

---

**Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université Paris V - Descartes**

Ecole doctorale Biochimie, Biothérapie, Biologie Moléculaire et Infectiologie

Spécialité : IMMUNOLOGIE

Présentée par **Armelle BOHINEUST**

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris V Descartes

**Rôle de la réorganisation du cytosquelette des  
cellules T CD4<sup>+</sup> à la synapse immunologique dans les  
fonctions T**

Soutenue publiquement le 26 juin 2013, devant le jury composé de :

Dr. Florence Niedergang	Président
Dr. Claire Hivroz	Directrice de thèse
Dr. Andres Alcover	Rapporteur
Dr. Margot Thomé	Rapporteur
Dr. Nicolas Blanchard	Examineur
Dr. Geneviève de Saint Basile	Examineur
Dr. Clotilde Randriamampita	Examineur

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse et en premier lieu le Dr. Florence Niedergang d'avoir accepté de présider ce jury. Je voudrais également exprimer ma gratitude au Dr. Andres Alcover et au Pr. Margot Thomé pour le temps qu'ils ont bien voulu m'accorder en évaluant ces travaux de thèse. Un grand merci également aux Dr. Nicolas Blanchard, Geneviève de Saint Basile et Clotilde Randriamampita d'avoir accepté d'être examinateurs et membres de ce jury. Je vous suis tous très reconnaissante d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit et de juger ce travail de thèse, malgré les emplois du temps très chargés de chacun d'entre vous. Merci encore à vous tous de vous déplacer, parfois de loin, pour assister à la présentation et participer à la discussion, en m'offrant vos suggestions très constructives qui seront précieuses pour la poursuite et la fin de ces travaux.

Merci beaucoup au Dr. Sebastian Amigorena de m'avoir accueillie dans ce laboratoire et à tous les chefs d'équipes de l'unité U932 pour le temps que vous prenez à former tous les membres de l'unité. Votre disponibilité et vos conseils lors des labmeetings et des différentes discussions m'ont énormément apporté au cours de ces années passées à vos côtés. Merci pour votre considération et pour la confiance que vous m'avez apportées, ainsi que pour tous les moments de détente si agréables. Un merci tout particulier à Ana-Maria et Geneviève pour le suivi et les conseils que vous m'avez apportés lors des comités de thèse. Votre regard critique, votre enthousiasme et votre soutien ont été très précieux pour l'avancée des différents projets menés au cours de ces années. Merci Ana d'avoir proposé de me financer au moment où je n'avais pas de bourse, je t'en suis extrêmement reconnaissante.

Claire ! Il sera très difficile de mettre sur papier et de t'exprimer de façon concise toute la gratitude, l'admiration, le respect et l'affection que j'ai pour toi. Tu m'as toujours soutenue, et fais confiance depuis le début. Tu as été là lorsque je n'ai pas eu de bourse, lorsque les résultats n'étaient pas encourageants, tu m'as toujours poussée et motivée. Mais tu étais là aussi pour tous les moments de joie, les fous rires, les discussions politiques enflammées, les pauses sur le balcon, tous ces petits moments si précieux qui rendent la vie dans ce laboratoire tellement agréable. Tu m'as formée quand je n'étais qu'une « gamine », tu m'as tout appris en science, aux niveaux technique et intellectuel, tu as été un mentor exceptionnel. Merci pour ta patience, et je sais qu'elle a parfois été mise à rude épreuve ! Je

suis très triste de partir de ton équipe que tu sais maintenir toujours soudée et unie, mais il nous reste encore plusieurs mois ensemble et t'inquiètes, c'est pour mieux revenir !

Aux anciennes de l'équipe, Marie et Karine, vous nous manquez tellement ici mes amies ! J'espère toujours qu'on retravaillera ensemble un jour. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris au labo, pour nos multiples fous rires devenus quotidiens et qui ont scellé de belles amitiés.

La « Claire team » : Mario, quel beau renouveau tu amènes dans l'équipe ! Je sais que tu vas faire de grandes choses dans ce labo, merci pour ta patience, je sais que je t'ai fait perdre quelques heures dans le bureau... Paola, merci pour ta bonne humeur, je ne t'ai jamais vu râler, c'est presque suspect ! Il nous reste encore quelques semaines ensemble ici, mais je compte sur toi pour me faire visiter Milan. Steph, que dire ! Trop de merci pour tout ce que tu m'as appris, pour ta bonne humeur et ta façon de râler tellement drôle. Merci pour ta zen attitude et je n'oublierai pas ta philosophie : faut pas se mettre la rate au court-bouillon ! Mickaël, Julien et Nathalie, la partie physique de l'équipe (au sens disciplinaire du terme), vous nous apportez une nouvelle façon de voir les choses et de réfléchir. C'est vraiment enrichissant de travailler avec vous.

A l'ancienne génération : Matias, Eik, Fiorella, Rhys, Nacho, Ariel, Cinzia, Ella, Luigia, Marina, Géraldine, les moments avec vous sont gravés dans ma mémoire. Merci de m'avoir forcée à baragouiner l'anglais. J'ai appris beaucoup en vous côtoyant, un beau mélange de nationalités et de cultures et beaucoup de bières !

Angéliqua, Sophita, Olivier, Joao, Lorenzo, Mélanie : super dream team ! La dissolution a déjà commencé mais je sais qu'on ne manquera pas d'occasions de se retrouver tous ensemble. C'est magique d'arriver à créer ce genre d'ambiance et de faire que les collègues deviennent beaucoup plus que des relations professionnelles, merci les potos on a vraiment bien rigolé!

A tous les anciens et nouveaux du bureau des étudiants : Nacho, Marina, Marie, Mélanie, Mario, Angéliqua, Mélissa, Joanna, Andy, merci pour les fous rires, les silences respectueux permettant à tout le monde de travailler, et l'entre-aide qui nous tirent tous vers le haut. Les membres successifs de ce bureau désormais célèbre ont toujours maintenu un équilibre qui convient à tout le monde, et pourtant pas facile dans 5m<sup>2</sup> !

Mélanie, Marine, Dorian, Aymeric, qu'est-ce qu'on a rigolé ! Merci pour les pauses partagées, les manips designées, la montagne on l'a rasé ! Vous permettez de créer de super relations entre les différents bâtiments et vous avez été un grand soutien dans cette unité. Mais tout ça, n'est rien comparé aux amitiés qu'on a développées. Allez les potos, l'Australie et les States c'est has been, si vous êtes chauds venez à Pasteur et on se recrée un petit microcosme de rires, bières et science comme on en a le secret. D'ici là, la montagne n'est pas loin... Merci encore à tous les 4 ! Mélanie, Bérangère et Céline, ce petit quatuor nous a permis de traverser cette expérience toutes ensemble, même si on l'a vécue très différemment toutes les quatre. Merci pour le soutien au cours des différentes étapes qui ont consolidé notre amitié.

Merci aux collaborateurs et à tous ceux qui m'ont aidée dans mon travail de thèse: Elodie et Lionel, c'était très enrichissant de travailler avec vous, merci de m'avoir fait confiance en me proposant ces collaborations. François, Vincent, Lucie, FX merci pour votre aide technique et psychologique dans les moments de désarroi face aux microscopes ou à l'ultracentrifugeuse. Merci à O. Schwartz de l'institut Pasteur à Paris pour les lignées Jurkat. Merci à Philippe Chavrier de l'institut Curie pour les constructions IQGAP1. Merci mille fois à la Ligue contre le cancer et à l'ARC car rien de tout cela n'aurait été possible sans ces associations.

Enfin merci à mes amis, et à ma famille pour leur soutien et la patience dont ils ont fait preuve pendant les longues heures d'écoute au cours de toutes ces années. Julien, c'est toi qui m'a maintenue équilibrée depuis le début de cette aventure et jusqu'à aujourd'hui, tu me boostes, me soutiens et me retiens dans mes excès de zèle, merci beaucoup et tellement, tellement idem !

# TABLE DES MATIERES

---

Résumé .....	6
Abstract .....	7
Liste des abréviations .....	8
Index des figures .....	9
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>12</b>
<b>1- Le cytosquelette des lymphocytes T .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1- Les filaments d'actine .....</b>	<b>13</b>
1.1.1- Présentation et rôles .....	13
1.1.2- Les protéines associées .....	14
1.1.2.1- <i>Le complexe Arp2/3</i> .....	14
1.1.2.2- <i>Les formines</i> .....	16
1.1.3- Le système acto-myosine .....	17
1.1.4- Outils expérimentaux .....	18
<b>1.2- Les microtubules .....</b>	<b>19</b>
1.2.1- Présentation et rôles .....	19
1.2.2- Les protéines associées .....	20
1.2.2.1- <i>Les protéines de liaison aux extrémités</i> .....	20
1.2.2.2- <i>Les formines</i> .....	21
1.2.2.3- <i>La famille des PKCs et le complexe Par</i> .....	21
1.2.2.4- <i>Les moteurs moléculaires</i> .....	23
1.2.3- Outils expérimentaux .....	24
<b>1.3- Les filaments intermédiaires .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4- Les RhoGTPases .....</b>	<b>25</b>
1.4.1- Description .....	25
1.4.2- Protéines régulatrices .....	26
1.4.2.1- <i>Les facteurs d'échanges (GEF)</i> .....	26
1.4.2.2- <i>Les inhibiteurs GAP</i> .....	27
1.4.2.3- <i>Les inhibiteurs GDI</i> .....	27
<b>1.5- IQGAP1 .....</b>	<b>27</b>
1.5.1- Identification .....	27
1.5.2- Les partenaires d'IQGAP1 .....	28
1.5.3- IQGAP1, Cdc42 et cytosquelette .....	29
1.5.3.1- <i>Cytosquelette d'actine</i> .....	29
1.5.3.2- <i>Cytosquelette de microtubules</i> .....	31
1.5.4- IQGAP1 et adhésion cellulaire .....	32
1.5.5- IQGAP1 et sécrétion .....	33
1.5.6- IQGAP1 et signalisation .....	33
<b>2- Cytosquelette et mise en place de la synapse immunologique .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1- Mise en place des interactions LT-CPA .....</b>	<b>34</b>
2.1.1- La migration des cellules T .....	34
2.1.1.1- <i>Le rolling</i> .....	34
2.1.1.2- <i>L'arrêt sur les cellules endothéliales</i> .....	35

2.1.1.3- <i>L'établissement de la polarité</i> .....	35
2.1.1.4- <i>Les migrations bi et tri-dimensionnelles</i> .....	36
2.1.2- <i>Interactions LT-CPA</i> .....	37
2.1.2.1- <i>Etat d'activation des LT</i> .....	37
2.1.2.2- <i>Etat de maturation des DC</i> .....	38
2.1.2.3- <i>Interactions LT-LB</i> .....	39
2.1.3- <i>Autres interactions</i> .....	39
<b>2.2- Organisation de la synapse</b> .....	40
2.2.1- <i>Synapse concentrique</i> .....	40
2.2.1.1- <i>Description</i> .....	40
2.2.1.2- <i>Notion de microclusters</i> .....	42
2.2.2- <i>Synapse multifocale</i> .....	43
2.2.3- <i>Cytosquelette et formation de la synapse</i> .....	43
2.2.3.1- <i>Réorganisation du cytosquelette d'actine à la synapse</i> .....	44
2.2.3.2- <i>Rôle de la myosine dans la formation de la synapse</i> .....	46
2.2.3.3- <i>Réorganisation du cytosquelette de microtubules</i> .....	47
2.2.3.4- <i>Rôle du remodelage de l'actine dans la polarisation du MTOC</i> .....	48
<b>2.3- Maintien du contact LT-CPA</b> .....	49
2.3.1- <i>Rôle des intégrines</i> .....	49
2.3.1.1- <i>Présentation et fonctions dans les LT</i> .....	49
2.3.1.2- <i>Changement de conformation</i> .....	50
2.3.1.3- <i>Augmentation de l'avidité</i> .....	51
2.3.2- <i>La molécule CD2</i> .....	52
<b>2.4- Synapses vs kinapses</b> .....	53
<b>3- Cytosquelette et signalisation</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1- Les microclusters de signalisation TCR</b> .....	55
3.1.1- <i>Les microclusters de TCR</i> .....	55
3.1.1.1- <i>Présentation</i> .....	55
3.1.1.2- <i>Formation des microclusters de TCR</i> .....	56
3.1.2- <i>Les voies de signalisation</i> .....	57
3.1.2.1- <i>Recrutement des premières kinases</i> .....	58
3.1.2.2- <i>Recrutement des molécules adaptatrices</i> .....	59
3.1.2.3- <i>Activation des MAPK-Erk</i> .....	60
3.1.2.4- <i>PLC-<math>\gamma</math>1 et <math>Ca^{2+}</math></i> .....	61
3.1.2.5- <i>Voie calcique et cytosquelette</i> .....	62
3.1.3- <i>Modulation du signal</i> .....	63
3.1.3.1- <i>La zone de cSMAC</i> .....	63
3.1.3.2- <i>Mécanismes de modulation de l'expression du TCR</i> .....	63
<b>3.2- Rôle de l'actine dans la dynamique des microclusters</b> .....	65
<b>3.3- Rôle des microtubules dans la dynamique des microclusters</b> .....	66
<b>3.4- Signalisation des molécules accessoires</b> .....	67
3.4.1- <i>Signalisation LFA-1</i> .....	67
3.4.1.1- <i>Signalisation inside-out</i> .....	67
3.4.1.2- <i>Signalisation outside-in</i> .....	68
3.4.2- <i>Signalisation CD28</i> .....	69
3.4.2.1- <i>La voie PKC<math>\theta</math></i> .....	70
3.4.2.2- <i>La voie PI3K</i> .....	71

<b>4- Cytosquelette et sécrétion</b> .....	<b>73</b>
<b>4.1- Sécrétion des granules cytotoxiques</b> .....	73
4.1.1- Présentation .....	73
4.1.2- Mécanismes d'exocytose des granules cytolytiques .....	74
4.1.3- Sécrétion des granules et cytosquelette .....	75
4.1.3.1- <i>Microtubules et polarisation du MTOC</i> .....	75
4.1.3.2- <i>Rôle de l'actine</i> .....	76
<b>4.2- Sécrétion des cytokines</b> .....	77
4.2.1- Voie classique de sécrétion .....	77
4.2.2- Sécrétion des cytokines dans les macrophages .....	78
4.2.3- Sécrétion des cytokines dans les LT CD4 <sup>+</sup> .....	79
<b>5- Objectifs de la thèse</b> .....	<b>82</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>83</b>
1- Cellules .....	83
2- Traitement des cellules T avec différentes drogues .....	83
2.1- <i>Colchicine</i> .....	83
2.2- <i>Inhibiteur des PKC atypiques</i> .....	83
2.3- <i>Latrunculine-B</i> .....	83
3- Préparation des vecteurs codant l'IFN- $\gamma$ -GFP .....	84
4- Production des lentivirus .....	84
5- Infection des cellules T humaines .....	84
5.1- <i>Cellules T Jurkat</i> .....	84
5.2- <i>Cellules T primaires</i> .....	85
6- RT-PCR quantitative .....	85
7- Mesure de l'efficacité des shRNA par Western-Blot .....	85
8- Activation des LT .....	86
8.1- <i>Activation des LT avec des Ac</i> .....	86
8.2- <i>Activation des LT avec des CPA</i> .....	86
9- Détection des cytokines .....	86
10- Analyse de l'expression des cytokines par cytométrie de flux .....	86
11- Xcelligence .....	87
12- Microscopie .....	87
12.1- <i>Formation des conjugués</i> .....	87
12.2- <i>Test d'étalement</i> .....	88
12.3- <i>Analyse des lames</i> .....	88
12.4- <i>Préparation des lames pour la microscopie électronique à balayage..</i>	88
13- Vidéomicroscopie .....	89
13.1- <i>Spinning-disk</i> .....	89
13.2- <i>Vidéomicroscope à épifluorescence</i> .....	89
14- Analyse statistique .....	89
<b>RESULTATS</b> .....	<b>90</b>
<b>1- Cdc42 contrôle le remaniement de l'actine à la synapse nécessaire à la sécrétion des cytokines par les LT CD4<sup>+</sup> [article 1].</b>	<b>90</b>
<b>1.1- Introduction</b> .....	90

<b>1.2- Résultats</b> .....	91
1.2.1- En absence de Cdc42, la sécrétion des cytokines est altérée dans les LT CD4 <sup>+</sup> primaires humains .....	91
1.2.2- L'inhibition d'expression de Cdc42 n'affecte pas la polarisation du MTOC à la synapse dans les cellules T primaires et Jurkat .....	92
1.2.3- La polarisation du MTOC à la synapse n'est pas nécessaire à la sécrétion des cytokines par les LT .....	93
1.2.4- L'intégrité du réseau de microtubules est nécessaire à la sécrétion des cytokines .....	94
1.2.5- Le remaniement de l'actine à la synapse est altéré dans les cellules T ayant perdu l'expression de Cdc42 .....	95
1.2.6- Le recrutement et la sécrétion des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ à la synapse requière un remaniement de l'actine dépendant de Cdc42...	96
<b>1.3- Discussion</b> .....	98
1.3.1- Le remaniement de l'actine contrôle l'exocytose des cytokines : quel pourrait être le mécanisme ? .....	98
1.3.2- Quels sont les régulateurs en aval de Cdc42 ? .....	99
<b>2- Rôle d'IQGAP1 dans la signalisation en aval du TCR et la réorganisation du cytosquelette d'actine [résultats complémentaires]...</b>	<b>100</b>
<b>2.1- Introduction</b> .....	100
<b>2.2- Résultats</b> .....	101
2.2.1- Localisation d'IQGAP1 dans les LT CD4 <sup>+</sup> .....	101
2.2.2- Rôle d'IQGAP1 sur le remaniement du cytosquelette .....	102
2.2.3- IQGAP1 et la signalisation en aval du TCR .....	104
2.2.4- IQGAP1 et sécrétion des cytokines .....	105
2.2.5- IQGAP1 et formation de la synapse .....	106
2.2.6- IQGAP1 et LFA-1 .....	107
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>110</b>
<b>1- Critique des modèles utilisés</b> .....	<b>110</b>
1.1- Le système lentivirus .....	110
1.2- Les modèles d'activation .....	111
1.2.1- CPA et superantigènes .....	111
1.2.2- Ac anti-CD3/anti-CD28 .....	112
1.2.2.1- Sur billes .....	112
1.2.2.2- Ac solubles .....	113
1.2.2.3- Ac fixés sur puits ou lamelles .....	113
1.3- L'immunofluorescence .....	115
<b>2- Cytosquelette et sécrétion des cytokines</b> .....	<b>117</b>
2.1- Activation de Cdc42 .....	117
2.2- La polarité du MTOC ne régule pas la sécrétion d'IFN- $\gamma$ .....	118
2.3- Rôle des microtubules .....	119
2.4- Le remodelage de l'actine dans la zone synaptique contrôle la sécrétion d'IFN- $\gamma$ .....	120
2.4.1- Les vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ sont localisées dans des zones pauvres en actine polymérisée .....	120



2.4.2- Cdc42 contrôle le remaniement de l'actine à la synapse .....	121
<b>3- IQGAP1 contrôle le remaniement de l'actine à la synapse .....</b>	<b>124</b>
3.1- IQGAP1 contrôle le remaniement de l'actine .....	124
3.2- IQGAP1 régule négativement l'activation des LT .....	126
3.2.1- Rôle d'IQGAP1 dans la signalisation en aval du TCR et de CD28 ...	127
3.2.2- Rôle d'IQGAP1 sur la production des cytokines .....	128
3.3- Rôle d'IQGAP1 sur la signalisation LFA-1 .....	130
3.3.1- Expression des différentes formes de LFA-1 .....	130
3.3.2- LFA-1 et balance entre migration et stabilisation du contact .....	131
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>133</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>146</b>
Article 1 : Cytokine secretion by CD4 <sup>+</sup> T cells at the immunological synapse requires Cdc42-dependent local actin remodeling but not microtubule organizing center polarity.....	146
Article 2 : Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells .....	147
Article 3 : T cell polarity at the immunological synapse is required for CD154-dependent IL-12 secretion by dendritic cells .....	148
Article 4 : Force generation upon T cell receptor engagement .....	149
Article 5 : Human inflammatory dendritic cells induce Th17 differentiation .....	150
Article 6 : The SNARE protein VAMP7 controls T cell activation by regulating recruitment and phosphorylation of LAT subsynaptic vesicles at the TCR activation sites .....	151

## Rôle de la réorganisation du cytosquelette des cellules T CD4<sup>+</sup> à la synapse immunologique dans les fonctions T

---

### RESUME

L'activation d'un lymphocyte T (LT) CD4<sup>+</sup> par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) est une étape cruciale pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace contre un pathogène ou une cellule tumorale. Elle nécessite un contact prolongé entre les deux types cellulaires, initié par la reconnaissance, par le récepteur des LT (TCR), d'un complexe CMH-peptide spécifique présenté à la surface de la CPA. Cette interaction LT-CPA induit la formation d'une zone de contact organisée dans le temps et l'espace, appelée la synapse immunologique. La mise en place de cette structure entraîne le remodelage des cytosquelettes d'actine et de microtubules dans les LT. Quelques minutes après la reconnaissance de l'antigène par le TCR, l'actine se polymérise à la zone synaptique et le centre organisateur des microtubules (MTOC) se polarise en face de la CPA.

Le but du travail de thèse présenté ici a été d'étudier le rôle de la réorganisation du cytosquelette des LT lors de la mise en place de la synapse, dans la sécrétion des cytokines et le maintien de l'interaction permettant l'activation des LT. Nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle de deux protéines qui régulent le remodelage du cytosquelette : la petite RhoGTPase Cdc42 et un de ses partenaires IQGAP1. Cette étude a été réalisée essentiellement dans des LT CD4<sup>+</sup> primaires humains, grâce au développement d'une approche permettant d'inhiber l'expression de ces deux protéines par introduction de shRNAs à l'aide de vecteurs lentiviraux.

Nous avons ainsi mis en évidence que le remaniement du cytosquelette d'actine à la synapse était dépendant de Cdc42, et contrôlait : 1/ la formation d'un anneau d'actine polymérisée en périphérie de la synapse, 2/ le recrutement et la concentration des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  au centre de la synapse, 3/ la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  dans la zone synaptique. Nous avons également montré que la protéine IQGAP1 contrôlait le remaniement de l'actine des LT à la synapse, la signalisation en aval du TCR, et la dynamique de contact entre LT et CPA.

Cette étude participe à une meilleure compréhension du rôle du remodelage du cytosquelette d'actine et de sa régulation dans la mise en place de l'interaction entre LT et CPA, l'activation des LT et une de leur fonction clé : la sécrétion de lymphokines.

**Mots clés :** Synapse immunologique, cytosquelette, Cdc42, IQGAP1, cytokines

**Discipline :** Immunologie

## **Role of cytoskeleton remodeling in CD4<sup>+</sup> T cells at the immunological synapse in T cell functions**

---

### **ABSTRACT**

CD4<sup>+</sup> T lymphocyte activation by an antigen presenting cell (APC) is a crucial step in the establishment of an adaptive immune response against pathogens or tumor cells. It requires contact between the two cell types, initiated by the recognition, by the T cell receptor (TCR), of a specific peptide-MHC complex presented by the APC. This T cell-APC interaction induces the formation of a particular zone organized in time and space, called the immunological synapse. The establishment of this structure induces the remodeling of the actin and microtubule cytoskeleton in T cells. Few minutes after antigen recognition by the TCR, actin polymerizes at the synaptic zone, and the microtubule organizing center (MTOC) polarizes toward the APC.

The goal of the work presented here was to study the role of T cell cytoskeleton remodeling during the establishment of the synapse, in cytokine secretion and in the maintenance of the interaction allowing T cell activation. We mainly studied the role of two proteins regulating the cytoskeleton: the small RhoGTPase Cdc42 and one of its partners IQGAP1. This study was performed mostly in human primary CD4<sup>+</sup> T cells, thanks to the development of an approach allowing the inhibition of the expression of these two proteins by introducing shRNAs through lentiviral vectors.

Altogether, our results show that remodeling of the actin cytoskeleton at the synapse is dependent on Cdc42 and controls : 1/ the formation of a polymerized actin ring at the periphery of the synapse, 2/ the recruitment and concentration of vesicles containing IFN- $\gamma$  at the center of the synapse, 3/ the secretion of IFN- $\gamma$  in the synaptic cleft. They also show that IQGAP1 controls T cell actin remodeling at the synapse, signaling downstream the TCR, and the dynamic of interactions between T cells and APC.

This study allows a better understanding of the role of cytoskeleton remodeling and of its regulation in the establishment of Tcell-APC interaction, the activation of T cells and one of their key functions: lymphokine secretion.

