D., Kumar, V., Biron, C.A., and Terhorst, C. (2000). Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *International immunology* 12, 1749-1757.
- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M.G., *et al.* (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395, 462-469.
- Schmidt, A., Oberle, N., and Krammer, P.H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology* 3, 51.
- Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2004). Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of experimental medicine* 200, 469-479.
- Schneider, H., and Rudd, C.E. (2008). CD28 and Grb-2, relative to Gads or Grap, preferentially co-operate with Vav1 in the activation of NFAT/AP-1 transcription. *Biochemical and biophysical research communications* 369, 616-621.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schumann, J., Pittoni, P., Tonti, E., Macdonald, H.R., Dellabona, P., and Casorati, G. (2005). Targeted expression of human CD1d in transgenic mice reveals independent roles for thymocytes and thymic APCs in positive and negative selection of Valpha14i NKT cells. *J Immunol* 175, 7303-7310.
- Schuster, V., and Kreth, H.W. (2000). X-linked lymphoproliferative disease is caused by deficiency of a novel SH2 domain-containing signal transduction adaptor protein. *Immunological reviews* 178, 21-28.
- Seemayer, T.A., Grierson, H., Pirruccello, S.J., Gross, T.G., Weisenburger, D.D., Davis, J., Spiegel, K., Brichacek, B., and Sumegi, J. (1993). X-linked lymphoproliferative disease. *Am J Dis Child* 147, 1242-1245.
- Seemayer, T.A., Gross, T.G., Egeler, R.M., Pirruccello, S.J., Davis, J.R., Kelly, C.M., Okano, M., Lanyi, A., and Sumegi, J. (1995). X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatric research* 38, 471-478.

- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., and Mak, T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.
- Sharifi, R., Sinclair, J.C., Gilmour, K.C., Arkwright, P.D., Kinnon, C., Thrasher, A.J., and Gaspar, H.B. (2004). SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 103, 3821-3827.
- Shenoy-Scaria, A.M., Gauen, L.K., Kwong, J., Shaw, A.S., and Lublin, D.M. (1993). Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Molecular and cellular biology* 13, 6385-6392.
- Shim, E.K., Moon, C.S., Lee, G.Y., Ha, Y.J., Chae, S.K., and Lee, J.R. (2004). Association of the Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kD (SLP-76) with the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *FEBS letters* 575, 35-40.
- Shinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K., Murphy, K.M., Loh, D.Y., Reinherz, E.L., and Alt, F.W. (1993). Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259, 822-825.
- Shinozaki, K., Kanegane, H., Matsukura, H., Sumazaki, R., Tsuchida, M., Makita, M., Kimoto, Y., Kanai, R., Tsumura, K., Kondoh, T., *et al.* (2002). Activation-dependent T cell expression of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SLAM-associated protein and its assessment for patient detection. *International immunology* 14, 1215-1223.
- Shlapatska, L.M., Mikhalap, S.V., Berdova, A.G., Zelensky, O.M., Yun, T.J., Nichols, K.E., Clark, E.A., and Sidorenko, S.P. (2001). CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol* 166, 5480-5487.
- Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunological reviews* 247, 52-63.
- Sicheri, F., and Kuriyan, J. (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Current opinion in structural biology* 7, 777-785.
- Sidorenko, S.P., and Clark, E.A. (1993). Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol* 151, 4614-4624.
- Simarro, M., Lanyi, A., Howie, D., Poy, F., Bruggeman, J., Choi, M., Sumegi, J., Eck, M.J., and Terhorst, C. (2004). SAP increases FynT kinase activity and is required for phosphorylation of SLAM and Ly9. *International immunology* 16, 727-736.
- Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2000). 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *European journal of immunology* 30, 787-793.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annual review of immunology* 27, 591-619.

Snapper, C.M., McIntyre, T.M., Mandler, R., Pecanha, L.M., Finkelman, F.D., Lees, A., and Mond, J.J. (1992). Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *The Journal of experimental medicine* 175, 1367-1371.

Snapper, C.M., and Paul, W.E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944-947.

Snow, A.L., Marsh, R.A., Krummey, S.M., Roehrs, P., Young, L.R., Zhang, K., van Hoff, J., Dhar, D., Nichols, K.E., Filipovich, A.H., *et al.* (2009). Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *The Journal of clinical investigation* 119, 2976-2989.

Sommer, K., Guo, B., Pomerantz, J.L., Bandaranayake, A.D., Moreno-Garcia, M.E., Ovechkina, Y.L., and Rawlings, D.J. (2005). Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity* 23, 561-574.

Sperling, A.I., Auger, J.A., Ehst, B.D., Rulifson, I.C., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J Immunol* 157, 3909-3917.

Spits, H. (2002). Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nature reviews. Immunology* 2, 760-772.

Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching. *Current opinion in immunology* 8, 199-205.

Stout, R.D., Suttles, J., Xu, J., Grewal, I.S., and Flavell, R.A. (1996). Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol* 156, 8-11.

Sumegi, J., Huang, D., Lanyi, A., Davis, J.D., Seemayer, T.A., Maeda, A., Klein, G., Seri, M., Wakiguchi, H., Purtilo, D.T., and Gross, T.G. (2000). Correlation of mutations of the SH2D1A gene and epstein-barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 96, 3118-3125.

Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P., and Chen, Z.J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Molecular cell* 14, 289-301.

Sun, Z.J., Kim, K.S., Wagner, G., and Reinherz, E.L. (2001). Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. *Cell* 105, 913-923.

Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145, 3796-3806.

Takahashi, T., Chiba, S., Nieda, M., Azuma, T., Ishihara, S., Shibata, Y., Juji, T., and Hirai, H. (2002). Cutting edge: analysis of human V alpha 24+CD8+ NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 168, 3140-3144.

- Takatsu, K., Tominaga, A., and Hamaoka, T. (1980). Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). I. Functional characterization of a TRF-producing helper T cell subset and genetic studies on TRF production. *J Immunol* *124*, 2414-2422.
- Tangye, S.G., Lazetic, S., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol* *162*, 6981-6985.
- Tangye, S.G., Nichols, K.E., Hare, N.J., and van de Weerd, B.C. (2003). Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J Immunol* *171*, 2485-2495.
- Tangye, S.G., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2000a). The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Seminars in immunology* *12*, 149-157.
- Tangye, S.G., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Nichols, K.E. (2000b). Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol* *165*, 2932-2936.
- Tassi, I., and Colonna, M. (2005). The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase Cgamma signaling pathways in human NK cells. *J Immunol* *175*, 7996-8002.
- Tavano, R., Contento, R.L., Baranda, S.J., Soligo, M., Tuosto, L., Manes, S., and Viola, A. (2006). CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nature cell biology* *8*, 1270-1276.
- Thomas, D.A., Du, C., Xu, M., Wang, X., and Ley, T.J. (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* *12*, 621-632.
- Thompson, A.D., Braun, B.S., Arvand, A., Stewart, S.D., May, W.A., Chen, E., Korenberg, J., and Denny, C. (1996). EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* *13*, 2649-2658.
- Thorley-Lawson, D.A., Schooley, R.T., Bhan, A.K., and Nadler, L.M. (1982). Epstein-Barr virus superinduces a new human B cell differentiation antigen (B-LAST 1) expressed on transformed lymphoblasts. *Cell* *30*, 415-425.
- Trautmann, A., and Randriamampita, C. (2003). Initiation of TCR signalling revisited. *Trends in immunology* *24*, 425-428.
- Truitt, K.E., Hicks, C.M., and Imboden, J.B. (1994). Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *The Journal of experimental medicine* *179*, 1071-1076.
- Turner, J.M., Brodsky, M.H., Irving, B.A., Levin, S.D., Perlmutter, R.M., and Littman, D.R. (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* *60*, 755-765.