**Key words :** Immunological synapse, cytoskeleton, Cdc42, IQGAP1, cytokines

**Field :** Immunology

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>Ac</b> : Anticorps	<b>MAPK</b> : Mitogen activated protein kinase
<b>Actine-F</b> : Actine filamenteuse ou polymérisée	<b>MLC</b> : Myosin light chain
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>MTOC</b> : Microtubule organizing center
<b>Ag</b> : Antigène	<b>NFAT</b> : Nuclear factor of activated T cells
<b>AP-1</b> : Activator protein-1	<b>NFκB</b> : Nuclear factor kappa B
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>PBMCs</b> : Peripheral blood mononuclear cells
<b>Arp2/3</b> : Actin-related protein 2/3	<b>PH</b> : Pleckstrin homology
<b>CD</b> : Cluster of differentiation	<b>PIP<sub>2</sub></b> : Phosphatidyl-inositol(4,5)biphosphate
<b>Cdc42</b> : Cell division cycle 42	<b>PIP<sub>3</sub></b> : Phosphatidyl-inositol(3,4,5)triphosphate
<b>CHD</b> : Calponin homology domain	<b>PKC</b> : Protéine kinase C
<b>CLIP-170</b> : Cytoplasmic linker protein-170	<b>PLC-γ</b> : Phospholipase-C-gamma
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>PMA</b> : Phorbol myristate acetate
<b>CMHp</b> : Complexe CMH-peptide	<b>pSMAC</b> : Peripheral-SMAC
<b>CPA</b> : Cellule présentatrice d'antigènes	<b>PTB</b> : Phosphotyrosine-binding
<b>cSMAC</b> : Central-SMAC	<b>RE</b> : Réticulum endoplasmique
<b>CTL</b> : Lymphocyte T cytotoxique	<b>sAg</b> : Super-antigènes
<b>DAG</b> : Diacylglycerol	<b>SDF-1α</b> : Stromal cell-derived factor α
<b>Dia-1</b> : Diaphanous-1	<b>SEB</b> : Staphylococcal enterotoxin B
<b>DC</b> : Cellule dendritique	<b>SEE</b> : Staphylococcal enterotoxin E
<b>EB1</b> : End binding-1	<b>SH2/3</b> : Src homology domain 2/3
<b>ERM</b> : Ezrine, Radixine, Moesine	<b>shRNA</b> : Short hairpin RNA
<b>Fab</b> : Antigen-binding fragment	<b>SLP-76</b> : SH2-containing leukocyte protein of 76 kDa
<b>GAP</b> : GTPase activating protein	<b>SMAC</b> : Supramolecular activation clusters
<b>GDI</b> : Guanine nucleotide dissociation inhibitor	<b>SNARE</b> : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor accessory protein receptor
<b>GDP</b> : Guanosine di-phosphate	<b>STAT</b> : Signal transducer and activator of transcription
<b>GEF</b> : Guanosine exchange factor	<b>TCR</b> : T cell receptor
<b>GFP</b> : Green fluorescent protein	<b>TGN</b> : Trans-Golgi network
<b>GPCR</b> : G-protein coupled receptor	<b>Th</b> : Lymphocyte T helper
<b>GTP</b> : Guanosine tri-phosphate	<b>TIRFm</b> : Total internal reflection fluorescence microscopy
<b>ICAM-1</b> : Inter-cellular adhesion molecule-1	<b>TNF-α</b> : Tumor necrosis factor alpha
<b>IFN-γ</b> : Interferon-gamma	<b>TSST1</b> : Toxic shock syndrom toxin-1
<b>Ig</b> : Immunoglobuline	<b>VCAM-1</b> : Vascular cell adhesion molecule-1
<b>IL</b> : Interleukine	<b>WASp</b> : Wiskott Aldrich syndrome protein
<b>IQGAP1</b> : IQ motif containing GTPase activating protein 1	<b>WAVE</b> : WASP-family verprolin-homologous protein
<b>IP<sub>3</sub></b> : Inositol 3-phosphate	<b>ZAP-70</b> : Zeta-chain associated protein 70
<b>ITAM</b> : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	
<b>KD</b> : Knock-down	
<b>KO</b> : Knock-out	
<b>LAT</b> : Linker for activation of T cells	
<b>LB</b> : Lymphocyte B	
<b>LFA-1</b> : Lymphocyte function associated antigen-1	
<b>LT</b> : Lymphocyte T	

# INDEX DES FIGURES

---

## INTRODUCTION

<b>Figure 1.1 :</b> Familles de protéines de liaison à l'actine .....	13
<b>Figure 1.2 :</b> Séquence et mode de régulation de WASp .....	15
<b>Figure 1.3 :</b> Structure des formines (mDia1) .....	16
<b>Figure 1.4 :</b> Mouvement de la myosine sur les filaments d'actine .....	18
<b>Figure 1.5 :</b> Structure et instabilité des microtubules .....	19
<b>Figure 1.6 :</b> Structure des membres de la famille PKC .....	22
<b>Figure 1.7 :</b> Structure et mouvement de la kinésine .....	23
<b>Figure 1.8 :</b> Structure de la dynéine .....	23
<b>Figure 1.9 :</b> Structure d'un filament intermédiaire .....	24
<b>Figure 1.10 :</b> Séquence des RhoGTPases .....	25
<b>Figure 1.11 :</b> Phylogénie des RhoGTPases .....	25
<b>Figure 1.12 :</b> Régulation des RhoGTPases .....	26
<b>Figure 1.13 :</b> Relocalisation des RhoGTPases par RhoGDI $\alpha$ .....	27
<b>Figure 1.14 :</b> Séquence et partenaires d'IQGAP1 .....	29
<b>Figure 1.15 :</b> Modèle de régulation de N-WASp, Arp2/3 et Dia1 par IQGAP1 .....	30
<b>Figure 1.16 :</b> Rôle d'IQGAP1 dans la régulation de l'adhésion cellulaire via l'E-cadhérine .....	32
<b>Figure 1.17 :</b> Etapes d'extravasation des leucocytes vers le tissu cible .....	34
<b>Figure 1.18 :</b> Protéines impliquées dans la migration et la polarité des LT .....	35
<b>Figure 1.19 :</b> Extravasation des leucocytes vers le tissu cible .....	36
<b>Figure 1.20 :</b> Asymétrie des récepteurs et des cytosquelettes au cours de la migration des leucocytes .....	37
<b>Figure 1.21 :</b> Organisation de la synapse de Kupfer .....	41
<b>Figure 1.22 :</b> Mouvement des microclusters à la synapse .....	42
<b>Figure 1.23 :</b> Organisation des synapses entre LT et DC immatures ou matures .....	43
<b>Figure 1.24 :</b> Régulation de l'actine au cours de l'activation des LT par des CPA .....	44
<b>Figure 1.25 :</b> Polarisation du MTOC au cours de l'activation des LT par des CPA .....	48
<b>Figure 1.26 :</b> Changement de conformation de LFA-1 .....	50
<b>Figure 1.27 :</b> Recrutement de CasL et signalisation en aval des intégrines .....	52

<b><u>Figure 1.28</u></b> : Différences entre synapse et kinapse .....	53
<b><u>Figure 1.29</u></b> : Zones des kinapses et SMAC .....	54
<b><u>Figure 1.30</u></b> : Signalisation TCR .....	55
<b><u>Figure 1.31</u></b> : Mouvement des microclusters de TCR au cours de l'interaction LT-CPA ..	56
<b><u>Figure 1.32</u></b> : Techniques de microscopie utilisées pour suivre les mouvements des microclusters .....	57
<b><u>Figure 1.33</u></b> : Mouvement des microclusters CD3 $\zeta$ , ZAP-70 et SLP-76 à la synapse .....	58
<b><u>Figure 1.34</u></b> : Recrutement et activation de ZAP-70 .....	58
<b><u>Figure 1.35</u></b> : Formation du signalosome LAT-SLP76 .....	59
<b><u>Figure 1.36</u></b> : Voie calcique dans les lymphocytes .....	61
<b><u>Figure 1.37</u></b> : Rôle de l'actine et des microtubules dans le mouvement des microclusters	66
<b><u>Figure 1.38</u></b> : Signalisation inside-out des intégrines .....	68
<b><u>Figure 1.39</u></b> : Signalisation outside-in des intégrines .....	69
<b><u>Figure 1.40</u></b> : Fonction de la cofiline à la synapse après engagement des molécules de co-stimulation .....	70
<b><u>Figure 1.41</u></b> : Synapse entre LT CD8 <sup>+</sup> et cellule cible .....	73
<b><u>Figure 1.42</u></b> : Modèle d'exocytose des granules lytiques .....	74
<b><u>Figure 1.43</u></b> : Voie classique de sécrétion .....	77
<b><u>Figure 1.44</u></b> : Polarisation des cytokines à la synapse .....	79

## RESULTATS

<b><u>Figure 2.1</u></b> : La sécrétion des cytokines par les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> primaires humains est inhibée en absence de Cdc42 .....	91
<b><u>Figure 2.2</u></b> : La sécrétion de l'IFN- $\gamma$ est également inhibée dans les cellules T Jurkat en absence de Cdc42 .....	92
<b><u>Figure 2.3</u></b> : L'inhibition de Cdc42 n'altère pas la polarisation du MTOC ou de l'IFN- $\gamma$ à la synapse .....	92
<b><u>Figure 2.4</u></b> : La polarisation du centrosome à la synapse n'est pas nécessaire à la sécrétion d'IFN- $\gamma$ .....	93
<b><u>Figure 2.5</u></b> : L'intégrité du réseau de microtubules est nécessaire à la sécrétion d'IFN- $\gamma$ ..	94
<b><u>Figure 2.6</u></b> : Cdc42 contrôle le remaniement de l'actine à la synapse .....	95
<b><u>Figure 2.7</u></b> : Cdc42 contrôle le recrutement et la concentration des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ .....	96

<b><u>Figure 2.8</u></b> : Cdc42 contrôle la concentration des vésicules IFN- $\gamma$ à la synapse .....	97
<b><u>Figure 2.9</u></b> : Le remaniement de l'actine dépendant de Cdc42, est nécessaire à la sécrétion d'IFN- $\gamma$ .....	98
<b><u>Figure 2.10</u></b> : Schéma récapitulatif des résultats Cdc42 .....	98
<b><u>Figure 2.11</u></b> : Efficacité de l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 .....	101
<b><u>Figure 2.12</u></b> : Localisation d'IQGAP1 dans les LT CD4 <sup>+</sup> .....	101
<b><u>Figure 2.13</u></b> : Rôle d'IQGAP1 sur l'exclusion de l'actine et la polarisation du MTOC ...	102
<b><u>Figure 2.14</u></b> : Rôle d'IQGAP1 dans le remaniement de l'actine .....	102
<b><u>Figure 2.15</u></b> : IQGAP1 contrôle l'étalement des cellules T .....	103
<b><u>Figure 2.16</u></b> : L'inhibition d'IQGAP1 affecte la signalisation en aval du TCR .....	104
<b><u>Figure 2.17</u></b> : IQGAP1 régule la production des cytokines dans les LT CD4 <sup>+</sup> humains ..	105
<b><u>Figure 2.18</u></b> : Formation des conjugués entre LT primaires et DC .....	106
<b><u>Figure 2.19</u></b> : Organisation de la synapse entre LT primaires et LB .....	107
<b><u>Figure 2.20</u></b> : Expression et localisation de LFA-1 .....	108
<b><u>Figure 2.21</u></b> : Mouvements des cellules sur ICAM-1 .....	109

## DISCUSSION

<b><u>Figure 3.1</u></b> : Hypothèses de régulation de l'actine à la synapse par Cdc42 .....	121
<b><u>Figure 3.2</u></b> : IQGAP1 et remaniement de l'actine .....	125
<b><u>Figure 3.3</u></b> : IQGAP1 régule l'interaction LT-CPA .....	132

# ***INTRODUCTION***

---



La première partie de cette introduction consistera à présenter et décrire le cytosquelette et les protéines qui lui sont associées, en portant notre attention plus particulièrement sur les protéines et les mécanismes jouant un rôle dans les LT.

Dans une deuxième partie, nous décrirons le rôle du cytosquelette dans la migration des LT vers les organes lymphoïdes, permettant la rencontre avec les CPA. Puis nous présenterons le rôle du cytosquelette dans la modulation de l'interaction entre LT et CPA : mise en place de la synapse immunologique et différents types de contacts établis.

Nous nous intéresserons ensuite, dans la troisième partie, au rôle du cytosquelette dans la signalisation en aval du TCR aboutissant à l'activation des cellules et aux réponses T (prolifération, différenciation, sécrétion d'effecteurs...). Cette partie n'aura pas pour but de décrire de façon exhaustive les différentes molécules de signalisation, mais de décrire et de s'interroger sur le rôle du cytosquelette dans ce processus de signalisation.

Enfin, la quatrième partie sera consacrée à la description du rôle du cytosquelette dans la sécrétion. Peu de choses étant connues sur la sécrétion des cytokines par les LT CD4<sup>+</sup>, nous nous intéresserons également à la sécrétion des granules cytotoxiques dans les LT CD8<sup>+</sup>, ainsi qu'à la sécrétion des cytokines dans un autre type cellulaire, les macrophages.

# 1. Le cytosquelette des lymphocytes T

---

Dans cette partie, nous nous attacherons à présenter et décrire de façon globale la structure des cytosquelettes d'actine et de microtubules des cellules, en nous concentrant sur la nature du cytosquelette et de certaines protéines associées dans les lymphocytes T (LT) spécifiquement. Nous reviendrons sur le rôle de ces différents acteurs tout au long de ce manuscrit.

## 1.1- Les filaments d'actine

### 1.1.1- Présentation et rôles

Le cytosquelette d'actine est responsable de la morphologie et de la plasticité des cellules permettant la mobilité cellulaire. La dynamique de formation des filaments d'actine permet aux cellules de se déformer en formant des protrusions membranaires de type lamellipode (large extension membranaire composée de filaments d'actine en réseaux) ou filopode (spicule formé de faisceaux d'actine); de limiter la diffusion des organites et de contrôler les mouvements latéraux de certaines protéines membranaires. C'est cette dynamique de formation des filaments d'actine qui permet aux LT de migrer du sang ou de la lymphe vers les différents tissus ou les organes lymphoïdes, mais également d'interagir avec les cellules présentatrices.

Les filaments d'actine sont formés par l'assemblage de monomères d'actine-G. Ce processus n'est pas spontané et nécessite le recrutement de nombreuses protéines, formant des complexes de nucléation d'actine. La dynamique de formation des filaments d'actine permettant les changements morphologiques des cellules est donc régulée par des événements permanents et alternés de polymérisation et de dépolymérisation des monomères d'actine. L'association des monomères aux extrémités dites « pointue » (extrémité moins) et « barbée » (extrémité plus) permet un allongement des filaments qui vont par la suite s'organiser en réseau ou en faisceau selon le type de protéines associées. De nombreuses protéines interviennent donc pour lier les monomères, sectionner les filaments, coiffer les extrémités, lier ou stabiliser les filaments ou encore se déplacer le long des filaments (**Figure 1.1**). Plus de 60 familles de protéines de liaison de l'actine régulent l'assemblage et la dynamique

des structures d'actine dans le cytoplasme, mais nous nous intéresserons ici uniquement à certaines de ces protéines permettant de polymériser les filaments d'actine et de former les réseaux ou faisceaux d'actine à partir de filaments existants, car ces protéines permettent de former les filopodes et lamellipodes jouant un rôle dans l'interaction entre LT et cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

## **1.1.2- Les protéines associées**

### *1.1.2.1- Le complexe Arp2/3*

Le complexe Arp2/3 appartient à l'une des deux grandes familles de protéines de nucléation de l'actine formant des réseaux d'actine entre méchés. Le complexe Arp2/3 est formé de 7 sous-unités dont les protéines Arp2 et Arp3, et 5 autres sous-unités (ARPC1 à 5). Ce complexe se fixe sur un filament existant et favorise la nucléation d'un nouveau brin en branche, avec un angle de 70° entre les deux brins (Mullins et al., 1998). Le complexe coiffe l'extrémité pointue des filaments d'actine, et est le seul facteur connu à induire la polymérisation de l'actine en direction de l'extrémité barbée.

Le complexe Arp2/3 en lui-même est un nucléateur inefficace. Sa fonction de nucléation lui est donnée par les protéines NPF (Nucleation Promoting Factors). Ces protéines lient à la fois les monomères d'actine-G et le complexe Arp2/3, permettant ainsi la nucléation des filaments d'actine. L'une des NPF la plus connue est la protéine WASp (Wiskott-Aldrich Syndrome protein). Cette protéine contient, au niveau C-terminal (C-ter), un domaine VCA (verprolin-cofilin-acidic) comprenant un domaine WH2 liant l'actine-G (verprolin homology domain), un domaine liant la cofiline (cofilin homology domain) et un motif interagissant avec la sous-unité ARPC3 du complexe Arp2/3 chez l'Homme (Yarar et al., 1999). Les autres membres de la famille comme N-WASP et Scar jouent le même rôle en recrutant le complexe Arp2/3 et les monomères d'actine (Higgs and Pollard, 2001; Machesky et al., 1999). D'autres NPF comme WHAMM, WASH, WAVE ou JMP ont également été décrites, et semblent fonctionner de la même manière.

Les protéines NPF ont, elles aussi, besoin d'être activées, et de changer de conformation pour libérer le domaine VCA qui interagit avec le complexe Arp2/3. Les activités de WASp et N-WASP sont régulées par la petite RhoGTPase Cdc42 qui, lorsqu'elle est active sous forme GTP liée, se lie avec une forte affinité au niveau du domaine GBD

(GTPase binding domain) des protéines WASp et N-WASp (Abdul-Manan et al., 1999; Rudolph et al., 1998). Cette liaison permettrait de rendre accessible le domaine VCA, comme le suggère le fait que le domaine VCA et GBD interagissent (Kim et al., 2000). La protéine Scar en revanche ne possède pas de domaine de liaison à Cdc42. WAVE-2 est l'un des trois membres de la famille WAVE (WAVE-1 à 3), majoritairement exprimé par les cellules du système immunitaire. WAVE-2 active également le complexe Arp2/3, mais sa propre activation dépend de Rac et non de Cdc42 (Miki et al., 1998), (**Figure 1.2**).

Les mécanismes d'inactivation du complexe Arp2/3 commencent à être étudiés, et on sait maintenant que la liaison de la coronine induit le décrochage et le recyclage du complexe Arp2/3 (Cai et al., 2008), et que les membres de la famille des facteurs ADF/Cofilin (ADF, Cofilin-1 et 2) favorisent la fragmentation et la dépolymérisation des filaments d'actine en se liant aux sous-unités d'actine-ADP dans le cytosol et dans les filaments, induisant ainsi des modifications de l'enroulement hélicoïdal du filament (Chan et al., 2009; Lappalainen and Drubin, 1997).

#### - Dans les lymphocytes T

Dans les LT humains, le complexe Arp2/3 contrôle la formation du lamellipode vers la CPA lors de la formation de la synapse (Gomez et al., 2007) et lors de l'étalement des cellules T sur une surface activatrice (Nicholson-Dykstra and Higgs, 2008), processus négativement régulé par la coronine-1 (Foger et al., 2006). L'inhibition de l'expression de Arp2 ou Arp3 par des siRNA dans les cellules Jurkat entraîne une dégradation des autres composants du complexe (Gomez et al., 2007). Le complexe Arp2/3 est localisé à l'interface entre cellules Jurkat et billes recouvertes d'Ac anti-CD3, et sa délocalisation inhibe la réorganisation de l'actine à la synapse (Krause et al., 2000). Dans les LT, la cofiline est majoritairement phosphorylée. Sa déphosphorylation (sur un résidu serine-3) permet son activation et est induite par la co-stimulation des LT via des récepteurs accessoires comme CD2, CD4, CD8 ou CD28, mais pas par la stimulation du TCR seul (Samstag et al., 1991; Samstag et al., 1992). L'activation de la cofiline permet son recrutement au lamellipode et aide au remodelage de l'actine dans les LT activés. L'inhibition de l'interaction cofiline/actine-F bloque la formation de la synapse et l'activation des LT (Eibert et al., 2004).

WASp et Cdc42 sont recrutés et activés à la synapse (Cannon et al., 2001), après engagement du TCR et activation de Vav et Itk (Labno et al., 2003). La phosphorylation du résidu Y291 de WASp par la protéine Fyn est nécessaire à la polymérisation d'actine et la formation de la synapse (Badour et al., 2004). WAVE2 active également le complexe Arp2/3 dans les LT, induisant la nucléation d'actine (Nolz et al., 2007).

#### 1.1.2.2- Les formines

Les formines composent la deuxième grande famille de protéines de nucléation de l'actine formant cette fois des faisceaux d'actine parallèles. Les formines sont de grosses protéines dimériques (120-220kDa), avec de multiples domaines leurs permettant d'interagir avec de nombreuses protéines (**Figure 1.3**). Chez les Mammifères, il existe 15 formines réparties en 7 sous-familles, mais les formines les plus étudiées sont celles de la famille Diaphanous (mDia1 à 3 chez la souris, hDia1 à 3 chez l'Homme). Le domaine régulateur situé au niveau N-terminal (N-ter) permet la localisation *in vivo* des formines, et contient dans la plupart des formines des mammifères, un domaine de liaison aux RhoGTPases appelé RBD (Rho binding domain), un domaine inhibiteur DID (Dia inhibitory domain) et un domaine de dimérisation. La région dite active en C-ter contient les domaines FH1 et FH2 (Formin Homology), caractéristiques des formines (Chesarone et al., 2010). Contrairement au complexe Arp2/3 qui reste au site de nucléation, les formines restent liées à l'extrémité barbée des filaments d'actine (Higashida et al., 2004). Cette localisation fait des formines à la fois des protéines de coiffe des filaments d'actine et des protéines de nucléation de ces filaments. Ces différents rôles dépendent de la concentration intracellulaire d'actine monomérique (Higashida et al., 2008) et de profilines, des protéines dites de séquestration qui se lient aux monomères d'actine dépourvus de nucléotides. L'association progressive des formines à l'extrémité barbée permet l'addition de sous-unités d'actine et empêche l'accrochage de protéines de coiffe qui mettrait fin à la polymérisation. Le domaine FH2 homodimérique catalyse la nucléation des filaments d'actine en stabilisant les dimères d'actine, puis le domaine FH1 riche en proline stimule l'élongation, en liant et augmentant les concentrations locales d'actine-G liée à la profiline (Kovar et al., 2006).

Les formines animales, à l'exception des sous-familles INF et Delphiline, existent sous forme inactive dans le cytosol avant d'être recrutées et activées aux membranes. L'état inactif correspond à une forme repliée des formines, avec une interaction intramoléculaire

entre les régions C-ter et N-ter. La liaison de protéines Rho activées au domaine RBD des formines bloque l'interaction inhibitrice entre les domaines C-ter et N-ter. Mais les Rho ne semblent pas toujours suffisantes pour lever cette inhibition et d'autres protéines pourraient être impliquées. Par exemple, la liaison d'IQGAP1 au domaine DID de mDia1 permet la localisation de mDia1 au niveau des coupes phagocytiques (Brandt et al., 2007), mais IQGAP1 entre en compétition avec le domaine C-ter de mDia1 pour la liaison de DAD, suggérant que les Rho pourraient inhiber d'abord l'interaction intramoléculaire de mDia1 avant la liaison d'IQGAP1 permettant la stabilisation et la localisation au cortex cellulaire.

#### - Formines et lymphocytes T

Dans les LT humains, les formines Dia1 et FMNL-1 (Formin-like-1) ne régulent pas l'accumulation d'actine polymérisée à la synapse mais contrôlent la polarisation du centrosome et l'induction de la mort des cellules cibles par les cellules T cytotoxiques (Gomez et al., 2007). Cette étude va à l'encontre de deux autres réalisées dans des souris déficientes pour mDia1 qui développent une lymphopénie caractérisée par une diminution de la population T dans les tissus lymphoïdes ; et présentent un défaut d'adhésion et de migration des cellules T après stimulation par des chimiokines (Eisenmann et al., 2007; Sakata et al., 2007). Ces études suggèrent donc un rôle de mDia1 sur la réorganisation de l'actine nécessaire à la migration, mais les auteurs de (Gomez et al., 2007), n'ont pas mis en évidence de rôle de mDia1 dans la réorganisation de l'actine à la synapse. Pourtant cette équipe a montré quatre ans plus tard que la formine FMNL-1 régulait le niveau d'actine polymérisée dans les cellules Jurkat et la cohésion du Golgi, qui dépend de l'actine, en précisant tout de même que la formine FMNL-1 $\gamma$  serait responsable de cet effet (Colon-Franco et al., 2011). Le même rôle de maintien de la structure du Golgi a été proposé pour la formine INF-2 (Ramabhadran et al., 2011)

Dans les cellules Jurkat, la formine FMNL-3 contrôle la formation des filopodes via son domaine FH2, une propriété n'étant pas partagée par le domaine FH2 de FMNL-1 (Harris et al., 2010).

### **1.1.3- Le système acto-myosine**

La grande famille des myosines, composée de vingt classes, participe à la dynamique

membranaire et à la génération de forces mécaniques par les cellules. Ces protéines, exprimées uniquement chez les eucaryotes, sont des moteurs moléculaires qui se déplacent, pour la plupart, en direction de l'extrémité barbée des filaments d'actine. Ces enzymes convertissent l'énergie chimique stockée dans l'ATP en un mouvement moléculaire qui produit une force appliquée au polymère cytosquelettique associé. Nous nous concentrerons dans ce paragraphe, uniquement sur la myosine non musculaire IIA, appartenant avec les myosines IIB et IIC à la classe II des myosines non musculaires, et seule isoforme exprimée par les lymphocytes T (Jacobelli et al., 2004). Sa structure consiste en deux chaînes lourdes, avec en N-ter une tête de myosine, contenant l'activité ATPasique, qui produit et applique une force sur les filaments d'actine ; deux chaînes légères dites essentielles (ELC, Essential Light Chain) qui stabilisent la conformation et la structure des chaînes lourdes; et deux chaînes légères régulatrices (RLC, Regulatory Light Chain). La calmoduline, une protéine de liaison aux ions calcium, peut également se lier aux chaînes lourdes et servir de chaîne légère. La myosine bouge le long des filaments d'actine, grâce à des changements de conformation de la tête de myosine qui se lie solidement aux filaments d'actine en l'absence d'ATP (**Figure 1.4**).

La régulation de la myosine IIA se fait essentiellement par phosphorylation de la Ser19 et de la Thr20 de la RLC. La phosphorylation de la Ser19 augmente l'activité ATPasique de la myosine (Adelstein and Conti, 1975), et cette phosphorylation induirait également le dépliement de la myosine permettant son oligomérisation (Craig et al., 1983). La phosphorylation de la Ser19 peut être induite par différentes protéines : les kinases Citron et ROCK (Rho-associated protein kinase) activées par RhoA (Amano et al., 1996; Yamashiro et al., 2003), la kinase PAK (Tuazon and Traugh, 1984), la kinase MRCK (Tan et al., 2008), et la Myosin Light Chain Kinase MLCK activée par le  $Ca^{2+}$  et la calmoduline (Gallagher et al., 1991). Les voies de signalisation du calcium et des RhoGTPases jouent donc un rôle majeur dans la régulation de l'activité de la myosine IIA et donc de la contraction acto-myosine.

#### **1.1.4- Outils expérimentaux**

Pour étudier le rôle du cytosquelette d'actine, on peut utiliser différentes toxines : les latrunculines A ou B qui lient les monomères d'actine-G et inhibent ainsi la polymérisation des filaments d'actine ; la jasplakinolide et la phalloïdine qui stabilisent les filaments d'actine ; la cytochalasine-D qui se lie aux extrémités des filaments et bloque leur dépolymérisation. Enfin la blebbistatine est un inhibiteur spécifique de la myosine II qui

altère la contractilité des cellules.

## 1.2- Les microtubules

### 1.2.1- Présentation et rôles

Le cytosquelette de microtubules permet le déplacement des organites et des vésicules dans le cytosol et celui des chromosomes lors de la mitose. Les microtubules supportent les compressions comme les tensions et soutiennent les filaments d'actine lors de la migration ou lors des changements de forme des cellules. Les microtubules sont des polymères cylindriques rigides de tubuline- $\alpha$  et  $\beta$ , avec une polarité : les deux extrémités ne lient pas les mêmes protéines et n'ont pas les mêmes propriétés de polymérisation. L'extrémité plus des microtubules se trouve en périphérie au niveau de la membrane plasmique ou des organites, et l'extrémité moins au niveau du centrosome ou centre organisateur des microtubules (MTOC, Microtubule Organizing Center).

Le centrosome est composé de deux centrioles, reliés par et entourés de la matrice péri-centriolaire contenant des anneaux constitués de molécules de tubuline- $\gamma$  associées à d'autres protéines. C'est à partir de ce complexe d'anneaux de tubuline- $\gamma$  que débute la nucléation des microtubules, ce complexe coiffe leur extrémité moins. La nucléation se fait par recrutement de molécules de tubuline, qui sont des hétérodimères de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , liant les nucléotides GTP ou GDP. Les dimères GTP-liés s'associent et se dissocient aux extrémités, avec une cinétique plus rapide à l'extrémité plus des microtubules. Cette vitesse d'élongation dépend de la concentration en dimères de tubuline-GTP à chaque extrémité lorsque cette concentration est supérieure à la concentration critique favorisant la polymérisation des microtubules. L'association des dimères de tubuline forme des protofilaments, les microtubules correspondent à 13 protofilaments associés de façon cylindrique. L'instabilité dynamique des microtubules est caractérisée par la coexistence de microtubules qui s'allongent avec d'autres qui raccourcissent après des événements de catastrophe (**Figure 1.5**).

Dans les lymphocytes T, la position du centrosome va déterminer la position de l'appareil de Golgi, de l'ensemble de l'appareil de sécrétion et des différents organites. Les microtubules servent de rails pour le transport des vésicules, se faisant de façon directionnelle



selon le moteur lié aux microtubules.

## **1.2.2- Les protéines associées**

Les protéines associées aux microtubules, les MAP (Microtubule Associated Proteins), sont regroupées en familles avec des fonctions distinctes, comme les protéines stabilisatrices, déstabilisatrices, de fragmentation, de liaison ou les protéines motrices. Nous nous pencherons ici plus particulièrement sur les protéines de liaison aux extrémités et les protéines motrices.

### *1.2.2.1- Les protéines de liaison aux extrémités*

Les protéines de liaison à l'extrémité plus des microtubules sont appelées +TIPs (microtubules plus-end tracking proteins), et les protéines de liaison à l'extrémité moins sont appelées MCAKs (mitotic centromere-associated kinesins). Ces dernières déstabilisent tous les microtubules, alors que les +TIPs ne les stabilisent pas tous.

CLIP-170 est la première +TIP à avoir été décrite, et lie les microtubules aux membranes, sans bloquer leur croissance. Les microtubules qui subissent une catastrophe reprennent habituellement la nucléation à partir du centrosome car le taux de sauvetage est bas. Mais lorsqu'un microtubule atteint la périphérie cellulaire, la stabilité de son extrémité plus change fortement, tout en gardant une flexibilité lui permettant de s'adapter aux changements de forme de la cellule. Les événements de sauvetage au niveau périphérique sont dépendants de CLIP-170. Les protéines CLASP ciblent les extrémités des microtubules via la liaison à CLIP-170. CLIP-170 a été décrit comme co-localisant avec le complexe dynéine-dynactine au cortex cellulaire (Howard and Hyman, 2003).

EB1 est également une +TIP qui stabilise les microtubules et peut recruter APC (adenomatous polyposis coli).

#### - Dans les lymphocytes T

Dans les cellules Jurkat, EB1 interagirait directement avec le complexe TCR, contrôlant ainsi la formation du signalosome et le recrutement de LAT et PLC $\gamma$  (Martin-Cofreces et al., 2012).

EB1 est recrutée et phosphorylée par la kinase casein I delta (CKI $\delta$ ) qui contrôle la réorientation du MTOC (Zyss et al., 2011).

#### *1.2.2.2- Les formines*

Les membres des trois sous-familles de formines (Dia, FMN et INF) jouent également un rôle dans la régulation des microtubules. La plupart des études ont été réalisées dans des fibroblastes qui possèdent deux populations distinctes de microtubules, des stables et des dynamiques ; permettant ainsi de dissocier le rôle des formines dans la régulation de l'actine et des microtubules, puisque la perturbation d'un des cytosquelettes affecte souvent l'autre. Dans les formines mDia1 et mDia2, le domaine FH2 lie également directement les microtubules et certaines protéines de liaison à l'extrémité plus des microtubules comme EB1, APC et CLIP-170 (Bartolini et al., 2008; Lewkowicz et al., 2008; Wen et al., 2004). mDia1 et mDia2 stabiliseraient les microtubules en inhibant l'échange de sous-unités de tubuline à l'extrémité plus des microtubules (Palazzo et al., 2001). La formine FMNL1 lie les microtubules au niveau d'un domaine situé en N-ter (Zhou et al., 2006).

#### - Dans les lymphocytes T

Dans les cellules Jurkat, la formine INF-2 contrôlerait le mouvement des vésicules contenant Lck le long des microtubules vers la synapse, régulant ainsi la signalisation à la synapse (Andres-Delgado et al., 2010). Cette formine est également impliquée dans la stabilisation des microtubules et la polarisation du MTOC à la synapse après stimulation du TCR (Andres-Delgado et al., 2012).

#### *1.2.2.3- La famille des PKCs et le complexe Par*

La famille des protéines kinases C (PKC) comporte trois sous-groupes, distingués par la structure de leur région N-ter régulatrice, (Newton, 2010). Les PKC conventionnelles (cPKCs) contiennent un domaine C1 liant le DAG suivi d'un domaine C2 liant les phospholipides chargés négativement de façon Ca<sup>2+</sup>-dépendante. Les nouvelles PKC (nPKCs) comportent un domaine C2 en N-ter ne liant pas les phospholipides, le tandem C1 qui suit

présente une forte affinité pour les esters de phorbol et le DAG. Les PKC atypiques (aPKCs) n'ont pas de domaine C2, et le domaine C1 ne peut pas lier le DAG (**Figure 1.6**). Ces différentes PKCs diffèrent par leurs structures et ne présentent donc pas les mêmes propriétés : les cPKCs ont besoin de  $Ca^{2+}$  et de DAG pour leur activation, les nPKCs ont besoin de DAG uniquement, alors que les aPKCs sont régulées par des interactions protéines-protéines (Huse, 2012). Toutes les PKC possèdent un domaine en C-ter servant de site d'ancrage pour des molécules régulatrices, dépendant de la phosphorylation ; ainsi qu'une séquence pseudo-substrat autoinhibitrice qui maintient les PKCs dans un état inactif. Les PKCs doivent être maturés pour générer des enzymes catalytiquement compétentes. Cette maturation correspond à une série d'événements de phosphorylations faisant intervenir la heat shock protein-90 (HSP90) qui interagit avec un motif spécifique des PKCs, essentiel à la phosphorylation ; mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) ; et PDK-1 qui phosphoryle le site d'activation de toutes les PKCs (Newton, 2010).

Les aPKCs (PKC $\zeta$  et PKC $\iota$ ) jouent un rôle majeur dans l'acquisition et le maintien de la polarité dans de nombreux types cellulaires (Etienne-Manneville and Hall, 2003), essentiellement couplées aux protéines Par3 et Par6, formant le complexe Par. Ce complexe régule entre autre l'établissement de l'axe apico-basal dans les cellules épithéliales : le complexe Par-aPKCs est recruté au niveau apical des jonctions cellulaires, permettant le maintien des contacts entre les cellules épithéliales et la formation de l'épithélium. Le complexe Scribble-Lgl-Dlg participe également à ce processus, mais au niveau basolatéral (Nelson, 2003). Le complexe Par interagit avec Cdc42 permettant la capture et la stabilisation des microtubules au front de migration et la polarisation du MTOC (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Tzima et al., 2003).

#### - Dans les lymphocytes T

Presque toutes ces PKCs sont exprimées par les LT. Les PKC- $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  sont recrutées à la synapse, et régulent la polarisation du MTOC (Monks et al., 1997; Quann et al., 2011). Par3 est également accumulé à la synapse, avec la forme phosphorylée de PKC $\theta$  (Bertrand et al., 2010), et le blocage de ce pool de PKC $\theta$  activé bloque la polarisation du MTOC vers la CPA (Bertrand et al., 2010; Tourret et al., 2010). Le complexe Par3-Par6-aPKC est localisé au

niveau du corps cellulaire des cellules migratoires et semblent impliquées dans le maintien de la polarité au cours de la migration (Ludford-Menting et al., 2005; Real et al., 2007).

#### *1.2.2.4- Les moteurs moléculaires*

Les moteurs moléculaires génèrent les mouvements des organites le long des fibres des cytosquelettes d'actine et de microtubules. Ils sont répartis en trois familles : les myosines, les kinésines et les dynéines. Nous avons vu précédemment que les myosines se déplaçaient en direction de l'extrémité barbée des filaments d'actine, et la plupart des dynéines et des kinésines se déplacent vers les extrémités moins et plus des microtubules respectivement. Comme pour les myosines, les kinésines et les dynéines utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long des microtubules.

Les kinésines sont des dimères formés de deux polypeptides super-enroulés. Chaque monomère est constitué d'une chaîne lourde (120kDa) représentant la tête globulaire liée aux microtubules, qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP et déplace les microtubules ; et d'une chaîne légère (64kDa) représentant la queue qui interagit avec les vésicules ou les organites (**Figure 1.7**). La plupart des kinésines semblent être constitutivement actives.

Les dynéines cytoplasmiques sont de larges complexes de multiples sous-unités, composés de deux chaînes lourdes (530kDa) liant l'ATP et les microtubules, et de sous-unités accessoires incluant 3 chaînes intermédiaires (74kDa) et 4 chaînes légères (55-60kDa) liant les vésicules ou organites cellulaires (**Figure 1.8**). Chaque type de chaîne lourde s'associe avec certaines chaînes légères et intermédiaires. La dynéine cytoplasmique se lie au complexe dynactine, au niveau d'une chaîne intermédiaire (Vaughan and Vallee, 1995), permettant l'ancrage aux membranes des organites. La dynactine est un complexe de multiples sous-unités dont des protéines de coiffe, la protéine de liaison à l'actine Arp1 et la sous-unité p50-dynamitine. La surexpression de cette sous-unité entraîne le désassemblage du complexe dynactine (Melkonian et al., 2007).

#### - Dans les lymphocytes T

Dans les lymphocytes T les kinésines permettent le déplacement des granules cytolytiques dans les LT-CD8<sup>+</sup> (Burkhardt et al., 1993), et la kinésine-1 en complexe avec

d'autres protéines contrôle le recrutement des granules à la synapse (Kurowska et al., 2012). La dynéine est recrutée à la synapse après stimulation du TCR (Combs et al., 2006), et le complexe dynactine est impliqué dans la polarisation du MTOC à la synapse (Martin-Cofreces et al., 2008).

### 1.2.3- Outils expérimentaux

De la même façon que pour le cytosquelette d'actine, on peut utiliser différentes drogues pour affecter le cytosquelette de microtubules : la colchicine et la vinblastine qui inhibent la polymérisation des microtubules ; le nocodazole qui induit la dépolymérisation des microtubules en se liant à la tubuline- $\beta$  ; le taxol qui inhibe la dépolymérisation. Enfin, on peut inhiber la polarisation du MTOC avec un pseudo-substrat des PKC atypiques sans affecter la viabilité des cellules T ou la formation de conjugués (Tourret et al., 2010).

## 1.3- Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des polymères à la fois flexibles et résistants qui apportent un support mécanique aux cellules. Un réseau continu de filaments intermédiaires s'étend de l'enveloppe nucléaire jusqu'à des points d'attache situés sur la membrane plasmique, appelés desmosomes et hémidesmosomes. La classe la plus répandue de protéines des filaments intermédiaires sont les lamines nucléaires, qui renforcent l'enveloppe nucléaire interne. Les filaments intermédiaires, très peu étudiés dans les lymphocytes T, sont composés de polymères de vimentine (Dellagi and Brouet, 1982). Les dimères antiparallèles à quatre chaînes s'associent latéralement pour former une protofibrille, et 4 protofibrilles s'associent pour former le filament intermédiaire (**Figure 1.9**). Contrairement aux filaments d'actine ou aux microtubules, les filaments intermédiaires sont dits apolaires, car les deux extrémités des filaments sont équivalentes. Dans les conditions physiologiques *in vitro* les sous-unités des filaments s'assemblent spontanément aux extrémités et également sur les côtés du polymère.

Dans les LT, ces filaments ont été décrit comme responsables de la rigidité cellulaire des lymphocytes circulants (Brown et al., 2001a), et se réorganisent en agrégats à l'uropode des cellules en migration ou après stimulation via des chimiokines (Dellagi and Brouet, 1982).

Cette réorganisation est contrôlée par la plectine qui s'associe à la vimentine et à l'actine (Brown et al., 2001b).

## 1.4- RhoGTPases

### 1.4.1- Description

La famille des RhoGTPases appartient à la superfamille des Ras GTPases (Madaule and Axel, 1985). Ses membres sont caractérisés par un insert Rho au niveau du domaine contenant l'activité GTPasique (**Figure 1.10**), impliqué dans la liaison aux effecteurs et régulateurs (Freeman et al., 1996). Ces protéines, à l'origine décrites comme des régulateurs du cytosquelette d'actine (Hall, 1998), ont été impliquées dans de très nombreux processus cellulaires, comme la prolifération, la différenciation, l'adhésion, la migration, la sécrétion. Chez les mammifères, 20 membres de la famille Rho ont été identifiés et répartis en 8 sous-familles (Boueux et al., 2007). Les membres les plus étudiés dans les LT et dans d'autres types cellulaires, sont les membres fondateurs, Rho, Rac et Cdc42 (**Figure 1.11**).

Les multiples fonctions des RhoGTPases reposent sur les différences entre les membres eux-mêmes ainsi que sur la diversité de leurs effecteurs et de leur mode de fixation. Une même Rho peut lier différents effecteurs à différents endroits et ainsi contrôler diverses fonctions biologiques. Ces protéines sont dites bimodales car elles sont présentes dans le cytosol sous deux conformations différentes : une conformation inactive lorsque la protéine est liée au nucléotide GDP et une conformation active lorsqu'elle est liée au GTP. Ce changement de conformation peut être induit par des protéines régulatrices de type GAP, GDI ou GEF, ou par la RhoGTPase elle-même. Le terme conformation inactive ou active ne reflète pas la capacité de liaison à d'autres protéines mais plutôt la capacité des Rho à activer leurs effecteurs et donc à induire une réponse cellulaire après stimulus. La régulation de l'activation des RhoGTPases est donc essentielle au contrôle de leurs fonctions.

La localisation des RhoGTPases est également très diverse et régulée entre autre par leur liaison aux protéines régulatrices. La séquence CAAX en C-ter peut permettre d'ancrer la Rho à la membrane où se trouvent de nombreux facteurs d'échanges, qui vont ainsi activer les

RhoGTPases. La localisation et le recrutement des Rho activées permettent également de mettre en place un dialogue avec d'autres protéines, et ainsi d'ajouter une régulation de l'activité des Rho au niveau spatial. Les RhoGTPases jouent un rôle majeur dans la régulation de la polymérisation et des mouvements du cytosquelette d'actine, comme nous avons pu le voir précédemment. Elles interagissent avec le complexe Arp2/3, comme Cdc42 via WASp et Rac1 via WAVE, ainsi qu'avec les formines, comme Cdc42 et Rho avec les protéines mDia.

Nous reviendrons au cours de l'introduction sur le rôle de ces RhoGTPases dans la formation de la synapse ou la transduction de la signalisation en aval du TCR.

## 1.4.2- Protéines régulatrices

### 1.4.2.1- Les facteurs d'échanges (GEF)

Les facteurs d'échanges GEF (Guanosine Exchange Factor) permettent d'activer les RhoGTPases en les chargeant en nucléotide GTP. Il y a une grande redondance d'interaction entre les GEF et les Rho : une même GEF peut lier plusieurs Rho et plusieurs GEF peuvent lier une Rho. Les Rho interagissent avec les GEF principalement au niveau de leurs régions Switch I et II. Cette liaison déstabilise l'interaction entre la Rho et le GDP, permettant de relarguer le GDP dans le cytoplasme et de fixer alors des nucléotides GTP (**Figure 1.12**). Généralement, les RhoGEF possèdent un domaine DH (Dbl Homology) au niveau C-ter, la protéine Dbl étant une GEF de Cdc42 (Hart et al., 1991). Ce domaine DH est placé en tandem avec un domaine PH (Pleckstrin Homology) impliqué dans la localisation à la membrane par sa liaison aux phospholipides. Ces deux domaines DH-PH constituent une unité nécessaire et suffisante à l'activité des GEF (Hakoshima et al., 2003). 79 RhoGEF ont été identifiées dont 36 exprimées par les lymphocytes T (Tybulewicz and Henderson, 2009).

#### - Dans les lymphocytes T

Les principales RhoGEF exprimées par les LT appartiennent à la famille Vav (Vav1 à 3). Vav1 et Vav2 peuvent activer Rac1, RhoA et Cdc42. Ces GEF sont recrutées à la membrane, puis phosphorylées, permettant leur activation (Crespo et al., 1997). Ce mécanisme relie donc la régulation des RhoGTPases à la signalisation en aval du TCR. Tiam-1 est également recrutée à la membrane où elle active Rac1 (Michiels et al., 1997). De

nombreuses autres protéines GEF ont été décrites dans les lymphocytes T comme PIX, DOCK, SWAP-70, SLAT (Becart and Altman, 2009), et leurs rôles dans l'activation des GTPases Rac et Cdc42 analysés dans divers processus cellulaires comme la migration ou l'activation des LT.

#### *1.4.2.2- Les inhibiteurs GAP*

Les protéines GAP (GTPase-Activating Protein) stimulent l'hydrolyse du GTP, aboutissant à l'inactivation des Rho. Comme les GEF, les RhoGAP se lient aux domaines Switch I et II des RhoGTPases, ainsi qu'au GTP. Cette interaction va induire là encore un changement de conformation facilitant l'hydrolyse du GTP (**Figure 1.12**). Les protéines RhoGAP sont caractérisées par un domaine catalytique GAP différent de celui des autres GTPases-GAP (Scheffzek and Ahmadian, 2005), qui va lier les domaines Switch I et II. 65 RhoGAP ont été identifiées dont 38 exprimées par les LT (Tybulewicz and Henderson, 2009).

Les protéines GAP sont activées par phosphorylation ou association à des phospholipides. Le diacylglycerol (DAG) peut également interagir avec les GAP, comme la  $\beta$ 2-chimaerine, spécifique de Rac et Cdc42, qui se relocalise à la synapse des LT où elle inhibe Rac1 (Caloca et al., 2008).

#### *1.4.2.3- Les inhibiteurs GDI*

Les protéines GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor) induisent le détachement de la membrane des Rho liés à GTP, et inhibent le relargage du GDP dans le cytosol. Il n'existe pas de domaine GDI caractérisé, mais les trois RhoGDI décrites présentent des séquences similaires (GDI $\alpha$ , GDI $\beta$ , GDI $\gamma$ ). Les LT expriment GDI $\alpha$  et GDI $\beta$ . Les RhoGDI se lient au groupement lipidique situé en C-ter des RhoGTPases, inhibant ainsi la liaison des RhoGTPases à la membrane (Michaelson et al., 2001), (**Figure 1.13**).

## **1.5- IQGAP1**

### **1.5.1- Identification**

La famille des protéines eucaryotes IQGAP (IQ motif containing GTPase activating



protein) a été identifiée chez de nombreux organismes comprenant la levure, l'amybe, le poisson, le xénope et les mammifères. Trois membres ont été décrits chez l'Homme : IQGAP1 en 1994 (Weissbach et al., 1994), deux ans plus tard IQGAP2 (Brill et al., 1996) et enfin dix ans après IQGAP3 (Wang et al., 2007). Ces protéines ont des séquences très similaires, mais présentent une distribution tissulaire et une localisation cellulaire très différentes. Nous nous concentrerons dans ce manuscrit essentiellement sur la protéine la mieux caractérisée, exprimée de façon ubiquitaire, IQGAP1. Le fait que l'on retrouve cette famille de protéines dans diverses espèces et qu'elle soit conservée au cours de l'évolution suggérait que les fonctions de ces protéines étaient associées à des processus cellulaires fondamentaux. Pourtant les souris déficientes pour IQGAP1 ne présentent pas de défaut de développement physiologique ou tumoral, ni de différence de progression tumorale par rapport aux souris sauvages. Elles présentent en revanche une hyperplasie gastrique, suggérant qu'IQGAP1 jouerait un rôle dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique (Li et al., 2000).

IQGAP1 a été initialement identifiée en 1994 comme une protéine contenant des motifs liant la calmoduline et une séquence similaire au domaine catalytique des RasGAP décrites précédemment (Weissbach et al., 1994). La séquence d'IQGAP1 était similaire à celle de la protéine Sar1 chez *Schizosaccharomyces pombe*. Les auteurs cherchaient alors à identifier des membres de la famille de gènes codant pour des métalloprotéinases exprimés dans les tissus tumoraux.

Deux ans après, cette protéine de 190kDa a été purifiée à partir de lysats cellulaires par chromatographie d'affinité et les auteurs ont alors montré que le domaine C-ter d'IQGAP1 contenant le GRD liait Cdc42 et Rac, et que la calmoduline s'associait à des fragments contenant les domaines IQ (Hart et al., 1996; Ho et al., 1999) et avec une faible affinité au domaine CHD calponin homology domain (Ho et al, 1999).