- Valdez, P.A., Wang, H., Seshasayee, D., van Lookeren Campagne, M., Gurney, A., Lee, W.P., and Grewal, I.S. (2004). NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *The Journal of biological chemistry* 279, 18662-18669.
- Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* 27, 693-733.
- van den Elsen, P.J. (2011). Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. *Frontiers in immunology* 2, 48.
- van der Merwe, P.A., and Dushek, O. (2011). Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nature reviews. Immunology* 11, 47-55.
- van Oers, N.S., Killeen, N., and Weiss, A. (1996a). Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 183, 1053-1062.
- van Oers, N.S., Lowin-Kropf, B., Finlay, D., Connolly, K., and Weiss, A. (1996b). alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* 5, 429-436.
- van Oers, N.S., Tohlen, B., Malissen, B., Moomaw, C.R., Afendis, S., and Slaughter, C.A. (2000). The 21- and 23-kD forms of TCR zeta are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nature immunology* 1, 322-328.
- van Oers, N.S., von Boehmer, H., and Weiss, A. (1995). The pre-T cell receptor (TCR) complex is functionally coupled to the TCR-zeta subunit. *The Journal of experimental medicine* 182, 1585-1590.
- Vaporciyan, A.A., DeLisser, H.M., Yan, H.C., Mendiguren, II, Thom, S.R., Jones, M.L., Ward, P.A., and Albelda, S.M. (1993). Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 262, 1580-1582.
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M.L. (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 25, 117-127.
- Veillette, A. (2006). Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nature reviews. Immunology* 6, 56-66.
- Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., and Bolen, J.B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55, 301-308.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* 6, 338-344.
- Wang, J.H., Meijers, R., Xiong, Y., Liu, J.H., Sakihama, T., Zhang, R., Joachimiak, A., and Reinherz, E.L. (2001). Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10799-10804.

- Wang, N., Calpe, S., Westcott, J., Castro, W., Ma, C., Engel, P., Schatzle, J.D., and Terhorst, C. (2010). Cutting edge: The adapters EAT-2A and -2B are positive regulators of CD244- and CD84-dependent NK cell functions in the C57BL/6 mouse. *J Immunol* *185*, 5683-5687.
- Wang, N., Satoskar, A., Faubion, W., Howie, D., Okamoto, S., Feske, S., Gullo, C., Clarke, K., Sosa, M.R., Sharpe, A.H., and Terhorst, C. (2004). The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *The Journal of experimental medicine* *199*, 1255-1264.
- Wegener, A.M., Letourneur, F., Hoeveler, A., Brocker, T., Luton, F., and Malissen, B. (1992). The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* *68*, 83-95.
- Welsh, M., Songyang, Z., Frantz, J.D., Trub, T., Reedquist, K.A., Karlsson, T., Miyazaki, M., Cantley, L.C., Band, H., and Shoelson, S.E. (1998). Stimulation through the T cell receptor leads to interactions between SHB and several signaling proteins. *Oncogene* *16*, 891-901.
- Wilkinson, R., Lyons, A.B., Roberts, D., Wong, M.X., Bartley, P.A., and Jackson, D.E. (2002). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease. *Blood* *100*, 184-193.
- Wong, M.X., Roberts, D., Bartley, P.A., and Jackson, D.E. (2002). Absence of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) leads to increased severity of local and systemic IgE-mediated anaphylaxis and modulation of mast cell activation. *J Immunol* *168*, 6455-6462.
- Woodruff, P.G., Modrek, B., Choy, D.F., Jia, G., Abbas, A.R., Ellwanger, A., Koth, L.L., Arron, J.R., and Fahy, J.V. (2009). T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* *180*, 388-395.
- Wu, C., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Wang, N., Gullo, C., Howie, D., Sosa, M.R., Edwards, M.J., Borrow, P., Satoskar, A.R., *et al.* (2001). SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nature immunology* *2*, 410-414.
- Wu, C., Sayos, J., Wang, N., Howie, D., Coyle, A., and Terhorst, C. (2000). Genomic organization and characterization of mouse SAP, the gene that is altered in X-linked lymphoproliferative disease. *Immunogenetics* *51*, 805-815.
- Wu, J., Motto, D.G., Koretzky, G.A., and Weiss, A. (1996a). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* *4*, 593-602.
- Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1996b). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *The Journal of experimental medicine* *184*, 903-911.
- Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M., and Lewis, R.S. (2006a). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *The Journal of cell biology* *174*, 803-813.

- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., *et al.* (2006b). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* *126*, 375-387.
- Wunderlich, L., Farago, A., Downward, J., and Buday, L. (1999). Association of Nck with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in activated T lymphocytes. *European journal of immunology* *29*, 1068-1075.
- Xu, C., Gagnon, E., Call, M.E., Schnell, J.R., Schwieters, C.D., Carman, C.V., Chou, J.J., and Wucherpennig, K.W. (2008). Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* *135*, 702-713.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., and Harrison, S.C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Molecular cell* *3*, 629-638.
- Xu, W., Harrison, S.C., and Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* *385*, 595-602.
- Yablonski, D., Kadlecik, T., and Weiss, A. (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. *Molecular and cellular biology* *21*, 4208-4218.
- Yamaguchi, Y., Suda, T., Suda, J., Eguchi, M., Miura, Y., Harada, N., Tominaga, A., and Takatsu, K. (1988). Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *The Journal of experimental medicine* *167*, 43-56.
- Yang, W.C., Ghiotto, M., Barbarat, B., and Olive, D. (1999). The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling. *The Journal of biological chemistry* *274*, 607-617.
- Yang, W.C., and Olive, D. (1999). Tec kinase is involved in transcriptional regulation of IL-2 and IL-4 in the CD28 pathway. *European journal of immunology* *29*, 1842-1849.
- Yin, L., Al-Alem, U., Liang, J., Tong, W.M., Li, C., Badiali, M., Medard, J.J., Sumegi, J., Wang, Z.Q., and Romeo, G. (2003). Mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene *sap* exhibit increased susceptibility to murine gammaherpesvirus-68 and hypogammaglobulinemia. *Journal of medical virology* *71*, 446-455.
- Yokosuka, T., Kobayashi, W., Sakata-Sogawa, K., Takamatsu, M., Hashimoto-Tane, A., Dustin, M.L., Tokunaga, M., and Saito, T. (2008). Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* *29*, 589-601.
- Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L., and Saito, T. (2005). Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nature immunology* *6*, 1253-1262.

- Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L.E., Wakeham, A.C., Bouchard, D., Kong, Y.Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., *et al.* (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* *8*, 115-124.
- Zeng, R., Cannon, J.L., Abraham, R.T., Way, M., Billadeau, D.D., Bubeck-Wardenberg, J., and Burkhardt, J.K. (2003). SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* *171*, 1360-1368.
- Zenner, G., Vorherr, T., Mustelin, T., and Burn, P. (1996). Differential and multiple binding of signal transducing molecules to the ITAMs of the TCR-zeta chain. *Journal of cellular biochemistry* *63*, 94-103.
- Zhang, D.H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P., and Ray, A. (1999a). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* *11*, 473-482.
- Zhang, W., Irvin, B.J., Tribble, R.P., Abraham, R.T., and Samelson, L.E. (1999b). Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. *International immunology* *11*, 943-950.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998a). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* *92*, 83-92.
- Zhang, W., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998b). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* *9*, 239-246.
- Zhang, W., Tribble, R.P., Zhu, M., Liu, S.K., McGlade, C.J., and Samelson, L.E. (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. *The Journal of biological chemistry* *275*, 23355-23361.
- Zhang, W., Wan, T., Li, N., Yuan, Z., He, L., Zhu, X., Yu, M., and Cao, X. (2001). Genetic approach to insight into the immunobiology of human dendritic cells and identification of CD84-H1, a novel CD84 homologue. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *7*, 822s-829s.
- Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J., and Shevach, E.M. (2006). Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* *107*, 3925-3932.
- Zhao, F., Cannons, J.L., Dutta, M., Griffiths, G.M., and Schwartzberg, P.L. (2012). Positive and negative signaling through SLAM receptors regulate synapse organization and thresholds of cytotoxicity. *Immunity* *36*, 1003-1016.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., and Ouyang, W. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature medicine* *14*, 282-289.

Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* 8, 967-974.

Zhu, M., Shen, S., Liu, Y., Granillo, O., and Zhang, W. (2005). Cutting Edge: Localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development. *J Immunol* 174, 31-35.