De nombreuses études ont alors permis de déterminer la séquence et les différents domaines de cette protéine interagissant avec de multiples partenaires, lui conférant ainsi un rôle dans de nombreux processus cellulaires.

### **1.5.2- Les partenaires d'IQGAP1**

IQGAP1 est donc une protéine à domaines multiples, interagissant avec plus de 90 protéines. Nous nous concentrerons ici sur la description des protéines qui nous intéressent

plus particulièrement (**Figure 1.14**).

Le domaine CHD en N-terminal lie l'actine filamenteuse (Bashour et al., 1997; Fukata et al., 1997), N-WASP (Le Clainche et al., 2007) et CXCR2 (Neel et al., 2011). Le domaine liant des séquences poly-proline WW lie les kinases Erk1 et Erk2 (Roy et al., 2004). Le domaine IQ, correspondant à quatre motifs IQ dans la séquence IQGAP1 humain, lie la calmoduline (Hart et al., 1996; Joyal et al., 1997), la chaîne légère de la myosine (Weissbach et al., 1998), la protéine de liaison au  $Zn^{2+}$  et au  $Ca^{2+}$  S100B (Mbele et al., 2002), Rap1 impliqué dans la signalisation LFA-1 (Jeong et al., 2007), les kinases MEK1 et MEK2 (Roy et al., 2005) et B-Raf (Ren et al., 2007). Le domaine GRD (GAP-related domain) lie les petites RhoGTPases Cdc42 (Hart et al., 1996) et Rac1 (Kuroda et al., 1996), mais pas RhoA ni Ras. Et enfin le domaine RGCT (RasGAP carboxyl terminus) interagit avec la protéine CLIP-170 qui lie l'extrémité plus des microtubules (Fukata et al., 2002), avec l'E-cadhérine (Kuroda et al., 1998), la  $\beta$ -caténine (Fukata et al., 1999), la protéine APC (Kuroda et al., 1996) et les sous-unités Exo70, Sec3 et Sec8 du complexe exocyste (Rittmeyer et al., 2008; Sakurai-Yageta et al., 2008).

La liaison d'IQGAP1 à ces nombreuses protéines l'implique donc dans de multiples processus cellulaires comme l'adhésion, la migration et l'exocytose.

### 1.5.3- IQGAP1, Cdc42 et cytosquelette

#### 1.5.3.1- Cytosquelette d'actine

Les homologues d'IQGAP1 chez la levure (Iqg1p/Cyk1p chez *S.cerevisiae*, Rng2p chez *Schizosaccharomyces pombe* et Sar1 chez *S.pombe*) et l'amibe (DGAP1 chez *Dictyostelium discoideum*) jouent un rôle dans le recrutement des filaments d'actine et la cytokinèse. Chez les mammifères, IQGAP1 co-localise avec l'actine au niveau du lamellipode et des extensions membranaires (Bashour et al., 1997; Fukata et al., 1997). En plus de la liaison directe entre IQGAP1 et l'actine filamenteuse, IQGAP1 jouerait un rôle indirect sur le cytosquelette en étant le lien moléculaire entre les GTPases Cdc42 et Rac et le cytosquelette d'actine ; cette activité serait régulée par la calmoduline et le calcium. IQGAP1 lie préférentiellement la forme active GTP liée de Cdc42 (Hart et al., 1996; Joyal et al., 1997), et inhibe l'activité GTPase intrinsèque de Cdc42 *in vitro*, stabilisant ainsi Cdc42 sous forme active.

Une étude a proposé qu'IQGAP1 serait phosphorylé sur la Ser<sup>1443</sup> par la protéine kinase C (PKC)  $\epsilon$  et que le domaine C-ter interagirait avec Cdc42 (Grohmanova et al., 2004), et que selon son état de phosphorylation, IQGAP1 servirait d'effecteur ou isolerait cette forme de Cdc42 pour empêcher la signalisation. La phosphorylation d'IQGAP1 permettrait son activation et la stimulation de la croissance des neurites dans les cellules neuroblastiques murines NIE-115 (Li et al., 2005).

La surexpression d'IQGAP1 induit des changements morphologiques en stimulant la formation de filopodes (Swart-Mataraza et al., 2002) probablement dû au fait qu'IQGAP1 est nécessaire à la localisation de Cdc42 à la membrane plasmique. La liaison d'IQGAP1 à Cdc42 empêche l'interaction entre IQGAP1 et la  $\beta$ -caténine, mais l'augmentation de la concentration en calcium augmente l'interaction entre la calmoduline et IQGAP1, induisant une diminution de l'association entre IQGAP1 et Cdc42 (Ho et al., 1999). IQGAP1 apparaît donc comme une protéine associée à l'actine qui pourrait transmettre les signaux provenant du complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline à la molécule Cdc42 et au cytosquelette.

IQGAP1 stimule également l'assemblage des filaments d'actine en liant et activant N-WASP, qui lui-même recrute Arp2/3, permettant la formation du lamellipode (Le Clainche et al., 2007). IQGAP1 recrute aussi la formine Dial au front de migration et au niveau de l'anneau d'actine formé à la coupe phagocytaire dans les macrophages (Brandt et al., 2007), jouant un rôle dans la migration cellulaire et la phagocytose. Le rôle d'IQGAP1 dans l'assemblage de l'actine n'est donc pas clair, car le complexe Arp2/3 et les formines stimulent des réseaux d'actine distincts : Arp2/3 génère un réseau d'actine ramifié avec l'aide de N-WASP, alors que les formines produisent des filaments linéaires d'actine par élongation des brins. Ces structures d'actine ont des fonctions différentes, même si elles sont toutes deux impliquées dans la dynamique de contact cellulaire via les E-cadhérine dont nous discuterons plus bas, et la migration cellulaire. IQGAP1 servirait alors de plateforme vers laquelle Arp2/3 et Dial convergeraient, permettant de stimuler les deux types de polymérisation d'actine (**Figure 1.15**).

Dans un contexte de synapse entre cellules NK et cellule cible, IQGAP1 contrôlerait l'accumulation d'actine-F au niveau de la zone de contact entre les deux cellules, sans affecter le niveau globale de polymérisation d'actine dans ces cellules (Kanwar and Wilkins, 2011).

Le rôle d'IQGAP1 dans les mouvements du système acto-myosine n'a pas été montré pour l'instant, mais le fait qu'IQGAP1 lie la chaîne légère de la myosine ainsi que la calmoduline pouvant servir de chaîne légère, suggère un rôle d'IQGAP1 dans l'activité de la myosine.

### *1.5.3.2- Cytosquelette de microtubules*

IQGAP1 capture les microtubules via l'interaction avec la protéine CLIP-170 liant l'extrémité plus des microtubules (Fukata et al., 2002), permettant ainsi la polarisation des fibroblastes en migration. IQGAP1, Cdc42/Rac1 et CLIP-170 forment un complexe tripartite. L'expression d'une construction IQGAP1 muté dans son domaine de liaison à Cdc42/Rac1 induit des axes de polarisation multiples. L'interaction IQGAP1-CLIP170, dépendante de mTOR, contrôle la morphologie de l'arbre dendritique, en faisant le lien entre microtubules et filaments d'actine (Swiech et al., 2011).

Nous avons vu qu'IQGAP1 recrutait Dia1, impliqué dans la stabilisation des microtubules via l'interaction avec EB1 (microtubule end-binding protein 1) et APC (Wen et al., 2004). Ce rôle d'IQGAP1 dans la capture des microtubules pourrait être impliqué dans le contrôle spatiotemporel des fonctions des formines. C'est ce que suggère Wickström et al, qui montrent qu'ILK (Integrin-Linked Kinase) recrute IQGAP1 au cortex cellulaire, qui stabilise localement les microtubules via Dia1 (Wickstrom et al., 2010).

Ce contrôle de la stabilité des microtubules suggère qu'IQGAP1 jouerait un rôle dans la polarisation du MTOC, mais de façon surprenante, cette fonction d'IQGAP1 n'a été évoquée que dans trois articles. Le premier montre qu'IQGAP1 est localisé avec l'actine-F en périphérie de la synapse entre LT cytotoxiques et cellules cibles, et les auteurs proposent, sans le montrer, qu'IQGAP1 permettrait de réorienter le MTOC à la synapse et d'exclure l'extrémité plus des microtubules du centre de la synapse, en maintenant ces microtubules dans l'anneau périphérique d'actine (Stinchcombe et al., 2006). Dans le second article, les auteurs montrent cette fois que la perte d'expression d'IQGAP1 induite par introduction de shRNA, induit un défaut de polarisation du MTOC dans les cellules NK en synapse avec des cellules cibles, ainsi qu'un défaut de cytotoxicité (Kanwar and Wilkins, 2011). Enfin le dernier montre que l'inhibition d'IQGAP1 par des shRNA n'affecte pas la polarisation du MTOC dans les cellules T CD8<sup>+</sup> en conjugués avec des cellules présentatrices d'antigènes (Gorman et al., 2012). Les différences pointées sont probablement dues aux différents types

cellulaires, en effet on oppose ici des résultats sur une lignée cellulaire NK humaine, et des cellules CD8<sup>+</sup> OT-I murines.

Ces résultats suggèrent qu'IQGAP1 servirait de lien entre les cytosquelettes d'actine et de microtubules, point qui nous a particulièrement intéressés pour notre étude du rôle des remaniements du cytosquelette dans les fonctions T.

#### 1.5.4- IQGAP1 et adhésion cellulaire

IQGAP1 interagit avec l'E-cadhérine (molécule d'adhésion Ca<sup>2+</sup> dépendante) et la  $\beta$ -caténine au niveau de contacts cellulaires, et induit la dissociation de l' $\alpha$ -caténine du complexe cadhérine-caténine *in vivo* et *in vitro* chez la souris (**Figure 1.16**), (Fukata et al., 1999; Kuroda et al., 1998). Cette étude a été réalisée dans des fibroblastes murins surexprimant l'E-cadhérine. La surexpression d'IQGAP1 induit également la dissociation des interactions entre cellules, de façon Cdc42 dépendante cette fois. En effet l'expression de Cdc42-GTP et Rac1-GTP, mais pas RhoA-GTP, inhibent la liaison d'IQGAP1 avec la  $\beta$ -caténine (Fukata et al., 1999; Hage et al., 2009).

La relocalisation subcellulaire d'IQGAP1 du cytoplasme vers la membrane plasmique est corrélée avec le disfonctionnement de l'E-cadhérine et la dédifférenciation tumorale dans la carcinogénèse gastrique (Takemoto et al., 2001). La localisation cytoplasmique d'IQGAP1 est associée à une forte adhésion intercellulaire par le système E-cadhérine, alors que la localisation membranaire d'IQGAP1 est associée à une perte d'adhésion cellulaire médiée par l'E-cadhérine. IQGAP1 interagirait également avec le récepteur PTP $\mu$  (Protein-Tyrosine Phosphatase), régulant l'adhésion cellulaire impliquant les cadhérines (Phillips-Mason et al., 2006).

IQGAP1 est recruté par la protéine phosphatase 2A (PP2A) avec la petite GTPase Rac pour maintenir l'assemblage de l'actine filamenteuse au niveau d'intégrines  $\beta$ 1 dans les cellules épithéliales mammaires, permettant l'ancrage de l'intégrine au cortex d'actine et l'adhésion des cellules au substrat (Suzuki et al., 2005).

Dans les cellules endothéliales humaines, IQGAP1 stabilise les microtubules au niveau des jonctions adhérentes et est impliqué dans le remodelage de ces jonctions, permettant la diapédèse des lymphocytes (Nakhaei-Nejad et al., 2010).

### 1.5.5- IQGAP1 et sécrétion

Dans les cellules pariétales gastriques IQGAP2 est polarisé à la membrane apicale et IQGAP1 à la membrane basolatérale. Un peptide IQGAP bloquant la liaison d'IQGAP1 à Cdc42 inhibe *in vitro* la sécrétion d'acide dans les glandes gastriques. Ce peptide perturbe l'association d'IQGAP et Cdc42 avec le cytosquelette d'actine apicale, bloquant le remodelage de la membrane apicale après stimulation (Zhou et al., 2003).

IQGAP1 s'associe et co-localise avec le complexe exocyste-septine qui régule la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques. En se liant à Cdc42-GTP, IQGAP1 bloque la formation du complexe exocyste, inhibant ainsi la sécrétion dans ces cellules (Rittmeyer et al., 2008). L'interaction d'IQGAP1 avec les sous-unités Sec3 et Sec8 du complexe exocyste entraîne l'accumulation de métalloprotéinases (MMPs) à l'invadopode des cellules tumorales, et la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs (Sakurai-Yageta et al., 2008). Cette fois, les auteurs montrent que l'interaction d'IQGAP1 avec sec3/sec8 requière Cdc42 sous forme active. IQGAP1 joue également un rôle dans la sécrétion par les NK de granules cytotoxiques. Ainsi, l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 avec des shRNA, inhibe le recrutement des granules à la synapse et le relargage de leur contenu vésiculaire vers la cellule cible (Kanwar and Wilkins, 2011).

### 1.5.6- IQGAP1 et signalisation

IQGAP1 interagit avec Erk1/2, MEK1/2 et B-Raf. Dans les cellules NK, IQGAP1 forme un large signalosome en recrutant ces protéines, après stimulation de NKG-2D et activation de Rap1b (Awasthi et al., 2010). Ce recrutement est nécessaire à la phosphorylation des protéines Erk1/2, MEK1/2 et B-Raf.

La liaison d'IQGAP1 à la calmoduline pourrait également réguler la signalisation calcique, dont la calmoduline est l'un des premiers médiateurs. En effet l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  induit un changement de conformation de la calmoduline, permettant son interaction avec des protéines cibles via des domaines en hélices  $\alpha$  ou des motifs IQ, comme ceux d'IQGAP1. L'interaction d'IQGAP1 avec B-Raf serait favorisée par la présence de  $Ca^{2+}$  et inhibée en présence de calmoduline (Ren et al., 2008). IQGAP1 permettrait donc de coupler la signalisation  $Ca^{2+}$ /Calmoduline à la cascade des MAPK (Raf/MEK/ERK).

## 2. Cytosquelette et mise en place de la synapse immunologique

---

### 2.1- Mise en place des interactions LT-CPA

#### 2.1.1- La migration des cellules T

Les LT naïfs migrent continuellement du sang vers les organes lymphoïdes secondaires à la recherche de cellules présentatrices d'antigènes. Cette migration ne se fait pas de façon aléatoire, mais suit un guidage via des chimiokines entre autres, et est finement régulée. Ce phénomène est appelé écotaxie ou « homing », et comporte plusieurs phases (**Figure 1.17**). Tout d'abord la migration à travers le flux sanguin, puis le contact avec les endothéliums, les LT roulent alors sur les cellules endothéliales (rolling), ralentissent, s'arrêtent, s'extravasent à travers l'endothélium (migration trans-endothéliale) pour rejoindre les organes lymphoïdes, et finalement migrer à travers le tissu pour rejoindre la zone T et rencontrer les cellules dendritiques.

La mobilité des cellules T est régulée par l'expression des chimiokines, de leurs récepteurs, de molécules d'adhésion par les LT et les cellules endothéliales, mais elle met également en jeu des changements morphologiques des cellules T régulés par le cytosquelette.

##### 2.1.1.1- *Le rolling*

Circulant dans le flux sanguin ou au cours de la phase de rolling, le LT a une forme arrondie avec de petits microvilli au bout desquels est exprimée la L-selectine. Cette protéine interagit avec ses ligands sur les cellules endothéliales, les LT roulent donc sur l'endothélium grâce à ces interactions au bout des microvilli. Au niveau de ces microvilli se trouvent les protéines de la famille des ERM (Ezrin Radixin Moesin, la radixine n'est pas exprimée par les LT). Ces protéines créent un lien entre l'actine et la membrane plasmique via certaines protéines transmembranaires. A l'état inactif les protéines ERM bloquent la liaison entre l'actine-F et la membrane. Cet état est dû à des interactions intramoléculaires entre les extrémités N-ter et C-ter des ERM. La phosphorylation au niveau C-ter active la protéine qui crée alors le lien entre actine-F et membrane (Tsukita and Yonemura, 1999). La phosphorylation des ERM est dépendante de Lok (Belkina et al., 2009), et leur inactivation est

dépendante de Rac1 et Cdc42 (Faure et al., 2004). Lors du rolling l'inactivation des ERM par stimulation via des chimiokines, aboutit à un effondrement des microvilli et donc à l'arrêt du rolling (Brown et al., 2003).

#### *2.1.1.2- L'arrêt sur les cellules endothéliales*

L'arrêt sur les cellules endothéliales intervient après la dissolution des microvilli et l'étalement des cellules T. Cette étape correspond à un changement de conformation et une augmentation de l'affinité des intégrines (Campbell et al., 1998). Cette famille de 24 membres constitue un des principaux groupes de molécules d'adhésion. Dans les LT, les intégrines les plus étudiées sont LFA-1 ou intégrine  $\alpha_1\beta_2$  et VLA-4 ou intégrine  $\alpha_4\beta_1$ , ayant entre autres pour ligand ICAM-1 et VCAM-1 respectivement. Ces intégrines sont liées aux filaments d'actine via différents adaptateurs dont la taline. La queue cytoplasmique des intégrines lie aussi ILK (integrin-linked kinase) qui recrute entre autre  $\alpha$ -PIX qui à son tour recrute et active Rac et Cdc42, aboutissant à la polymérisation d'actine (Brakebusch and Fassler, 2003). Nous reviendrons plus bas sur la régulation de ces protéines, en particulier LFA-1, mais elles sont responsables de l'arrêt des cellules T sur les cellules endothéliales.

#### *2.1.1.3- L'établissement de la polarité*

Les LT vont ensuite s'étaler sur les cellules endothéliales et se polariser c'est-à-dire rompre leur symétrie. Ces modifications sont très importantes pour la migration directionnelle des LT et sont régulées par le cytosquelette. La migration est induite par des chimio-attractants solubles ou fixés sur d'autres cellules, et par des signaux d'adhésion. La première étape est une redistribution de l'actine-F qui passe d'une organisation symétrique tout autour de la cellule à une concentration au front de migration. Les LT en mouvement présentent une morphologie polarisée avec trois compartiments distincts : une protrusion membranaire correspondant à un large lamellipode plat à l'avant dans le sens de la migration ; le corps cellulaire avec le noyau et l'arrière de la cellule avec une extension membranaire appelé uropode (Samstag et al., 2003). L'avant de la cellule contient les récepteurs aux chimiokines (Nieto et al., 1997), FAK (focal adhesion kinase), l'actine-F, des protéines de liaison à l'actine comme la taline, la vinculine, ou l' $\alpha$ -actinine, des RhoGTPases et des molécules d'adhésion comme LFA-1 (**Figure 1.18**). La partie centrale contenant le noyau présente une forme



arrondie. Entre l'uropode et le corps cellulaire se trouve le MTOC. Au niveau de l'uropode, se trouvent les protéines ERM, ICAM-1, CD43, CD44 et le TCR (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004). Le regroupement des molécules d'adhésion à l'uropode est dépendant des ERM.

La polarisation des cellules en migration est donc définie par la distribution asymétrique des protéines cytoplasmiques, des récepteurs aux chimiokines, des molécules d'adhésion, mais également des cytosquelettes d'actine et de microtubules. Le complexe Par (Par3/Par6/PKC $\zeta$ ) participe également à la mise en place de cette polarité cellulaire, et plus précisément Par 6 et PKC $\zeta$  (Real et al., 2007), sous le contrôle de Cdc42. Les complexes Crumbs et Scribble (composé des protéines Lgl (lethal giant larvae), Dlg (Disc large 1 à 4) et Scribble) sont accumulés à l'arrière des LT, et également nécessaires à la polarisation. L'inhibition de l'expression de Scribble empêche la polarisation des récepteurs à la surface cellulaire et les changements morphologiques comme la formation de l'uropode (Ludford-Menting et al., 2005). La protéine Dlg est localisée à l'uropode grâce à l'association de son domaine PDZ aux ERM (Lue et al., 1996).

#### *2.1.1.4- Les migrations bi et tri-dimensionnelles*

Lors de la migration sur les cellules endothéliales ou lors de la diapédèse (ou migration trans-endothéliale), les LT adoptent un déplacement de type amiboïde, migration rapide et dynamique avec une morphologie en remodelage permanent (**Figure 1.19**). La migration se fait par des mouvements alternatifs d'extension de l'avant de la cellule et de rétraction de l'uropode. Ces mouvements sont régulés par des cycles de polymérisation et de contraction de l'acto-myosine :

- l'actine se polymérise et forme un réseau d'actine branchée dans le lamellipode : nucléation de l'actine par Arp2/3 activé par WASp et élongation de filaments existants

- cette nouvelle extension s'attache au substrat via la formation de sites d'adhésion dans lesquels s'assemblent l'actine-F, les molécules d'adhésion de la famille des intégrines et les protéines de liaison à l'actine : la stimulation des intégrines induit leur agrégation et le recrutement, au niveau de leur domaine cytoplasmique, d'un complexe formé par l'actine-F, la taline, la vinculine, l' $\alpha$ -actinine, et FAK. Ce complexe va permettre de lier les sites d'adhésion aux filaments d'actine.

- la myosine II va générer des forces le long des filaments d'actine induisant la

contraction du corps cellulaire

- enfin l'uropode se détache du substrat et se rétracte, ce mouvement est également dépendant de la myosine II et de son activation par RhoA (Smith et al., 2003) et par la signalisation  $Ca^{2+}$  (Eddy et al., 2000; Lawson and Maxfield, 1995). La force générée par la myosine rompt les interactions intracellulaires entre les intégrines et le cytosquelette d'actine (Cox and Huttenlocher, 1998). L'inhibition de l'activité de la myosine II par blocage de la phosphorylation de la MLC bloque la rétraction de l'uropode dans les neutrophiles (Eddy et al., 2000).

La contraction induite par la myosine II à l'avant est importante pour maintenir la progression de la cellule vers l'avant, et est régulée cette fois par la kinase ROCK et la calmoduline (**Figure 1.20**), (Smith et al., 2003). La myosine est donc responsable de la génération de forces motrices, permettant l'extension du lamellipode et la rétraction de l'uropode, mais également de la rigidité corticale permettant aux cellules d'évoluer dans des zones confinées, comme le montre l'inhibition ou le knock-out de la myosine IIA qui induit une diminution de la rigidité et une augmentation de l'étalement (Jacobelli et al., 2010). Cette contractilité est également importante pour que les cellules T résistent au flux sanguin lorsqu'elles migrent sur les cellules endothéliales.

### **2.1.2- Interactions Lymphocytes T – Cellules présentatrices d'antigènes**

Après avoir traversé la barrière épithéliale, les LT naïfs entrent dans les organes lymphoïdes secondaires à la recherche des CPA présentant l'Ag spécifique du TCR qu'ils expriment. La migration intranodale présente les mêmes caractéristiques que celle décrite précédemment.

#### *2.1.2.1- Etat d'activation des LT*

Les cellules dendritiques font parties des trois types de CPA présent dans les ganglions avec les lymphocytes B (LB) et les macrophages et sont les plus efficaces pour déclencher une réponse primaires *in vivo*. Les LT naïfs interagissent dans les zones T des ganglions avec des cellules dendritiques, suivant trois phases qui se différencient par la dynamique des interactions ente les LT et les DC (Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004). Tout d'abord les LT, très mobiles, établissent des contacts courts (~5min) avec les DC, cette

phase de « scanning » des DC d'environ 8h permet aux LT de chercher les complexes CMHp spécifiques de leurs TCR. Puis les cellules T ralentissent et établissent des contacts plus longs (>60min). Cette seconde phase d'environ 12h permet le début de la production de cytokines comme l'IL-2 et de la prolifération des LT. Et enfin les LT retrouvent une grande mobilité et prolifèrent fortement. L'état d'activation du LT est donc un paramètre important pour l'étude des interactions LT-CPA. Des interactions entre LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> activés et cellules dendritiques ont également été rapportées dans les tissus. Ces interactions permettraient de ré-activer les LT (Thornton et al., 2012). La morphologie des DC, dépendante de leur état de maturation, est également déterminante pour la nature de l'interaction avec les LT comme nous le verrons plus bas.

Les LT CD4<sup>+</sup> activés peuvent également activer les DC, via l'expression du CD40L (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996) ou la sécrétion de cytokines comme l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$  (D'Andrea et al., 1995; Ma et al., 1996; Miro et al., 2006).

#### *2.1.2.2- Etat de maturation des DC*

Les degrés de maturation ou d'activation des DC sont également des facteurs importants pour l'activation des LT et déterminent la nature de l'interaction. En effet les DC expriment différentes molécules de surface impliquées dans l'interaction avec les LT : molécules de CMH-I et CMH-II, LFA-1, ICAM-1, et les molécules de costimulation comme CD80 et CD86. Les DC immatures expriment les molécules de CMH à un niveau modéré, et la maturation des DC entraîne une augmentation de l'expression de ces molécules ainsi que des molécules de costimulation (Cella et al., 1997; Hart, 1997). Les LT interagissent faiblement avec les DC immatures, ces interactions n'aboutissant pas à la formation de synapses dites matures (voir plus bas) (Benvenuti et al., 2004). Et il a été observé que les LT CD8<sup>+</sup> présentaient une plus grande mobilité dans le ganglion en présence de DC immatures qu'en présence de DC matures présentant le même peptide agoniste (Hugues et al., 2004). La nature et la concentration du peptide présenté par le CMH sur les DC est également déterminant pour la nature et la stabilité du contact établi avec les LT. Même s'il a été montré que les DC matures peuvent former des interactions longues avec les LT naïfs en absence d'Ag, alors que les DC immatures n'ont pas cette capacité (Benvenuti et al., 2004; Blanchard et al., 2004).

### 2.1.2.3- Interactions LT-LB

Les LT CD4<sup>+</sup> interagissent également avec les LB. Des lignées cellulaires T et B ont été utilisées pendant de nombreuses années, ces interactions servant de modèle de formation de la synapse. Ces interactions ont lieu dans les ganglions, soit dans les zones T lorsque les LB quittent les zones B, soit lorsque les LT CD4<sup>+</sup> se différencient en cellules Tfh (folicular helper) après activation, et se déplacent alors aux bords des zones B. Les interactions LT-LB, importantes pour les fonctions B, interviennent après sur-expression du CD40L par les LT CD4<sup>+</sup> permettant d'engager le CD40 à la surface des LB.

### 2.1.3- Autres interactions

Au cours de leur développement et de leur vie, les LT interagissent avec de nombreuses cellules autres que les cellules dendritiques et les LB présentés précédemment. Les thymocytes interagissent avec des cellules épithéliales corticales et médullaires dans le thymus lors des sélections positives et négatives. Les LT CD8<sup>+</sup> interagissent avec des cellules cibles, tumorales ou infectées par un virus. Ces interactions induisent la formation de synapses ressemblant à celles établies entre LT CD4<sup>+</sup> et LB. Les LT pourraient également interagir avec les cellules NK, probablement au niveau des tissus lymphoïdes secondaires, mais ces interactions sont pour l'instant très mal décrites ou caractérisées.

Des interactions homotypiques entre LT ont également été mises en évidence. Généralement les interactions longues entre LT naïfs et DC après reconnaissance de l'Ag, induisent la sécrétion de CCL3 et CCL4 par les DC matures et les LT activés. Ces chimiokines vont recruter d'autres cellules T au site d'activation formant ainsi des agrégats de cellules T. Ces interactions T-T qui ne semblent pas stables *in vivo* (Sabatos et al., 2008), semblent toutefois jouer un rôle dans la mise en place d'une réponse immune (Gerard et al., 2013; Sabatos et al., 2008), avec par exemple le rôle des interactions homotypiques LT CD8<sup>+</sup> dans la génération d'un pool de LT CD8<sup>+</sup> mémoires (Gerard et al., 2013).

Nous nous intéresserons par la suite uniquement aux interactions entre LT et cellules dendritiques ou entre LT et LB.

## **2.2- Organisation de la synapse**

L'interaction stable entre un LT et une DC ou un LB induit la formation d'une synapse immunologique au niveau de la zone de contact entre les deux cellules. Cette synapse correspond à l'organisation spatiale et temporelle de récepteurs spécifiques, de molécules de signalisation et d'adhésion. Nous décrivons dans cette partie l'organisation des différentes synapses et le rôle du cytosquelette dans la mise en place de la synapse. Des zones de contact organisées ont également été décrites entre LT et DCs en absence d'Ag spécifique et même en absence de complexes CMH (enrichissement du TCR et PKC $\theta$ , exclusion de LFA-1 et de CD43), (Revy et al., 2001). Les mécanismes à l'origine de la formation de cette synapse Ag-indépendante ne sont pas décrits, nous nous concentrerons donc sur la synapse formée en présence de complexes CMHP agonistes.

Dans la plupart des cas donc, la formation de la synapse est initiée après stimulation du TCR par le complexe CMH-peptide agoniste. Cette liaison déclenche des cascades de signalisation en aval du TCR, mais le fait que la formation d'un contact stable et d'une synapse entre LT et CPA soient nécessaires à une activation complète du LT n'est pas encore clairement établi (voir plus bas). Nous avons donc choisi de traiter en premier lieu la formation de la synapse avant la signalisation en aval du TCR (partie III), même si l'inverse aurait pu également se justifier.

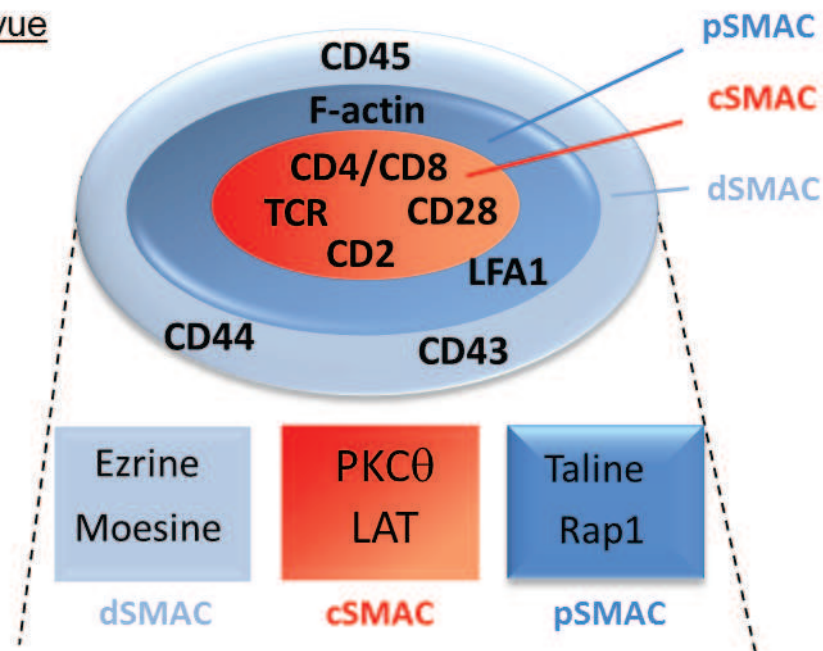
### **2.2.1- Synapse concentrique**

#### *2.2.1.1- Description*

La synapse monocentrique est la première à avoir été décrite, au contact entre des lignées lymphocytaires T et B (Monks et al., 1998), ou grâce au modèle de bi-couche lipidique (Grakoui et al., 1999), même si un recrutement particulier des molécules à l'interface entre LT et LB avait déjà été rapporté quelques années plus tôt (Kupfer et al., 1987). La synapse monocentrique, observée entre LT et LB ou LT et DC matures, est également appelée synapse en œil de bœuf ou synapse de Kupfer. Elle s'organise en trois zones nommées SMAC (Supra Molecular Activation Cluster) où ségrègent des molécules membranaires :

- Le cSMAC, ou zone centrale : regroupant le complexe TCR-CD3

“En face” vue



**Figure 1.21 : Organisation de la synapse de Kupfer**

Vue « en face » de la synapse établie entre un LT et une CPA (LB ou DC mature), décrite par A. Kupfer. Les complexes TCR-CD4, le CD28 et le CD2 sont concentrés au niveau du cSMAC (central-SMAC), les molécules d'adhésion comme LFA-1 sont localisées au niveau du pSMAC (peripheral-SMAC) avec l'actine polymérisée et les protéines encombrantes et chargées comme CD43 ou la phosphatase CD45 sont exclues du centre de la synapse et recrutées au dSMAC (distal-SMAC). La localisation de ces différentes protéines membranaires régule la localisation de protéines de signalisation cytoplasmiques associées : PKCθ et LAT sont au niveau du cSMAC, la taline et Rap1 liées à LFA-1 sont au niveau du pSMAC et les ERM liées à CD43 sont au dSMAC. Cette description très schématique et figée d'une synapse mature ne rend compte de la dynamique de mouvements des microclusters de récepteurs et molécules de signalisation commentée plus bas.

(Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998), CD4 ou CD8, CD2 (Singleton et al., 2006) et CD28

- Le pSMAC ou zone périphérique regroupant les molécules d'adhésion comme LFA-1 (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998)
- Le dSMAC ou zone distale excluant les grosses molécules de la synapse, comme CD43 (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001; Roumier et al., 2001) et CD45 (Freiberg et al., 2002)

L'organisation de ces récepteurs membranaires est concomitante à une redistribution spatiale de molécules de signalisation cytosoliques : PKC $\theta$  et LAT sont recrutées au niveau du cSMAC avec le complexe TCR-CD3, alors que la taline ou Rap1 sont situées au niveau du pSMAC avec LFA-1, et les protéines ezrine et moesine sont situées au niveau du dSMAC avec le CD43 (**Figure 1.21**).

Pour expliquer cette organisation spatiale des molécules à la membrane SJ. Davis et A. Van de Merwe ont proposé un modèle dit de « kinetic-segregation » proposant une explication simple à cette redistribution : les molécules à la surface du LT ségrègeraient en fonction de leur taille. Les petites molécules (CD2, CD28, CD4/8) se trouveraient au niveau de la zone centrale, permettant la formation d'une zone de contact étroit entre LT et CPA ; et les molécules de grosses tailles seraient exclues du centre de cette zone éloignant ainsi les phosphatases du TCR (Davis and van der Merwe, 1996). Plusieurs données sont venues confirmer ce modèle : l'augmentation de la taille du domaine extracellulaire du CMHp perturbe la dissociation des TCR et des molécules de CD45 et bloque la signalisation en aval du TCR (Choudhuri et al., 2005) ; l'augmentation de la taille du ligand de CD2, CD48, inhibe l'interaction TCR-CMHp et la production d'IL-2 (Wild et al., 1999) ; la diminution de la taille du domaine extracellulaire de CD45 bloque la transduction du signal TCR, et le domaine extracellulaire de CD45 remplacé par celui de CD43 permet de rétablir cette signalisation, confirmant que la taille des protéines est importante pour l'organisation de la synapse et la transmission du signal TCR (Irlles et al., 2003). Des expériences similaires de variations des domaines extracellulaires de CD45 ont été réalisées plus récemment, en introduisant ces diverses constructions dans des cellules HEK en conjugués avec des cellules Raji exprimant des complexes CMH-I-peptide, CD58 et LFA-1 (James and Vale, 2012). Ces expériences ont permis de confirmer ce modèle avec certaines nuances. En effet, bien que la taille influence l'exclusion des molécules, les protéines membranaires avec de petits domaines extracellulaires (domaine phosphatase intracellulaire du CD45 fusionné avec le domaine

extracellulaire de CD86 de la même taille que le TCR) peuvent également être exclues, suggérant que d'autres forces régulent ce processus. Donc sans être remis en cause, ce modèle de « kinetic-segregation » tend à être modifié par les données sur le rôle du cytosquelette dans la mise en place et l'organisation de la synapse.

### *2.2.1.2- Notion de microclusters*

Les microclusters sont de petits agrégats de molécules membranaires ou cytosoliques. Les molécules de TCR à la membrane s'agrègent en microclusters qui se forment au niveau du dSMAC, puis migrent vers le pSMAC pour former de plus gros clusters, et finalement gagnent le centre de la synapse pour former le cSMAC (Varma et al., 2006; Yokosuka et al., 2005). Cette zone de la synapse est maintenant décrite comme le lieu d'internalisation des microclusters de TCR et d'arrêt de la signalisation par le TCR. La formation des microclusters lors de la mise en place de la synapse concerne également des protéines de signalisation dont nous discuterons dans la partie III de cette introduction. L'analyse de LT individuels révèle que le flux de  $Ca^{2+}$  est induit en parallèle de la formation de microclusters, un événement très rapide qui précède la formation du cSMAC (Saito et al., 2010). Le traitement avec des Ac anti-CMH pendant l'activation des cellules T bloque la formation de nouveaux microclusters et arrête la signalisation et le flux calcique après 2 min (Varma et al., 2006).

Le récepteur co-stimulateur CD28, après liaison à son ligand, est également enrichi dans les microclusters TCR, indépendamment de sa signalisation puisque l'absence de la région cytoplasmique qui lie PKC $\theta$  n'empêche pas son incorporation dans les microclusters (Yokosuka et al., 2008). Le CD28 est transporté vers le cSMAC dans ces microclusters où il ségrège au niveau d'un anneau autour des microclusters de TCR (**Figure 1.22**), (Yokosuka et al., 2008). Contrairement aux microclusters de TCR et de ZAP-70 qui sont internalisés au niveau du cSMAC, les microclusters de CD28 et PKC $\theta$  sont maintenus dynamiquement dans le cSMAC, comme le montrent des expériences de FRAP, révélant que ces microclusters réapparaissent après photo-bleaching (Yokosuka et al., 2008).

L'augmentation de la puissance et de la résolution des microscopes au cours des dernières années a donc permis d'introduire cette notion de microclusters et de visualiser plus précisément leur mouvement, proposant ainsi des schémas plus précis de distribution des molécules à la synapse (Fooksman et al., 2010). Etant donnée la nature très fluide des contacts



observés *in vivo*, il est difficile de déterminer si l'organisation si uniforme et stationnaire des synapses généralement décrites *in vitro* représente réellement la nature des synapses immunologiques au niveau physiologique. L'apport de la microscopie bi-photonique permettra sûrement de répondre à ces questions dans un proche avenir, approfondissant ainsi des observations déjà faites, comme la distribution des molécules LAT-GFP à la membrane plasmique ou dans des compartiments intracellulaires dans des LT CD4<sup>+</sup> activés en synapse avec des DC dans les ganglions (Azar et al., 2010), ou la distribution des molécules TCR-GFP dans des LT naïfs (Friedman et al., 2010).

### 2.2.2- Synapse multifocale

L'état de maturation des DC joue également un rôle dans la morphologie de la synapse comme nous l'avons vu précédemment. En effet il a été montré que les DC immatures formaient peu de conjugués stables avec les LT, ce qui induisait une organisation de la synapse différente, sans recrutement du TCR et de PKC $\theta$  au centre de la synapse, et sans exclusion de LFA-1 en périphérie (**Figure 1.23**), (Benvenuti et al., 2004; Blanchard et al., 2004; Brossard et al., 2005; Revy et al., 2001). Contrairement aux DC matures, les DC immatures en contact avec des LT forment des synapses dites multifocales (Brossard et al., 2005). Ces synapses sont caractérisées par des zones multiples de ségrégation des molécules plutôt qu'une zone unique comme dans la synapse décrite par Kupfer. La synapse multifocale présente donc de multiples structures proches du cSMAC, sans l'exclusion des molécules généralement retrouvées dans le pSMAC.

### 2.2.3- Cytosquelette et formation de la synapse

Lors de l'interaction des LT avec les CPA, les cellules T s'arrondissent, rétractent leur uropode et étendent un large lamellipode vers la CPA, via une polymérisation active d'actine. Parallèlement à cet enrichissement d'actine polymérisée, le MTOC du LT se polarise vers la CPA, entraînant avec lui l'appareil de Golgi et toute la machinerie sécrétoire. Cette réorientation a été observée par de nombreux groupes et reconnue comme l'une des marques de l'engagement productif des cellules T menant à leur activation et à leurs fonctions effectrices (Kupfer et al., 1985; Kupfer et al., 1994).

### 2.2.3.1- Réorganisation du cytosquelette d'actine à la synapse

La réorganisation du cytosquelette d'actine à la synapse est déclenchée par la stimulation du TCR, mais elle régule également la signalisation en aval du TCR (partie III de cette introduction). Les cellules s'arrondissent et accumulent de l'actine-F à l'interface entre LT et CPA. Ces changements morphologiques sont régulés par la myosine IIA et les protéines ERM. L'activité de la myosine IIA contrôle la rigidité membranaire et la formation/rétraction de l'uropode (Burkhardt et al., 2008). En parallèle, les ERM sont inactivées par la stimulation du TCR, ce qui induit la rétraction des microvilli (Brown et al., 2003), et une dissociation du cytosquelette d'actine de la membrane plasmique permettant une diminution de la rigidité corticale des cellules T (Faure et al., 2004). Cette relaxation de la membrane ainsi que l'effondrement des microvilli, permettent aux LT de s'étaler sur les CPA, augmentant ainsi la surface de contact entre les deux cellules. Cet étalement a été largement décrit en utilisant des surfaces recouvertes d'Ac activateurs fixés sur lames ou intégrés dans des bi-couches lipidiques (Bunnell et al., 2001; Grakoui et al., 1999). Après l'engagement du TCR et l'étalement du LT sur la CPA, l'actine se polymérise activement dans la zone de contact et s'exclue du centre de la synapse pour se concentrer au pSMAC. Les mécanismes qui régulent cette exclusion ne sont pas clairement définis, mais l'hypothèse acceptée par tous, est qu'elle se fait par des mouvements de flux centripète aux bords de la synapse.

L'accumulation et la polymérisation des filaments d'actine dans le lamellipode résultent du recrutement de nombreux régulateurs de l'actine, tout comme pour la formation du lamellipode lors de la migration des cellules T présentée plus haut. L'engagement du TCR mène à l'activation de SLP-76 et LAT, qui recrutent Vav1, qui lui-même recrute et active Rac1 et Cdc42, qui interagissent avec WAVE2 et WASp respectivement, qui recrutent et activent le complexe Arp2/3 aboutissant à la nucléation d'actine, comme décrit dans la partie I de cette introduction (**Figure 1.24**), (Burkhardt et al., 2008; Fooksman et al., 2010). L'inhibition d'Arp2/3 dans les cellules Jurkat, induit un défaut de polymérisation d'actine à la synapse. Les cellules forment des filopodes et non un lamellipode autour de l'APC ou sur la lame recouverte d'Ac anti-CD3 (Gomez et al., 2007). L'implication de WASp dans la polymérisation d'actine à la synapse n'est, elle, toujours pas clairement établie. En effet, de nombreuses études ont rapporté des défauts d'organisation de l'actine dans les cellules T provenant de patients WAS (Notarangelo and Ochs, 2003), mais l'inhibition de WASp dans des cellules Jurkat par siRNA n'altère pas la polymérisation d'actine (Cannon and Burkhardt, 2004), et les résultats dans les cellules T provenant de souris KO ne sont pas concluants. Ces

résultats s'expliquent probablement par la redondance avec d'autres protéines comme WAVE2 ou N-WASp. Une étude récente du groupe de M.Dustin propose que la polymérisation d'actine dépendante de WASp n'est pas indispensable à l'activation des LT, mais qu'en revanche WASp est impliqué dans la durée des contacts entre LT et CPA (Sims et al., 2007).

La dynamine-2 serait également impliquée dans la polymérisation d'actine à la synapse (Gomez et al., 2005), mais le mécanisme n'est pour l'instant pas connu. Etant donné le rôle de la dynamine dans les mécanismes d'endocytose, il serait intéressant d'étudier cette protéine faisant peut-être le lien entre régulation de l'actine et machinerie endocytique à la synapse.

La formation et le mouvement des microclusters dépendent de l'actine-F (Campi et al., 2005; Tskvitaria-Fuller et al., 2003), comme le montre le traitement des cellules T à la latrunculine-A qui inhibe la formation et le mouvement des microclusters ainsi que la signalisation (Campi et al., 2005; Varma et al., 2006). Mais à la différence des microclusters de TCR qui gardent une certaine stabilité indépendamment de l'actine (les microclusters pré-formés persistent quelques minutes après traitement à la latrunculine, (Varma et al., 2006)), les clusters d'intégrines se désintègrent dès l'ajout de la drogue (Kaizuka et al., 2007). Le flux d'actine aux bords de la synapse permettraient donc de maintenir les molécules d'adhésion comme LFA-1 au niveau du pSMAC et d'entraîner les clusters de TCR vers le cSMAC (Kaizuka et al., 2007). Mais il est à ce jour difficile d'expliquer comment le flux d'actine permet à la fois de maintenir certaines protéines au niveau du pSMAC et d'en concentrer d'autres au niveau du cSMAC. Les expériences décrites précédemment avec la latrunculine apportent peut-être une réponse : la stabilité des microclusters dépendrait (LFA-1) ou non (TCR) de la polymérisation de l'actine.

L'exclusion de CD43 au niveau du dSMAC et à l'uropode est un processus actif qui dépend de l'interaction de la queue cytosolique de CD43 avec les ERM (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001). L'inactivation de ces ERM, induite de façon transitoire par déphosphorylation après engagement du TCR, permet une plus grande mobilité des protéines de surface (**Figure 1.24**), (Faure et al., 2004). Rapidement, ces protéines sont re-phosphorylées et ré-interagissent avec CD43, exclu par les mouvements d'actine au niveau du dSMAC et au pôle distal.

La co-stimulation du TCR par CD2 ou CD28 est nécessaire à l'induction de la déphosphorylation et de l'activation de la cofiline (Eibert et al., 2004). La cofiline activée est recrutée en périphérie de la synapse. Elle induit la dépolymérisation de l'actine en périphérie, permettant la nucléation de nouveaux filaments par le complexe Arp2/3, créant ainsi une dynamique de polymérisation d'actine à la synapse. L'activation de la cofiline par CD2 et CD28 rend compte en partie de l'activité co-stimulatrice de ces molécules (Huang and Burkhardt, 2007). Le lien entre activation des LT et ce rôle de la cofiline dans la dynamique de polymérisation de l'actine est confirmé par le fait que l'inhibition de l'interaction entre la cofiline et l'actine lors de la stimulation des LT, bloque la formation de la synapse et la sécrétion de cytokines (Eibert et al., 2004), (**Figure 1.24**).

#### *2.2.3.2- Rôle de la myosine dans la formation de la synapse*

Le rôle de la myosine IIA dans la formation de la synapse n'est à ce jour toujours pas clairement établi. Il existe une controverse concernant les étapes que la myosine IIA régulerait. La première étude cherchant à établir le rôle de la myosine IIA dans la formation de la synapse, a été réalisée avec l'inhibiteur de la myosine IIA, la blebbistatine, sur des LT murins en conjugués avec des LB. Les auteurs ont alors montré que la myosine IIA ne jouait pas de rôle dans la formation de la synapse, résultat basé sur l'analyse de la polarisation du MTOC, de l'actine, de CD3 et de LFA-1 (Jacobelli et al., 2004). Depuis cette étude, de nombreuses autres utilisant des techniques d'imagerie beaucoup plus performantes, ont montré que la myosine IIA contrôlait le flux centripète d'actine en périphérie de la synapse et le mouvement des microclusters (Ilani et al., 2009; Kumari et al., 2012; Yi et al., 2012; Yu et al., 2012). D'autres études, en revanche, ont montré que l'actine-F contrôlait le mouvement des microclusters, alors que la myosine IIA régulait la stabilité de la synapse (Babich et al., 2012; Beemiller et al., 2012).

Dans ces différentes études, les auteurs ont utilisé des LT murins, des Jurkat ou des LT primaires humains, traités à la blebbistatine ou transfectés avec des siRNA, en conjugués avec des LB ou déposés sur des bi-couches lipidiques. Une revue récente a cependant tenté de comparer tous ces différents résultats, et fait ressortir l'aspect non résolu de la controverse sur le rôle de la myosine dans la formation de la synapse et le mouvement des microclusters (Hammer and Burkhardt, 2013).

### 2.2.3.3- Réorganisation du cytosquelette de microtubules

La stimulation du TCR induit également la réorganisation du cytosquelette de microtubules, caractérisée par la polarisation du MTOC à la synapse (Geiger et al., 1982; Kupfer et al., 1983). En réponse à une stimulation du TCR, le MTOC se polarise et se place juste sous la membrane au centre de la synapse (Stinchcombe et al., 2006), avec les microtubules ancrés à la membrane au niveau du pSMAC. Cette polarisation est contrôlée par la signalisation en aval du TCR, cependant, une signalisation partielle par un seul ITAM semble suffisante pour induire la polarisation du MTOC à la synapse (Lowin-Kropf et al., 1998). La signalisation en aval du TCR qui contrôle la polarisation du MTOC, fait intervenir p56Lck (Lowin-Kropf et al., 1998; Tsun et al., 2011), Fyn (Ley et al., 1994), ZAP-70 (Blanchard et al., 2002), LAT et SLP-76 (Bonello et al., 2004; Kuhn and Poenie, 2002), Vav, PKC (Nesic et al., 1998; Quann et al., 2011; Real et al., 2007) et la kinase caseine I delta (CKI $\delta$ ) (Zyss et al., 2011). Les DC matures induisent plus efficacement cette polarisation que les DC immatures (Benvenuti et al., 2004), probablement parce qu'elles induisent une meilleure signalisation dans les LT.

La polarisation du MTOC est dépendante de la dynéine, recrutée à la synapse via son interaction avec l'adaptateur ADAP (Combs et al., 2006) ou via DAG (Quann et al., 2009). L'inhibition d'ADAP dans des cellules Jurkat avec des siRNA empêche le recrutement de la dynéine à la synapse et la polarisation du MTOC (Combs et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés quelques années plus tard par l'équipe de Sanchez-Madrid qui montre que le complexe dynéine-dynactine contrôle la réorientation du MTOC (Martin-Cofreces et al., 2008). L'inhibition de ce complexe induit également un défaut de formation du cluster central de TCR. Les RhoGTPases Cdc42 et Rac1 seraient également impliquées dans la polarisation du MTOC à la synapse (Stowers et al., 1995), mais nous reviendrons plus tard sur ce résultat avec lequel nous ne sommes pas d'accord.

Les recherches menées pour comprendre le mécanisme de polarisation du MTOC à la synapse se sont tournées vers la famille des protéines PKCs, car elles requièrent pour certaines la présence de DAG. Or le DAG est généré par l'activation de la PLC- $\gamma$  après stimulation du TCR et est accumulé à la synapse. De plus, l'inhibition de la PLC- $\gamma$  bloque complètement la polarisation du MTOC, et le blocage de l'accumulation de DAG à la synapse bloque également la polarisation du MTOC (Quann et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc un rôle de DAG dans cette translocation à la synapse après stimulation du TCR. Le fait

que le DAG soit impliqué dans la polarisation du MTOC mais pas la signalisation  $Ca^{2+}$  (Quann et al., 2009), suggère que les nPKCs sont impliquées dans la polarisation du MTOC à la synapse, soit PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  et PKC $\theta$ . Cette dernière est la plus étudiée dans les LT et localisée à la synapse (Monks et al., 1997). Son inhibition dans les LT matures entraîne des défauts de prolifération, de sécrétion de cytokines et de différenciation T<sub>H</sub>2 (Marsland and Kopf, 2008). Les protéines PKC $\epsilon$  et PKC $\eta$  sont également recrutées à la synapse (Quann et al., 2011), même si elles ne semblent pas impliquées dans l'activation des LT (Gruber et al., 2005; Monks et al., 1997). Mais l'inhibition combinée de PKC $\epsilon$  et PKC $\eta$  par des siRNA bloque la polarisation (Quann et al., 2011), suggérant une redondance des différentes nPKCs. Comme nous l'avons vu dans la partie I de cette introduction, le complexe Par (Par3-Par6-aPKC) est également recruté à la synapse, mais seulement après 20-30min de contact entre LT et CPA (Bertrand et al., 2010), il apparaît donc plutôt jouer un rôle dans le maintien de la polarité du MTOC. M. Huse propose donc un modèle en deux phases : une phase de réorientation rapide dépendante de DAG, des nPKCs, et de la dynéine, suivie d'une phase de stabilisation dépendante du complexe Par3-Par6-aPKCs (**Figure 1.25**), (Huse, 2012).

#### *2.2.3.4- Rôle du remodelage de l'actine dans la polarisation du MTOC*

Le remodelage du cytosquelette d'actine à la synapse semble jouer un rôle important dans la polarisation du MTOC. La famille des formines, qui intervient dans le remodelage de l'actine, a ainsi été impliquée dans ce processus de polarisation. En effet, l'inhibition de l'expression de FMNL1 et Dia1 par des siRNAs, bloque la réorientation du MTOC (Gomez et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs suggèrent également un rôle d'IQGAP1, mais sans fournir de données expérimentales.

L'eitrine, de la famille des ERM, qui joue un rôle dans le remodelage de l'actine corticale à la synapse, contrôle aussi la polarisation du MTOC et l'intégrité du réseau de microtubules grâce à son interaction avec Dlg1 (Lasserre et al., 2010). L'inhibition de l'expression de l'eitrine qui perturbe l'organisation des microtubules à la synapse, inhibe la dynamique des microclusters de SLP-76, et plus généralement l'activation T (Lasserre et al., 2010). Nous reviendrons dans la partie III de cette introduction sur les liens qui existent entre remodelage des cytosquelettes d'actine et de microtubules à la synapse et signalisation par le TCR.

La liste des molécules impliquées dans la polarisation du centrosome à la synapse est longue. Cependant, les mécanismes (au sens mécanique) sous-jacents ne sont toujours pas connus. L'équipe de G.M. Griffiths propose depuis longtemps que le flux centripète d'actine à la synapse permettrait la polarisation du MTOC (Griffiths et al., 2010), mais à ce jour aucune donnée solide n'a pu le mettre en évidence, et nos données ne vont pas dans ce sens. Un papier récent a mis en avant l'état de stabilité des microtubules comme un facteur important pour la polarisation du MTOC. La formine INF2 stimulerait la formation de microtubules stables, nécessaires à la réorientation du centrosome (Andres-Delgado et al., 2012). Cette activité serait indépendante de celle de nucléation d'actine d'INF2, impliquerait Rac1 et Cdc42, et, de façon surprenante, serait indépendante de la signalisation en aval du TCR (Andres-Delgado et al., 2012).

## **2.3- Maintien du contact**

Après la stimulation du TCR et la formation de la synapse, d'autres molécules interviennent pour maintenir un contact étroit entre le LT et la CPA. Ces molécules d'adhésion jouent donc un rôle primordial dans l'activation des LT.

### **2.3.1- Rôle des intégrines**

#### *2.3.1.1- Présentation et fonctions dans les LT*

Dans les LT les principales molécules d'adhésion appartiennent à la famille des intégrines. Les intégrines composent une grande famille de récepteurs transmembranaires impliqués dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Leurs fonctions de molécules d'adhésion et de récepteurs leur permettent de transmettre des informations sur les propriétés chimiques et mécaniques de l'environnement intracellulaire. Ces hétérodimères sont formés par l'association d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . Jusqu'à présent 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ont été caractérisées, formant 24 intégrines différentes chez les vertébrés, dont 12 exprimées par les leucocytes et les plaquettes (Zhang and Wang, 2012). Les différents résultats utilisant des modèles humains ou murins ont montré que le défaut d'expression ou l'activation des intégrines dans les cellules du système immunitaire entraînait de graves immunodéficiences ou maladies auto-immunes. Dans les LT, les intégrines les plus étudiées

sont LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ ) et VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ), qui se lient, entre autres, à ICAM-1 et VCAM-1 respectivement.

Les intégrines des LT, et principalement LFA-1, interviennent dans deux processus : le premier est l'arrêt et la migration sur les cellules endothéliales exprimant le ligand, discuté plus haut ; et le second est l'établissement et le maintien du contact avec les CPA lors de la formation de la synapse et l'activation des LT. Nous avons vu précédemment que LFA-1 était uniformément distribué à la surface cellulaire dans les LT au repos, et après stimulation du TCR, formait un anneau au niveau du pSMAC lors de la formation de la synapse. Les cellules T CD4<sup>+</sup> déficientes en LFA-1 présentent un défaut d'activation et produisent moins d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 *in vivo* suggérant un défaut d'interaction avec les CPA (Kandula and Abraham, 2004). Et les LT CD8<sup>+</sup> des souris ICAM-1<sup>-/-</sup> établissent des contacts plus courts avec les DC, empêchant l'établissement d'un pool mémoire (Scholer et al., 2008).

### 2.3.1.2- Changement de conformation

Une des particularités des intégrines est qu'elles existent à la surface cellulaire majoritairement dans une conformation courbée ou inactive jusqu'à ce qu'elles reçoivent des signaux activateurs d'autres récepteurs (signalisation inside-out), induisant leur activation caractérisée par un changement de conformation. Les signaux activateurs les plus étudiés dans les leucocytes sont ceux issus des récepteurs aux chimiokines, du TCR et des ligands des sélectines. Ces différentes signalisations agissent sur les queues cytoplasmiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , et induisent l'ouverture de l'intégrine au niveau extracellulaire aboutissant à la conformation intermédiaire (Hogg et al., 2011). Le mouvement de la tête globulaire  $\beta$  provoqué par le décrochage du domaine  $\beta I$  de l'hélice  $\alpha 7$  sur le domaine I de la sous-unité  $\alpha$  ( $\alpha I$  domain), permet l'ouverture complète de l'intégrine, correspondant à la conformation de haute affinité (**Figure 1.26**). Cette forme de haute affinité existe uniquement de façon transitoire, mais la liaison de l'intégrine en conformation active à son ligand permet de maintenir la conformation active de l'intégrine et de déclencher une signalisation intracellulaire (signalisation outside-in).

Les trois formes de l'intégrine existent à l'équilibre à la membrane. Les déséquilibres sont causés par des changements intracellulaires relativement faibles, ou par des forces extracellulaires : forces latérales appliquées par le flux sanguin, ou forces exercées à la



synapse par le LT (Husson et al., 2011) ou la CPA. C'est seulement lorsque la force externe est appliquée via la liaison à ICAM-1 immobilisé que l'activation complète est obtenue, aboutissant à une interaction très forte entre ICAM-1 et LFA-1. La disponibilité récente d'Ac monoclonaux permettant de détecter précisément les différentes conformations de LFA-1 humain a permis de mieux comprendre les évènements moléculaires induisant les changements de conformation de LFA-1 à la surface des LT. KIM127 est un Ac reconnaissant un épitope sur la sous-unité  $\beta 2$ , caché dans la conformation courbée mais exposé dans la conformation ouverte intermédiaire de LFA-1 (Beglova et al., 2002). La forme de haute affinité de LFA-1 peut être détectée en utilisant des Ac monoclonaux spécifiques pour les épitopes 327C et 24. Ce dernier étant situé sur la boucle du domaine I de la sous-unité  $\beta 2$  (Kamata et al., 2002). L'Ac NKIL-16 détecte un épitope de LFA-1 dépendant du  $Ca^{2+}$  et exprimé uniquement lorsque LFA-1 est en agrégats à la membrane (van Kooyk et al., 1991).

Les intégrines sont sensibles aux forces mécaniques extracellulaires et intracellulaires. Lorsque les queues cytoplasmiques interagissent avec les différentes molécules de signalisation comme Rap1, la taline, les kindlines, la vinculine ou l'actine, des tensions ou des forces internes sont générées (del Rio et al., 2009). Nous reviendrons dans la partie III de cette introduction sur les signalisations outside-in et inside-out induites par la liaison de LFA-1 à ICAM-1 et l'engagement du TCR, respectivement ; mais le changement de conformation de LFA-1 est une étape essentielle au maintien du contact entre LT et APC via une interaction très forte entre LFA-1 et ICAM-1, et est dépendante de protéines liées au cytosquelette comme la petite GTPase Rap1 (Katagiri et al., 2000), Rac1 ou PKC.

### *2.3.1.3- Augmentation de l'avidité*

Un autre aspect important de l'activation de LFA-1 est l'augmentation de son avidité résultant de son agrégation à la surface cellulaire. Le cytosquelette d'actine est impliqué dans cette régulation dynamique, induisant le remodelage de la membrane nécessaire au regroupement des molécules LFA-1 (van Kooyk and Figdor, 2000). Les intégrines interagissent avec le cytosquelette d'actine par l'association de leur domaine cytoplasmique avec des protéines de liaison à l'actine comme l' $\alpha$ -actinine, la taline, la vinculine et la filamine. Des agents comme la cytochalasine-D empêchent l'agrégation des intégrines et l'adhésion (Yauch et al., 1997). Ces données suggèrent que LFA-1 est lié au cytosquelette dans son état inactif, et que la levée de ces contraintes permet son agrégation et son activité.

Ceci est confirmé par le fait que l'expression d'un LFA-1 avec un domaine cytoplasmique muté entraîne de grands agrégats et une forte adhésion, indiquant que lorsque LFA-1 n'est pas attaché au cytosquelette, il est activé par défaut même en absence de signaux intracellulaires (van Kooyk et al., 1999). La redistribution de LFA-1 en agrégats augmente sa capacité à lier ICAM-1. Mais des données plus récentes, utilisant de l'imagerie en haute-résolution, suggèrent que les intégrines sont pré-agrégées par l'actine-F dans le lamellipode avant la liaison du ligand (Choi et al., 2008). Ceci permettrait une interaction efficace avec ICAM-1, avant une étape d'agrégation supplémentaire induite par la signalisation inside-out.

Le recrutement de LFA-1 en microclusters au niveau du pSMAC serait dépendant de l'activité de la taline et de son relargage du cytosquelette d'actine, mais serait également régulé par des contractions dépendantes de la myosine IIA et de protéines sensibles aux forces mécaniques auxquelles les cellules sont soumises comme CasL (Kumari et al., 2012), et p130Cas. Là encore ces résultats sont à confirmer puisque le rôle de la myosine IIA dans la formation de la synapse est toujours controversé. Mais le rôle de CasL semble particulièrement intéressant à étudier, car la phosphorylation de CasL est induite par la liaison de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  à son ligand (Murata et al., 2002), et permet l'interaction de CasL à l'adaptateur CrkL (**Figure 1.27**), qui lui-même s'associe à C3G, une GEF de Rap1 (Hogg et al., 2003; Zhang et al., 2003). Il existe donc un lien entre CasL et Rap1, ainsi qu'entre CasL et la myosine IIA (Yu et al., 2012). On peut également noter que p130Cas, homologue de CasL semble jouer un rôle dans la détection des forces mécaniques auxquelles les cellules sont soumises (Sawada et al., 2006).

### 2.3.2- La molécule CD2

CD2 est une glyco-protéine membranaire interagissant avec CD58 et CD48 chez l'Homme et la souris, respectivement. Cette molécule d'adhésion facilite l'adhérence entre LT et CPA (Dustin et al., 1987), et permet un rapprochement des complexes TCR-CMH-peptide car elle est également localisée au niveau du cSMAC et la liaison de cette petite protéine à son ligand permet de placer le LT et la CPA à une faible distance, favorisant les contacts de faibles affinités entre les TCR et les molécules du CMH (Dustin et al., 1997; van der Merwe et al., 1995). L'engagement de CD2 permet son recrutement à la synapse et la formation de celle-ci, comme le montre le blocage de l'interaction entre CD2 et CD58 (Zaru et al., 2002). CD2 fonctionne comme une molécule co-stimulatrice en abaissant le seuil d'activation des LT

(Bachmann et al., 1999). L'engagement de CD2 induit la phosphorylation de PLC- $\gamma$ 1 via la kinase Fyn (Carmo et al., 1993; Espagnollet et al., 2007), ainsi que le recrutement de l'adaptateur CD2AP (CD2-associated protein), (Dustin et al., 1998), qui participe à la polarisation du MTOC dans les Jurkat (Dustin et al., 1998). CD2AP peut également, via des partenaires (CIN85, CPAZ), se lier aux filaments d'actine (Hutchings et al., 2003).

CD2 est donc une molécule d'adhésion et de signalisation qui interagit avec le cytosquelette d'actine, permet la polarisation du MTOC et le maintien du contact entre LT et CPA après la mise en place de la synapse.

## 2.4- Synapses vs kinapses

Nous avons vu jusqu'à présent que les LT naïfs scannaient les CPA à la recherche du complexe CMH-peptide agoniste, puis établissaient des interactions longues menant à la formation de la synapse et à l'activation du LT. Les interactions courtes établies lors du scanning des APC par les LT ont été appelées kinapses par M. Dustin (Dustin, 2007). Ce terme définit la jonction établie entre une CPA et un LT en mouvement, permettant l'intégration de signaux pendant la migration du LT. Le LT formant une kinapse présente un lamellipode au front de migration, dans lequel peuvent se former des microclusters de TCR, entremêlés avec des clusters d'intégrines ; et un uropode contenant la majorité des molécules de TCR ainsi que des structures d'adhésion. L'uropode contient également le MTOC, l'appareil de Golgi et la machinerie d'exocytose et de recyclage, tout comme dans une cellule migratoire. Cette ségrégation serait la principale distinction entre synapse et kinapse (**Figure 1.28**). Synapses comme kinapses sont des vecteurs de communication entre LT et CPA, mais contrairement aux synapses, les kinapses ne présentent pas de polarité avec cette symétrie particulière aux synapses, ni de stabilité ou de caractéristiques de sécrétion directionnelle (Dustin, 2008).

Même si la majorité des molécules de TCR est ségrégée dans l'uropode, les microclusters de TCR au niveau du front de migration sont capables d'induire une signalisation (Mempel et al., 2004), et d'être internalisés (Friedman et al., 2010). Il a été proposé que ces signaux accumulés au cours des kinapses successives permettraient aux LT de réprimer progressivement l'expression de CCR7 et ainsi de réduire la réponse des LT aux chimiokines, permettant le ralentissement des LT (Dustin, 2008). Les LT naïfs scanneront

donc les CPA, formant des kinapses qui leur permettraient de se pré-activer avant de ralentir leur migration et de s'arrêter pour former une synapse stable nécessaire à l'activation complète des cellules T. Mais ce dernier point n'est pas encore clairement établi : les LT ont-ils besoin d'établir des contacts longs ou la succession de kinapses est-elle suffisante pour l'activation des LT ? Il semblerait que l'état d'activation des LT, la nature des APC et l'intensité du signal TCR (affinité des complexes CMHp) détermineraient la nature de l'interaction entre LT et CPA. Les LT naïfs auraient besoin d'établir des synapses stables après le scanning des CPA pour aboutir à leur activation, alors que les LT activés formeraient des kinapses avec les DC et des synapses avec les LB (Azar et al., 2010). De la même façon, l'affinité du TCR pour les complexes CMHp a été impliquée dans la nature des interactions LT-CPA : les synapses seraient formées uniquement avec un signal TCR fort, alors que les kinapses seraient formées après stimulation faible ou forte du TCR (Moreau et al., 2012; Skokos et al., 2007).

Cette balance entre synapse et kinapse a également été proposée pour les cellules NK, selon le type de signaux dominants. L'activation des cellules NK est régulée par une balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs, donnés par l'interaction des récepteurs (activateurs et inhibiteurs) à leurs ligands. Tout comme pour les LT, dans les cellules NK, la liaison de LFA-1 seul induit un étalement cellulaire asymétrique et une migration, alors que la liaison du récepteur activateur NKG2D et LFA-1 induit un étalement symétrique, la formation d'un anneau d'actine et la polarisation vers la cellule cible. La liaison concomitante de récepteurs inhibiteurs induit un retour à la morphologie asymétrique migratoire des cellules NK, correspondant à des kinapses. Ces données montrent que les cellules NK s'étalent et forment des synapses si les signaux activateurs dominant, alors qu'elles forment des kinapses migratoires si les signaux inhibiteurs dominant (Culley et al., 2009).

Les molécules de co-stimulation sont connues pour réguler la formation et la stabilité de la synapse. Les clusters de CD28 lient fortement PKC $\theta$ , qui convertit les synapses en kinapses en rompant la symétrie de la synapse, induisant à nouveau la mobilité des cellules T (Sims et al., 2007). A l'inverse WASp permettrait de restaurer la symétrie et de convertir les kinapses en synapses (Sims et al., 2007), (**Figure 1.29**). Ces résultats mettent en évidence le rôle du cytosquelette et de ces protéines associées dans la dynamique des LT et la formation de structures permettant l'activation des LT.

### 3. Cytosquelette et signalisation

---

La reconnaissance par le TCR de complexes CMH-peptide agoniste induit une cascade de signalisation en aval du TCR aboutissant à la transcription de gènes régulant les réponses T CD4 (prolifération, différenciation, sécrétion de cytokines...). Les cascades de signalisation et les différents acteurs ont été décrits de manière extensive, mais la vision statique et linéaire de la signalisation par le TCR, telle qu'elle est présentée dans les livres de biologie est aujourd'hui obsolète (**Figure 1.30**). On sait maintenant que la régulation de cette signalisation se fait en grande partie au niveau spatial et temporel, avec le recrutement des protéines de signalisation dans certaines zones permettant la transmission du signal entre les différents acteurs de cette signalisation.

Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire les liens qui existent entre cytosquelette et signalisation, sans présenter de manière exhaustive les différentes molécules de signalisation.

#### 3.1- Les microclusters de signalisation TCR

##### 3.1.1- Les microclusters de TCR

###### 3.1.1.1- Présentation

Le TCR, hétérodimère composé des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , ne possède pas d'activité enzymatique et est donc incapable de transmettre un signal. C'est l'association des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  avec les molécules du complexe CD3 qui permet d'induire une signalisation en aval du TCR. Le complexe CD3 est composé de six chaînes polypeptidiques invariantes assemblées en deux hétérodimères CD3  $\delta\epsilon$  et CD3  $\gamma\epsilon$ , et un homodimère CD3  $\zeta\zeta$  (ou rarement un hétérodimère CD3  $\zeta\eta$ , résultant d'un épissage alternatif). Les queues cytoplasmiques des chaînes du complexe CD3 contiennent des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif :  $YxxL(X)_{6-8}YxxL$ ), qui interagissent avec des tyrosines kinases et ainsi permettent la transduction du signal (Samelson et al., 1985). Dans le CD3, les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  contiennent chacune un seul motif ITAM alors que la chaîne  $\zeta$  (et  $\eta$ ) en contient trois.

Comme nous l'avons vu dans la partie II de cette introduction, l'utilisation de

techniques de microscopie de haute résolution avec des LT déposés sur des bi-couches lipidiques contenant des complexes CMHp et des molécules ICAM-1, a permis de montrer que les complexes TCR s'accumulent pour former les microclusters immédiatement après l'attachement des LT à la membrane, précèdent ainsi la formation de la synapse (Campi et al., 2005; Yokosuka et al., 2005). Les microclusters de TCR sont formés initialement au site de contact entre le LT et la bi-couche lipidique mimant l'APC, puis sur toute la surface lorsque les LT s'étalent sur la membrane. Quand l'étalement maximum est atteint, les LT commencent à se contracter et les microclusters de TCR migrent vers le centre de la zone de contact et fusionnent pour former le cSMAC. En fin de migration, les clusters de TCR sont internalisés au niveau du cSMAC (**Figure 1.31**). Après l'engagement initial du TCR par les complexes CMHp, les microclusters de TCR sont générés en continu en périphérie de la zone de contact, dans les structures de type lamellipode riches en actine polymérisée. On pense maintenant que les microclusters de TCR sont les unités responsables de l'induction des signaux d'activation des LT car chaque microcluster de TCR est marqué avec des Ac anti-phospho-tyrosine et anti-phospho-ZAP70 (Bunnell et al., 2002).

### *3.1.1.2- Formation des microclusters de TCR*

A l'heure actuelle, on ne sait pas réellement comment sont formés les microclusters de TCR au niveau de la synapse. Est-ce par agrégation de molécules à la membrane ? Dans des sous-domaines lipidiques particuliers de la membrane ? Par recrutement de vésicules intracytosoliques à la membrane ? Ou par recyclage de vésicules d'endocytose ? L'assemblage des TCRs en microclusters a tout d'abord été décrit grâce à la microscopie confocale avec des LT en conjugués avec des CPA ou déposés sur des bi-couches lipidiques (Bunnell et al., 2002; Grakoui et al., 1999). Ces méthodes ont permis d'observer que la signalisation était organisée au niveau spatial à la synapse, mais ne permettaient pas de décrire au niveau moléculaire ou nanométrique les structures. L'utilisation ultérieure de microscopie de haute résolution (TIRF, PALM...) a permis de visualiser plus précisément ces structures (**Figure 1.32**). L'équipe de B. Alarcon a montré que les molécules de TCR étaient organisées en oligomères préexistants dans les LT au repos (Schamel et al., 2005). Ces oligomères contiennent entre 2 et 20 TCR, pouvant être détectés par microscopie électronique, PALM ou STORM. Ces petites structures d'oligomères ont été appelés nanoclusters (Schamel et al., 2006). Cette organisation des TCRs en nanoclusters suggère que la signalisation peut être

initiée à partir de ces structures par des mécanismes n'impliquant pas nécessairement une agrégation plus importante des TCRs (Alarcon et al., 2011). Cette organisation remet également en cause l'hypothèse d'engagement de molécules uniques de TCR par des complexes CMHp, induisant leur oligomérisation.

Un second mécanisme permettant de générer des conditions favorables à l'agrégation des TCR en microclusters est la levée des contraintes physiques. Après liaison du TCR au CMHp, les queues cytoplasmiques du TCR changeraient de conformation permettant leur dissociation de la membrane plasmique (Gil et al., 2002). Une autre hypothèse de formation des microclusters à la périphérie de la synapse serait le recrutement de vésicules contenant les molécules de TCR à la membrane plasmique, comme pour les vésicules contenant l'adaptateur LAT. Mais pour l'instant aucune donnée solide ne vient conforter ce modèle.

Les molécules de co-stimulation CD28 et CD2 sont également agrégées dans les microclusters de TCR après liaison à leurs ligands, et participent probablement aux mouvements des microclusters par le recrutement de protéines régulant la dynamique de l'actine (Vav, cofiline), (Beemiller and Krummel, 2010). Nous reviendrons plus bas sur la régulation des mouvements des microclusters par cette dynamique d'actine.

### **3.1.2 – Les voies de signalisation**

La signalisation par le TCR requiert un recrutement dynamique de complexes macromoléculaires de nombreux acteurs. La première étape de transduction du signal, très rapide, est le recrutement et l'activation des kinases qui vont phosphoryler les chaînes du complexe CD3 et recruter les molécules adaptatrices. Ce recrutement génère des complexes de signalisation formant des microclusters dynamiques. Bien qu'il ne soit toujours pas établi que les premiers signaux en aval du TCR ont lieu dans les microclusters, leur apparition corrèle avec une signalisation débutée dans les secondes suivant l'engagement du TCR.

Ces microclusters de signalisation sont composés de molécules de TCR associées à différents effecteurs dont ZAP-70, LAT, SLP-76 et PLC- $\gamma$ . Tout comme pour les microclusters de TCR, ces clusters de signalisation sont générés en périphérie de la synapse, où est initiée la signalisation, puis migrent vers le cSMAC, où la signalisation s'arrête. Mais tous les microclusters de signalisation formés au niveau du pSMAC, ne suivent pas le même

mouvement, et certaines molécules de signalisation se séparent du TCR au cours de la migration centripète. Ainsi, lorsque les ligands du TCR sont fixes, comme des Ac anti-CD3 sur des lamelles, les microclusters de TCR et ZAP-70 restent immobiles, alors que les microclusters de SLP-76 migrent vers le centre de la synapse et disparaissent avant d'atteindre le cSMAC (Bunnell et al., 2006). Dans des LT déposés sur des bi-couches lipidiques, les microclusters de TCR migrent vers et se concentrent pour former le cSMAC, et les microclusters de ZAP-70 et SLP-76 disparaissent au cours de la migration vers le cSMAC (**Figure 1.33**), (Yokosuka et al., 2005).

### *3.1.2.1- Recrutement des premières kinases*

L'engagement du TCR induit le recrutement de la kinase Lck, qui phosphoryle les ITAMs des chaînes du complexe CD3, entraînant le recrutement de ZAP-70 (**Figure 1.34**).

Lck est ancrée à la membrane et interagit avec CD4 ou CD8, permettant ainsi le rapprochement spatial de Lck et du TCR-CD3 et la phosphorylation des ITAMs. Son activité est régulée, entre autre, par la déphosphorylation d'un résidu tyrosine par la phosphatase CD45 suite à l'activation du LT (Hermiston et al., 2003). Ceci suggère donc que CD45 doit être à proximité de Lck pour l'activer. Effectivement des analyses de la localisation de CD45 à l'interface entre LT et CPA montrent que CD45 co-localise avec Lck au niveau du cSMACs dans les premières minutes après stimulation du TCR. CD45 se dissocie ensuite de Lck au cours de la maturation de la synapse (Freiberg et al., 2002), et est exclu du centre de la synapse vers le dSMAC par des mécanismes dépendants de la dynamique de l'actine (Hermiston et al., 2003).

Les deux kinases, Lck et ZAP-70, jouent un rôle dans le remodelage du cytosquelette. Dans les LT CD8<sup>+</sup>, l'absence de Lck induit un défaut d'ancrage du MTOC à la synapse associé à un défaut de recrutement des granules cytotoxiques à la synapse (Tsun et al., 2011). L'absence de ZAP-70 dans les cellules Jurkat entraîne un défaut de phosphorylation de LAT et SLP-76, de mobilisation calcique, d'activation de la voie des MAPK, de production d'IL-2 (Williams et al., 1998), ainsi qu'un défaut de polarisation du MTOC et de recrutement de LAT et PKC $\theta$  à la synapse (Blanchard et al., 2002).

Les microclusters de ZAP-70 sont décrits comme identiques à ceux des clusters de TCR. Ils sont générés en périphérie de la synapse par le recrutement de ZAP-70 par Lck au



niveau des chaînes CD3 $\zeta$ . Ces clusters contiennent également l'adaptateur SLP-76. Les microclusters de ZAP-70 semblent migrer par la suite vers le cSMAC mais disparaissent au cours de la migration, avant d'atteindre le centre de la synapse (Yokosuka et al., 2005). Les événements de dissociation des molécules de signalisation des microclusters de TCR ne sont toujours pas connus.

### *3.1.2.2- Recrutement des molécules adaptatrices*

Les molécules adaptatrices font le lien entre les premières kinases recrutées au complexe TCR-CD3 et les voies de signalisation qui aboutissent à l'activation des facteurs de transcription AP-1, NFAT et NF- $\kappa$ B, menant aux réponses cellulaires des LT (activation, différenciation, anergie ou apoptose). Ainsi, ZAP-70 permet le recrutement et l'activation par phosphorylation de LAT et SLP-76 (Bubeck Wardenburg et al., 1996; Zhang et al., 1998). Ces deux protéines adaptatrices forment des plateformes de signalisation en recrutant de nombreux partenaires de signalisation (PLC- $\gamma$ , Grb2, PI3K) et de régulation du cytosquelette d'actine (Vav, PAK), régulant ainsi au niveau spatial la signalisation en aval du TCR (**Figure 1.35**). Le complexe SLP-76/Vav/Nck intervient dans la réorganisation du cytosquelette en recrutant et activant les GTPases Rac1 et Cdc42 qui activent respectivement WAVE2 et WASp, induisant ainsi la polymérisation d'actine par le complexe Arp2/3. Vav1 recrute également la dynamine-2 à la synapse, où cette protéine régule la réorganisation de l'actine (Gomez et al., 2005). Ces plateformes de signalisation formées par régulation de la localisation des protéines et aboutissant à la transduction du signal ont été appelés signalosomes. Ainsi on parle de signalosome LAT pour décrire la plateforme de signalisation créée par le recrutement de multiples molécules de signalisation au niveau de l'adaptateur LAT (Roncagalli et al., 2010).

Les microclusters de SLP-76 sont générés en périphérie de la zone de contact au niveau des clusters de TCR et de ZAP-70. Tout comme ZAP-70, ces clusters disparaissent lors de la migration vers le cSMAC (Bunnell et al., 2002). Plus récemment, le groupe de L. Samelson a décrit une organisation nanométrique des microclusters (Sherman et al., 2011) : ainsi dans les LT au repos et activés, LAT réside tout d'abord dans des nanoclusters (de l'ordre du dimère). Après stimulation du TCR, LAT et TCR $\zeta$  sont observés dans des clusters partiellement co-localisés. On trouve également Grb2 dans les clusters de LAT de toutes les tailles, alors que la PLC- $\gamma$  est plutôt localisée dans les clusters isolés de LAT, et SLP-76 est

localisé en périphérie de ces clusters de LAT (Sherman et al., 2011).

Une des particularités de LAT, molécule transmembranaire, est qu'elle est présente dans les cellules T au niveau de la membrane plasmique et au niveau d'un pool intracellulaire marqué avec la transferrine et contenant également la chaîne  $\zeta$  associée au TCR (Bonello et al., 2004). Initialement, il avait été montré que le pool de LAT à la membrane plasmique, était recruté à la synapse en quelques secondes après stimulation du TCR, alors que le pool intracellulaire était recruté après quelques minutes (Bonello et al., 2004). Puis, en utilisant des techniques de microscopie à haute résolution, il a été montré que les clusters de LAT de la membrane plasmique ne participaient pas à la signalisation après engagement du TCR, mais que les molécules de LAT phosphorylées par ZAP-70 provenaient du pool vésiculaire subsynaptique (Williamson et al., 2011). Notre équipe a récemment montré que le recrutement du pool vésiculaire de LAT, sa phosphorylation et la formation du signalosome LAT, dépendent de VAMP7 (Larghi et al., 2013 sous presse, article en annexe 6). Ainsi, il semble que des mécanismes de transport, d'ancrage et de fusion de compartiments intracellulaires régulent la signalisation par le TCR.

### *3.1.2.3- Activation des MAPK-Erk*

La voie des MAPK (mitogen activated protein kinases) permet de réguler la transcription de gènes et donc la réponse cellulaire après un stimulus. Chez les mammifères, il existe trois groupes de MAPK : Erk1 et Erk2 (extracellular regulated protein), p38 (p38  $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ), et JNK1/2/3 (c-Jun N-ter kinase). La voie des MAPK consiste en une cascade de phosphorylations : les MAPK sont phosphorylées par les MAPKK phosphorylées elles-mêmes par des MAPKKK, aboutissant à la translocation nucléaire de facteurs de transcription. La stimulation du TCR entraîne le recrutement de Grb2 et Sos à la membrane plasmique, et Sos permet alors l'activation de la GTPase Ras qui active Raf-1 (MAPKKK). Raf-1 phosphoryle ensuite Mek (MAPKK) qui phosphoryle à son tour Erk1/2 (MAPK), qui sont alors transportées dans le noyau où elles phosphorylent et activent des facteurs de transcription. L'expression et l'activité de Erk1/2 semble nécessaire à l'activation du facteur de transcription GATA-3 et à la différenciation Th2 (Yamashita et al., 2005).

Il n'a, à ce jour, pas été décrit si les MAPK sont ségréguées en microclusters, mais Erk1/2 sont recrutées à la synapse dans les cellules NK (Giurisato et al., 2009) et les CTL

(Yachi et al., 2006). Certaines études proposent maintenant que Erk1/2 soient impliquées dans la polarisation du MTOC (Chen et al., 2006; Filbert et al., 2012). Certaines protéines de régulation du cytosquelette d'actine pourraient être impliquées dans la voie Erk1/2. En effet, IQGAP1 lie directement Erk1/2, comme nous l'avons vu dans la partie I de cette introduction, et jouerait donc un rôle dans la cascade de signalisation des MAPK (Roy et al., 2004), probablement en régulant l'activation de Erk1/2 au niveau spatial. La régulation spatiale de la voie des MAPK se fait également par la localisation cellulaire de Ras au niveau du Golgi ou de la membrane plasmique, qui initie la cascade de phosphorylations (Prior and Hancock, 2012), avec par la suite la translocation de H-Ras à la synapse dans les cellules NK (Rechavi et al., 2007).

#### 3.1.2.4- PLC- $\gamma$ 1 et $Ca^{2+}$

La phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) est un des membres de la famille des PLCs spécifiques des phosphoinositides qui convertit le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en 1,2-diacylglycerol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). Ces seconds messagers sont impliqués dans l'activation de différentes voies de signalisation : la voie des MAPK, la voie calcique et la voie PKC. La PLC- $\gamma$ 1 est l'isoforme prédominante dans les LT. Les souris déficientes pour cette protéine ne sont pas viables, et meurent au jour 8,5 du développement embryonnaire (Ji et al., 1997). PLC- $\gamma$ 1 est recruté à la membrane par SLP-76/Grads au niveau des clusters de TCR-LAT. Ce recrutement est important pour son activation, car l'inhibition de l'interaction entre SLP-76 et PLC- $\gamma$ 1 diminue l'activation de NFAT et de la voie MAPK-Erk1/2 (Yablonski et al., 2001). Une fois encore, les mécanismes de recrutement de la PLC- $\gamma$  ne sont pas connus.

L'IP3 produit par la PLC- $\gamma$ 1, en se fixant sur ses récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique (RE), induit la libération du  $Ca^{2+}$  contenu dans le réticulum vers le cytosol. Cette augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire permet l'ouverture des canaux calciques CRAC ( $Ca^{2+}$ -release-activated  $Ca^{2+}$  channels) exprimés à la membrane plasmique, et l'entrée massive de  $Ca^{2+}$  extracellulaire vers le cytoplasme, permettant d'activer des enzymes dépendantes du  $Ca^{2+}$  comme la calcineurine, qui déphosphoryle NFAT dans le cytosol, induisant sa translocation dans le noyau (**Figure 1.36**), (Feske et al., 2012; Randriamampita and Trautmann, 2004). De manière générale, 75% des gènes régulés lors de

l'activation des LT sont dépendants du flux calcique et des canaux CRAC (Feske et al., 2001).

### 3.1.2.5- Voie calcique et cytosquelette

La plupart des études menées sur la voie calcique a été réalisée avec des stimuli non physiologiques induisant la déplétion des stocks de  $Ca^{2+}$  et l'activation d'ORAI1/CRAC, comme la thapsigargine, la ionomycine ou l'EGTA ; et des Ac permettant la stimulation du TCR. Ces modèles ont permis une étude quantitative des propriétés des canaux, mais ont négligé un point très important : les LT sont polarisés au cours de l'activation. La réorganisation des récepteurs et des molécules de signalisation, induite par la polarisation des LT lors de la mise en place de la synapse, affecte le dialogue entre les molécules et les organelles impliqués dans les signaux calciques et l'activation des LT. L'inhibition de l'expression de nombreuses protéines régulatrices de l'actine dans les LT induit généralement un défaut de mobilisation de  $Ca^{2+}$ , comme pour Vav, WASp ou WAVE2 (Fischer et al., 1998; Nolz et al., 2006; Zhang et al., 1999)., tout comme l'utilisation de drogues inhibant la polymérisation de l'actine. Mais dans toutes ces études, il est difficile de distinguer les effets de l'actine sur le  $Ca^{2+}$  lui-même ou sur les événements en amont, car l'altération du cytosquelette d'actine perturbe la formation de la synapse, le mouvement des microclusters... Donc relié directement la signalisation calcique au cytosquelette d'actine sera difficile.

Les microtubules pourraient eux aussi jouer un rôle important dans la signalisation calcique. En effet, ils jouent un rôle dans le mouvement des organelles au cours de l'activation T, ils permettent donc la polarisation du réticulum à la synapse, nécessaire à l'interaction de STIM1 (sur le RE) avec ORAI1 (sur la membrane plasmique) et ainsi l'ouverture des canaux CRAC. De plus, il a été montré que STIM1 se liait à la protéine de liaison aux microtubules EB1, facilitant ainsi la polarisation du réticulum à la synapse (Grigoriev et al., 2008).

L'induction de signaux calciques permet également de stabiliser la synapse en régulant la mobilité des cellules. Des études utilisant l'imagerie bi-photonique dans des tissus lymphatiques ont montré que l'augmentation de  $Ca^{2+}$  favorisait la stabilité de la synapse en arrêtant les cellules T sur les CPA (Wei et al., 2003), même si, là encore, il est difficile de faire la distinction entre le  $Ca^{2+}$  en lui-même ou l'activation des PKCs et la signalisation des intégrines. Néanmoins la diminution artificielle du flux calcique *in vitro* entraîne une

inhibition de l'immobilisation des cellules, appuyant donc le rôle de la signalisation calcique dans la mobilité des LT et le maintien des contacts LT-CPA (Donnadieu et al., 1994; Negulescu et al., 1996).

### **3.1.3- Modulation du signal**

#### *3.1.3.1- La zone du cSMAC*

Le cSMAC, initialement décrit comme une zone permettant de concentrer les molécules facilitant ainsi la signalisation en aval du TCR, a par la suite été présenté comme un site où s'arrête la signalisation par l'internalisation des complexes de signalisation du TCR. Le rôle du cSMAC dans la régulation négative de la signalisation a été démontré par des études dans lesquelles la signalisation est augmentée lorsque la formation du cSMAC est bloquée, et bloquée lorsque la formation du cSMAC est induite (Lee et al., 2003; Mossman et al., 2005). Une étude combinant des analyses et des modèles mathématiques a montré que la synapse permettait probablement l'augmentation et la diminution de la signalisation TCR et que des paramètres comme la demi-vie du complexe CMH-peptide intervenaient dans la balance entre ces deux fonctionnalités du cSMAC (Cemerski et al., 2007).

Les microclusters de signalisation du TCR migrent donc vers le cSMAC, mais toutes les protéines associées ne suivent pas ce mouvement. Nous avons vu précédemment que lorsque les cellules T sont déposées sur des bi-couches lipidiques contenant ICAM-1 et CMHp, SLP-76 et ZAP-70 se séparent du TCR au cours de la migration des microclusters vers le cSMAC (Yokosuka et al., 2005), mais le mécanisme et le lieu de séparation des molécules de signalisation du TCR ne sont donc pas encore clairement établis (Lasserre and Alcover, 2010). La zone de cSMAC apparaît finalement comme la zone où se termine la signalisation débutée au niveau du pSMAC.

#### *3.1.3.2- Mécanismes de modulation de l'expression du TCR*

Avant la rencontre de l'Ag, les TCRs sont continuellement internalisés et ré-exprimés à la surface cellulaire. Après engagement par des complexes CMHp agonistes, les microclusters de TCR sont mobiles à la synapse, mais l'expression du TCR à la surface du LT est également régulée négativement (Valitutti et al., 1995). Cette régulation semble être due à

la combinaison d'une augmentation de l'internalisation du récepteur, une diminution du recyclage et une augmentation de la dégradation. Dans les LT stimulés ou non, le TCR est internalisé dans des vésicules recouvertes de clathrine via un motif endocytique dileucine présent sur la sous-unité CD3 $\gamma$ . Ce motif consiste en une séquence DxxxLL liant la protéine adaptatrice AP-2 à la membrane plasmique, qui lie ensuite le TCR à la machinerie d'internalisation dépendante de la clathrine (Balagopalan et al., 2009). Au moins deux voies existent pour la régulation de l'expression du TCR après stimulation : une voie induisant le recyclage du TCR, dépendante de l'activation via PKC, et une voie dépendante de l'activité de Lck (Lauritsen et al., 1998). Un des mécanismes de régulation par Lck implique l'ubiquitinylation des chaînes CD3 $\zeta$  par l'ubiquitine ligase c-Cbl via CD2-AP, et entraîne la dégradation du TCR (Lee et al., 2003). L'activité de Lck induit également la phosphorylation de la chaîne lourde de la clathrine, un évènement corrélé avec l'internalisation du TCR. Le recyclage du TCR permet son accumulation à la synapse, et se fait par des mécanismes de fusion des membranes via les protéines SNARE (Das et al., 2004). L'internalisation et la dégradation du TCR pourraient atténuer la signalisation et/ou assurer un pool intracellulaire de TCR pouvant être recruté à la synapse lors de la rencontre avec la CPA. En effet, dans les souris déficientes en Cbl ou CD2-AP, les LT présentent une augmentation de l'expression du TCR à la surface cellulaire et les réponses biologiques sont augmentées en réponse à une stimulation antigénique (Lee et al., 2003; Rao et al., 2002).

WASp semble également impliquée dans l'internalisation du TCR, comme le montrent les LT déficients pour WASp qui présentent un défaut d'endocytose du TCR après liaison aux complexes CMHp (Zhang et al., 1999). Après l'activation du TCR, la protéine adaptatrice intersectine-2 lie WASp et Cdc42, induisant ainsi l'activation de WASp et sa translocation aux vésicules d'endocytose (McGavin et al., 2001). Ces résultats suggèrent un lien entre le cytosquelette d'actine et la régulation de l'endocytose du TCR.

Le rôle de ZAP-70 dans l'internalisation et la dégradation des complexes TCR-CD3 a également été décrit, impliquant ZAP-70 dans la régulation négative des réponses T (Dumont et al., 2002). Un mécanisme similaire a été décrit dans les LT CD8<sup>+</sup> en contact avec une CPA, dans lesquelles la mutation d'une tyrosine dans le site de liaison de Cbl à ZAP-70 bloque l'internalisation du TCR (Davanture et al., 2005).

### 3. 2- Rôle de l'actine dans la dynamique des microclusters

Le rôle de l'actine dans la dynamique des microclusters permettant la formation ou la dissociation des signalosomes est crucial. En effet, de nombreux facteurs de signalisation du TCR portent des sites de liaison à l'actine elle-même ou à des protéines de liaison à l'actine. A travers ces facteurs associés à l'actine, l'engagement du TCR par un peptide agoniste permet l'assemblage rapide de plateformes de signalisation. L'importance du cytosquelette d'actine dans ce mécanisme a été principalement mise en évidence par les expériences d'inhibition de la formation et du mouvement des microclusters de signalisation par des toxines dépolymérisant l'actine comme la latrunculine-A ou la cytochalasine-D, aboutissant à un défaut d'activation des LT (Campi et al., 2005; Varma et al., 2006). De la même façon, les mouvements d'actine à la synapse permettent la formation des SMACs, nécessaires par exemple à l'exclusion de la phosphatase CD45, après la déphosphorylation permettant d'activer Lck (Freiberg et al., 2002). Là encore on voit que la régulation spatiale des acteurs de la signalisation est importante, car laisser une phosphatase au site d'action des kinases bloquerait le déclenchement des voies de signalisation.

Pour des raisons techniques, l'étude de la dynamique de la signalisation TCR est plus facile sur des surfaces stimulatrices, comme des lames recouvertes d'Ac anti-CD3 ou des bicouches lipidiques contenant ICAM-1 et des complexes CMHp. Avec ces outils, il a pu être observé que lorsque les LT contactent ces surfaces, les microclusters bougent très rapidement. Ainsi en quelques secondes des effecteurs comme Lck, ZAP-70, LAT et SLP-76, sont recrutés au TCR (Bunnell et al., 2002; Ehrlich et al., 2002). Les facteurs de remodelage du cytosquelette comme Vav1, WASp, Cdc42 et Rac, sont recrutés avec la même cinétique (Barda-Saad et al., 2005), ce qui permet une régulation locale du remodelage de l'actine au niveau des microclusters de signalisation. Le cytosquelette d'actine permet donc la mise en place rapide d'une plateforme de signalisation entre différents récepteurs et protéines.

Les signalosomes formés en aval des microclusters de TCR, contenant ZAP-70, SLP-76 et LAT, sont générés en périphérie de la synapse lieu d'initiation de la signalisation, puis migrent vers la partie centrale. Ces mouvements sont également régulés par un flux centripète d'actine, décrit dans la partie précédente pour former les SMACs et exclure l'actine-F du centre de la synapse. Le cytosquelette d'actine permet de créer ou de lever des contraintes physiques permettant le recrutement et les mouvements des microclusters. Là encore, il a été proposé que la myosine IIA contrôlait le mouvement de ces microclusters de signalisation, car

l'inhibition de ce moteur (par la blebbistatine ou des siRNA spécifiques de la chaîne lourde de la myosine) altère le mouvement des microclusters et l'activation des cellules T (Ilani et al., 2009). Cependant, une étude plus récente a montré que la myosine IIA régule l'intégrité et la stabilité de la synapse, alors que la polymérisation d'actine permettait le flux rétrograde d'actine et la migration des microclusters (Babich et al., 2012). Les auteurs montrent ici que l'inhibition du flux d'actine (par ajout de jaspakinolide), mais pas de la contraction dépendante de la myosine, inhibe le relargage du  $Ca^{2+}$  du RE et la phosphorylation de la PLC- $\gamma$ 1, mais pas l'activité de ZAP-70, suggérant que le mouvement des microclusters ne serait donc pas nécessaire aux premiers événements de signalisation.

### **3.3- Rôle des microtubules dans la dynamique des microclusters**

Les microtubules servent de rails pour le trafic vésiculaire permettant d'accumuler les molécules de TCR contenus dans les endosomes de recyclage à la synapse (Das et al., 2004) et d'amener différentes molécules de signalisation à la synapse, comme Lck (Anton et al., 2008; Ehrlich et al., 2002) et LAT (Bonello et al., 2004), participant ainsi à la signalisation par le TCR. Le complexe dynéine-dynactine, décrit précédemment, contrôle également l'agrégation des molécules de signalisation à la synapse (Martin-Cofreces et al., 2008) et la formation du cSMAC (Hashimoto-Tane et al., 2011). Alors que le cytosquelette d'actine contrôle la formation des microclusters de signalisation au pSMAC, les microtubules ne semblent pas impliqués dans cette phase précoce d'activation, mais plutôt dans le mouvement des microclusters à la synapse. En effet l'inhibition de l'expression de l'eitrine, qui interagit avec l'actine-F et Dlg1 liant les microtubules, perturbe l'organisation des microtubules à la synapse et la dynamique des microclusters de signalisation : les microclusters de SLP-76 sont normalement recrutés du cytosol à la périphérie de la synapse, mais ne migrent pas vers la zone centrale (**Figure 1.37**), (Lasserre et al., 2010). De façon surprenante l'altération de cette dynamique induit une augmentation de la signalisation en aval du TCR, tout comme le maintien mécanique du TCR en périphérie de la synapse (Mossman et al., 2005). Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'effet de la jasplakinolide sur l'activité de ZAP-70 décrit précédemment (Babich et al., 2012). Le cytosquelette de microtubules apparaît donc essentiel dans le transport et la localisation des microclusters à la synapse permettant de déclencher la signalisation, mais également de la réguler au niveau spatial et de l'éteindre.



## 3.4- Signalisation par les molécules de co-stimulation

### 3.4.1- Signalisation LFA-1

Comme nous l'avons vu précédemment, l'intégrine  $\beta 2$  LFA-1 est impliquée dans deux processus : l'arrêt des LT et la migration sur les surfaces exprimant le ligand de LFA-1, ICAM-1 ; et l'établissement et le maintien du contact avec les CPA, entraînant la formation de la synapse immunologique. Nous avons vu dans la partie II de cette introduction, que la localisation de LFA-1 était également régulée dans le temps et dans l'espace. En effet, cette intégrine est agrégée dans des clusters mobiles à la membrane plasmique, dont les mouvements sont dépendants du cytosquelette d'actine, comme pour l'organisation des clusters à la synapse en général. L'interaction forte entre LFA-1 et ICAM-1 nécessite un changement de conformation de l'intégrine, aboutissant à une forme de haute affinité pour le ligand. Ce processus implique une signalisation dite « inside-out » de l'intégrine, qui une fois activée et liée à ICAM-1 va elle-même déclencher une voie de signalisation dite cette fois « outside-in ».

#### 3.4.1.1- Signalisation inside-out

La signalisation inside-out permettant d'activer LFA-1 peut provenir de la stimulation des récepteurs aux chimiokines, des sélectines ou du TCR. Dans un contexte de synapse nous nous intéresserons ici à la signalisation en aval du TCR. Les éléments clés de cette signalisation sont la protéine Rap1 et son facteur GEF, la taline, la kindline-3, RapL, MST1 (Mammalian STE20-like protein kinase A), SKAP55 (Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa), PLD1 et la kinase PIP5K1 $\gamma$ 87 (phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase type 1 $\gamma$ 87).

La protéine Rap1 est une GTPase et doit donc être activée par une GEF. Les deux candidats identifiés sont C3G (également appelé RAP-GEF1) et CALDAG-GEF1 (Ca<sup>2+</sup> and DAG-regulated GEF 1, aussi appelé RASGRP2). L'inhibition de l'expression de CALDAG-GEF1 par des siRNA dans des LT primaires humains réduit l'activité de Rap1 et empêche l'adhésion de LFA-1 à ICAM-1 (Ghandour et al., 2007). La seconde GEF, C3G, forme un complexe avec la protéine CRKL (CRK-like protein), et l'inhibition de l'expression de ces deux protéines par des siRNA réduit également l'adhésion à ICAM-1 après l'engagement du TCR (Bergmeier et al., 2007). La stimulation du TCR active la PLC $\gamma$ , induisant du Ca<sup>2+</sup> et du

DAG, impliqués dans le recrutement de CALDAG-GEF1 (Katagiri et al., 2004), qui permettrait ensuite l'activation de Rap1 par hydrolyse du GTP (**Figure 1.38**). L'une des étapes essentielle de l'activation des intégrines est l'apport de ces GEFs à la membrane et leur activation, et même si l'implication de WAVE2 et Arp2/3 a été évoquée, le mécanisme n'est toujours pas défini.

Rap1 est détecté au niveau de vésicules intracellulaires (Bivona et al., 2004; Mor et al., 2009), contenant les marqueurs des endosomes précoces (EEA1 et Rab5A) et des compartiments de recyclage (Rab11). Mais il n'est pour l'instant pas établi que Rap1 est délivré à la membrane via ces vésicules et y est recyclé, car certains auteurs ont montré que Rap1 était lié de façon constitutive à la membrane plasmique (Raab et al., 2010). Toutefois, le modèle de recyclage semble conforté par l'absence de Rap1 à la membrane dans des cellules exprimant une construction dominant-négative de Rab11 (Mor et al., 2009). De la même façon, la localisation de l'activation de Rap1 n'est toujours pas claire : Rap1 est-il déjà sous forme GTP lié dans les vésicules ou est-ce que la conversion du GDP en GTP se fait à la membrane ? Il semblerait que d'autres composants de la signalisation inside-out soient présents dans les vésicules contenant Rap1, comme RapL régulant le transport de LFA-1 au pSMAC, et la kinase MST1 interagissant avec RapL et induisant la phosphorylation de LFA-1 de façon directe ou indirecte (Hogg et al., 2011). Les mécanismes de transport de ces compartiments intracellulaires et les complexes impliqués ne sont toujours pas connus.

La taline joue également un rôle dans le signal inside-out. En effet, dans les LT au repos, la taline est cytosolique, liée en partie à Vav1. Après stimulation du TCR, la taline est ancrée à la membrane plasmique (liée à Vav1 ou pas ?) par une liaison directe au PI(4,5)P2. L'activation de ZAP-70 induit la phosphorylation de Vav1 qui se dissocie de la taline, et permet son association aux intégrines.

#### *3.4.1.2- Signalisation outside-in*

La signalisation outside-in correspond à la signalisation par les intégrines permettant la force d'adhésion et le stade final d'activation de l'intégrine. Tous les acteurs sont, à ce moment-là, recrutés à la membrane avec LFA-1. Dans les LT, les kinases Lck et ZAP-70 sont phosphorylées après liaison de LFA-1 à ICAM-1, induisant ainsi la cascade de signalisation (Evans et al., 2011). Dans les LT, les kinases Lck et ZAP-70 sont déjà associées à LFA-1,

contrairement aux kinases Src et Syk dans d'autres modèles cellulaires. La suite de la cascade de signalisation implique la taline, RapL et probablement la kindline-3 (**Figure 1.39**). ZAP-70 permet l'activation de la taline par le relargage de Vav1 comme décrit précédemment, la taline s'associe alors et maintient la conformation ouverte de la chaîne  $\beta 2$ . RapL s'associerait à la sous-unité  $\alpha$ , pour la maintenir également dans sa conformation ouverte. La signalisation outside-in recrute également le complexe SLP-76-ADAP au niveau des microclusters de LFA-1. Ce complexe est nécessaire à la stabilisation de LFA-1 sous forme affine (Baker et al., 2009).

### 3.4.2- Signalisation CD28

CD28 est le principal récepteur de co-stimulation des LT, interagissant avec les molécules CD80 et CD86 exprimées par les CPA. Il a été établi que l'absence de co-stimulation par CD28 induisait l'anergie des LT, après stimulation du TCR (Harding et al., 1992). Comme nous l'avons vu dans la partie II de cette introduction, CD28 est co-localisé à la synapse avec les microclusters de TCR lors de l'initiation du contact, puis les microclusters de CD28 migrent vers le cSMAC avec les TCRs. Mais contrairement aux microclusters de TCR qui sont internalisés au niveau du cSMAC, le CD28 reste au cSMAC, formant un anneau entre la zone centrale et le pSMAC. Les compartiments de CD28/PKC $\theta$  sont maintenus activement au cSMAC. En effet des expériences de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) avec CD28 et PKC $\theta$  ont montré que ces clusters réapparaissaient après le photobleaching, indiquant un enrichissement et un maintien dynamique de ces compartiments (Yokosuka et al., 2008). Cependant, les mécanismes et protéines régulant cette dynamique ne sont toujours pas connus.

CD28 joue un rôle important dans la polymérisation d'actine à la synapse car elle permet l'activation de Cdc42 (Salazar-Fontana et al., 2003) et de la cofiline (**Figure 1.40**). Dans les LT au repos, la cofiline est phosphorylée de façon constitutive et ainsi inactive. La stimulation des récepteurs de co-stimulation (CD2 ou CD28), mais pas du TCR seul, induit la déphosphorylation et l'activation de la cofiline (Eibert et al., 2004), par les phosphatases PP1 et PP2A (Ambach et al., 2000).

Dans les cellules pré-activées, comme les Jurkat, l'activation de la cofiline par déphosphorylation se fait spontanément, c'est-à-dire sans stimuli externes

(Samstag et al., 1994). L'activation de la cofiline induit sa translocation transitoire au cytosquelette d'actine, cette protéine fait donc le lien entre la signalisation des récepteurs de co-stimulation et le cytosquelette. Il est intéressant de noter que les inhibiteurs spécifiques de la PI3K bloquent la déphosphorylation de la cofiline et son association avec le cytosquelette d'actine, donnant ainsi un rôle de la cofiline dans les fonctions des PI3K, autre exemple de lien entre cascades de signalisation et cytosquelette (Samstag et al., 2003).

Les molécules interagissant avec CD28 et impliquées dans sa signalisation sont PI3K, Grb2, Gads, Itk, Vav, la phosphatase PP2 et PKC $\theta$ . La signalisation CD28 passe essentiellement par la voie PI3K et la voie PKC $\theta$ .

#### *3.4.2.1- La voie PKC $\theta$*

Nous avons vu dans la première partie que la PKC $\theta$  appartient au groupe des nouvelles PKC. Cette protéine, sous forme repliée inactive dans les LT repos, est recrutée à la synapse après co-stimulation du TCR et du CD28. C'est la stimulation de CD28 qui semble donner la signalisation nécessaire à la localisation de PKC $\theta$  à la synapse (Coudronniere et al., 2000; Villalba et al., 2002). Ce recrutement semble être contrôlé par Vav et Rac1, car leur inhibition bloque la translocation de la PKC $\theta$  à la synapse (Villalba et al., 2002). Mais le mécanisme n'est pour l'instant pas connu. Il passerait probablement par l'association directe ou indirecte de PKC $\theta$  avec une protéine de régulation du cytosquelette (Vav1 ou Rac1), car la translocation membranaire de PKC $\theta$  est également régulée par l'actine (Altman and Villalba, 2003). La liaison au DAG produit par la PLC- $\gamma$ 1, induit un changement de conformation de la PKC $\theta$ , qui libère et donc active son domaine catalytique. PKC $\theta$  peut également être recrutée et activée à la synapse par Lck (Bi et al., 2001).

PKC $\theta$  joue un rôle clé dans l'activation de facteurs de transcription. En effet, les souris PKC $\theta^{-/-}$  ne présentent pas de défaut de développement des LT, mais les LT matures présentent un défaut total de prolifération et de production d'IL-2, dû à l'absence d'activation des facteurs de transcription AP-1, NFAT et NF- $\kappa$ B (Sun et al., 2000). La PKC $\theta$  est proposée comme étant l'un des partenaires du complexe Carma1-Bcl10-Malt1 régulant l'activation de NF- $\kappa$ B (Thome, 2004).

Le complexe Par a été proposé comme l'un des partenaires de la PKC $\theta$  régulant la

polarisation du MTOC à la synapse mais les mécanismes ne sont, à ce jour, toujours pas connus. La protéine Par3 a seulement été décrite comme s'accumulant à la synapse en même temps que la PKC $\theta$  (Bertrand et al., 2010). Cependant, ce recrutement de la PKC $\theta$  n'est pas général, car il a été montré que cette protéine n'était pas recrutée à la synapse dans les LT régulateurs (Treg), (Zanin-Zhorov et al., 2010). Les auteurs ont montré que l'inhibition de PKC $\theta$  augmentait la fonction de suppression des Treg, suggérant ainsi un rôle crucial de cette protéine dans les Treg, distinct du rôle joué dans les LT effecteurs sur le cytosquelette : polarisation du MTOC et rupture de la symétrie régulant la mobilité des cellules et convertissant les synapses en kinapses (Sims et al., 2007), comme nous l'avons vu dans la partie II de cette introduction.

#### *3.4.2.1- La voie PI3K*

La stimulation du TCR entraîne l'activation des PI3K de classe IA majoritairement composées de p110 $\delta$  et p85 $\alpha$ , et l'inactivation des gènes codant pour ces différentes sous-unités entraînent de façon générale des défauts de production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , de différenciation Th2 et de mise en place d'un pool de LT mémoires (Fung-Leung, 2011). La PI3K-IA est recrutée à la synapse par LAT (Paz et al., 2001), TRIM (T cell receptor interaction molecule) (Bruyns et al., 1998), SLP-76 (Shim et al., 2004), mais également par la molécule de co-stimulation CD28 (Pages et al., 1994). Elle catalyse le phosphatidylinositol(4,5)diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate (PIP3) à la membrane cellulaire. Le PIP3 lie les domaines PH, son accumulation à la membrane permet ainsi de réguler l'ancrage membranaire et l'activation des protéines comportant ce domaine PH comme la PLC- $\gamma$  (Falasca et al., 1998; Rameh et al., 1998). Parmi les cibles de la PI3K-IA on trouve également Akt et Vav permettant ainsi sa phosphorylation par Lck (Han et al., 1998).

La phosphatase SHIP-1 semble réguler la voie PI3K, car son inhibition avec des shRNA dans des LT CD4<sup>+</sup> humains entraîne une augmentation de la phosphorylation d'Akt et de son substrat GSK3 $\beta$ , ainsi qu'une augmentation du niveau d'actine polymérisée, une perte des microvilli et une diminution de la phosphorylation des ERM (Harris et al., 2011). Les PI générés par la PI3K peuvent lier la pleckstrine-2 qui régule l'étalement des LT Jurkat et les protrusions membranaires dépendants du cytosquelette d'actine (Bach et al., 2007). La pleckstrine-2 est localisée à la synapse avec l'actine et les clusters d'intégrines par son

domaine PH. La régulation de la voie PI3K semble donc jouer un rôle sur les modifications du cytosquelette après stimulation du TCR.

## 4. Cytosquelette et sécrétion

---

Les LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> ont pour fonctions respectives de tuer les cellules infectées par des virus ou les cellules tumorales, et sécréter des cytokines permettant d'orchestrer la réponse immunitaire. Nous nous attacherons, dans cette partie, à décrire les voies de sécrétion des granules cytotoxiques et des cytokines. Dans les LT CD4<sup>+</sup>, les mécanismes de sécrétion des cytokines sont très mal connus, nous décrirons donc également les voies de sécrétion dans un autre type cellulaire, les macrophages.

### 4.1- Sécrétion des granules cytotoxiques

#### 4.1.1- Présentation

Les LT CD8<sup>+</sup> et les cellules NK identifient et tuent les cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales. Ces deux populations cellulaires utilisent une voie dépendante de la perforine et une voie dépendante des récepteurs de mort pour exercer leurs fonctions. La voie dépendante de la perforine consiste en une sécrétion de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes vers la cellule cible. Avant même la description et la caractérisation de la synapse immunologique, A. Kupfer a décrit que les granules cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> et des cellules NK étaient polarisés au niveau de la zone de contact entre LT et cellule cible avec le MTOC et l'appareil de Golgi (Kupfer and Dennert, 1984; Kupfer et al., 1985). Il a ensuite été proposé que la polarisation du MTOC permettait le recrutement des granules cytotoxiques à la synapse, dans une zone très restreinte au sein du cSMAC, qui a été appelée domaine sécrétoire (Stinchcombe et al., 2001b), (**Figure 1.41**). Cette zone permet de concentrer les granules et d'éviter la libération du contenu vésiculaire dans le milieu, diminuant ainsi l'effet « bystander ». L'anneau d'intégrine constituant le pSMAC est important pour le maintien d'un contact étroit entre les deux cellules et la concentration des granules. Les granules cytotoxiques sont amenés à la synapse le long des microtubules par la dynéine, se concentrent dans la zone sécrétoire et s'ancrent à la membrane plasmique dans cette région pauvre en actine polymérisée, pour finalement relarguer le contenu vésiculaire vers la cellule cible. La perforine forme des pores dans la membrane de la cellule cible permettant l'entrée des granzymes pro-apoptotiques dans le cytoplasme et

l'induction de l'apoptose de cette cellule cible.

#### 4.1.2- Mécanismes d'exocytose des granules cytolytiques

De nombreuses études ont porté sur la machinerie d'exocytose des granules et il a été montré que la protéine Rab27a était nécessaire à la phase finale de transport des granules à la synapse à savoir l'ancrage à la membrane plasmique. Ainsi les cellules NK et les LT CD8<sup>+</sup> déficients pour Rab27a présentent un défaut d'exocytose mais pas de polarisation des granules (Menasche et al., 2000; Stinchcombe et al., 2001a). La famille des protéines Rab est constituée d'une soixantaine de membres, impliqués dans le transport des vésicules et des membranes en recrutant divers effecteurs. Le rôle de Rab27a dans l'exocytose des granules a été mis en évidence chez l'homme et chez la souris, avec des cellules de patients déficients pour rab27a. L'absence ou la perte de fonction de cette protéine chez l'homme provoque le syndrome de Griscelli, une pathologie caractérisée par une immunodéficience sévère liée au défaut lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> et NK (Menasche et al., 2000). Les mêmes effets ont été observés chez les souris *ashen*, l'équivalent chez la souris du syndrome de Griscelli (Wilson et al., 2000). Le rôle de Rab7 et l'un de ses partenaires RIPL (Rab interacting lysosomal protein) dans le recrutement des granules au niveau du MTOC a également été proposé. RIPL recruterait la dynéine au niveau des lysosomes sécrétoires permettant leur mouvement vers le centrosome (Daniele et al., 2011).

Dans les LT cytotoxiques, Rab27a présent à la surface des granules, recrute par la suite différentes protéines : les protéines SLP1 et SLP2 (synaptotagmin-like proteins) qui s'associent elles-mêmes aux phospholipides de la membrane plasmique, et faciliteraient probablement l'ancrage des granules à la membrane plasmique au niveau du cSMAC (Holt et al., 2008; Menasche et al., 2008) ; la protéine Munc-13-4, un autre effecteur de Rab27a, qui est impliquée dans l'étape d'activation nécessaire à la fusion membranaire des granules cytotoxiques à la synapse (Feldmann et al., 2003), (**Figure 1.42**). Le rôle de cette protéine a été étudié dans des modèles humains et murins, avec des cellules de patients atteints de lymphohistiocytose haémophagocytaire familiale de type 3 (syndrome causé par l'absence d'expression de Munc-13-4) ou avec des cellules de souris *jinx* (de Saint Basile et al., 2010). Dans ces cellules, les granules se polarisent à la synapse, s'ancrent à la membrane mais ne fusionnent pas avec la membrane plasmique, un processus normalement contrôlé par les protéines SNARE.



La famille des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor accessory protein receptors) comportent une quarantaine de membres. Elles permettent la fusion des membranes par l'interaction entre une t-SNARE (target-membrane-SNARE) et une v-SNARE (vesicle-associated-SNARE) présente à la membrane cible ou vésiculaire respectivement. L'interaction entre ces SNARE rapproche les deux membranes et régule leur fusion. Dans les cellules cytotoxiques, la t-SNARE syntaxine-11 est exprimée à la membrane plasmique. Les cellules déficientes pour la syntaxine-11 polarisent normalement leurs granules à la synapse, mais l'étape de relargage du contenu vésiculaire est partiellement bloquée. La perte d'expression de cette protéine est responsable de la lymphohistiocytose haemophagocytaire familiale de type 4 (zur Stadt et al., 2005). La syntaxine-11 s'associe avec l'effecteur Munc-18-2 pour permettre la fusion des granules à la synapse, mais la v-SNARE exprimée sur les granules et interagissant avec la syntaxine-11 n'est toujours pas identifiée. Les SNARE VAMP7 et VAMP8 sont des candidats potentiels (**Figure 1.42**).

Après fusion des membranes et relargage du contenu vésiculaire, une partie des composants des granules est probablement recyclé, mais les mécanismes impliqués dans ce recyclage ne sont à ce jour pas établis.

### **4.1.3- Sécrétion des granules et cytosquelette**

#### *4.1.3.1- Microtubules et polarisation du MTOC*

Comme nous l'avons décrit précédemment la polarisation du MTOC est induite par la stimulation du TCR et la signalisation en aval, faisant intervenir Lck, ZAP-70, DAG, ADAP, la dynéine, l'eitrine, Dlg1, Dia1... Certaines de ces protéines permettent l'ancrage des microtubules au cortex d'actine, nécessaire au maintien d'une tension des microtubules et vraisemblablement à la polarisation du MTOC. Ce recrutement du MTOC à la synapse a initialement été décrit comme nécessaire à la polarisation des granules et à la sécrétion de leur contenu (Stinchcombe et al., 2006), principalement parce que les deux processus semblaient indissociables et que la polarisation du MTOC apparaissait précéder celle des granules. De plus, certaines protéines ont été impliquées dans les deux phénomènes. Entre autre, l'inhibition de la kinase Lck ne bloque pas le recrutement du MTOC à la synapse mais son ancrage à la membrane plasmique ainsi que la sécrétion des granules lytiques (Tsun et al., 2011). Mais si la polarisation du MTOC semble contrôler celle des granules, ces deux

processus ne passent pas par les mêmes mécanismes : la polarisation du MTOC serait dépendante du DAG et indépendante du signal calcique, alors que la polarisation des granules nécessite la signalisation  $Ca^{2+}$  (de Saint Basile et al., 2010; Quann et al., 2009). Les deux processus ne sont donc pas liés au niveau de la signalisation. De plus, de récentes études semblent contredire le modèle qui établit un lien causal entre polarisation du MTOC et polarisation des granules. En effet, il a récemment été montré que dans de nombreux conjugués LT  $CD8^+$ -cellule cible, la sécrétion des granules précédait la polarisation du centrosome, et que bloquer la polarisation du MTOC à la synapse n'inhibait ni le relargage du contenu vésiculaire, ni l'efficacité de « killing » des LT cytotoxiques (Bertrand et al., 2013). De plus, il a été montré que les LT  $CD8^+$  pouvaient tuer plusieurs cellules cibles simultanément, sans établir de synapses stables. Les LT peuvent donc polariser leurs granules vers différentes cellules cibles en même temps, dissociant donc la polarisation du MTOC et celle des granules (Wiedemann et al., 2006). Cependant il semble que les granules polarisées au niveau du MTOC soient plus nombreuses que ceux polarisés ailleurs. Ainsi le rôle de la polarisation du MTOC dans le recrutement des granules cytotoxiques à la synapse n'est pas encore clairement établi. En revanche, les microtubules permettraient d'amener les granules à la synapse. Les granules se concentreraient tout d'abord au niveau du MTOC, transport régulé par la dynéine (Mentlik et al., 2010), puis rejoindraient la zone synaptique, cette fois grâce à la kinésine-1 (Kurowska et al., 2012).

#### *4.1.3.2- Rôle de l'actine*

Contrairement au rôle du MTOC dans la polarisation et la sécrétion des granules à la synapse, le rôle de l'actine a été peu étudié. Les premières observations de la formation de l'anneau d'actine polymérisée au niveau du pSMAC ont suffi à établir que ce processus était une marque de formation de la synapse, mais le mécanisme d'exclusion de l'actine polymérisée du centre de la synapse n'est toujours pas connu. L'hypothèse basée sur l'existence d'un flux centripète d'actine dans la zone de contact qui induirait l'exclusion d'actine du centre est admise par à peu près tout le monde. G. Griffiths a proposé que ce flux d'actine exerce également une traction sur les microtubules ancrés dans la zone périphérique de contact, induisant la polarisation du MTOC à la synapse.

Certaines protéines de régulation de la dynamique de l'actine comme WASp (Orange et al., 2002), Arp2/3 ou hDia1 (Butler and Cooper, 2009), ont été impliquées dans le contrôle

de la localisation des granules cytotoxiques des cellules NK à la synapse. Il est ainsi admis que les granules cytotoxiques sont recrutées dans la zone sécrétoire du cSMAC pauvre en actine polymérisée, empêchant ainsi que l'actine ne crée une barrière physique bloquant le relargage du contenu vésiculaire. Le réseau lâche d'actine polymérisée subsistant au niveau du cSMAC semble toutefois important pour l'ancrage des vésicules à la membrane, comme cela a été révélé par des expériences de microscopie à haute résolution (Brown et al., 2011; Rak et al., 2011).

## **4.2.- Sécrétion des cytokines**

Les cytokines jouent un rôle majeur dans l'orchestration de la réponse immunitaire. De nombreuses études ont décrit les voies de signalisation induites par les cytokines après liaison à leurs récepteurs ou les mécanismes régulant leur production, mais peu d'informations sont, à ce jour, disponibles sur le contrôle du relargage des cytokines. De plus, il apparaît que la sécrétion des cytokines est un processus complexe et finement régulé, faisant intervenir des voies intracellulaires, généralement spécifiques pour une cytokine et un type cellulaire donnés. Nous commencerons par décrire brièvement le trafic intracellulaire des cytokines, puis nous nous intéresserons à leur sécrétion dans les macrophages et les LT CD4<sup>+</sup>.

### **4.2.1- Voie classique de sécrétion**

Comme toutes les protéines néo-synthétisées, la plupart des cytokines utilisent la machinerie de trafic intracellulaire pour organiser leur transport à travers la cellule vers la membrane plasmique. Les protéines sont assemblées dans le RE, transportées dans des vésicules au Golgi où elles subissent des modifications post-traductionnelles, puis dans le TGN (Trans-Golgi network), et sont chargées dans des vésicules ou des transporteurs permettant leur transport final à la membrane cellulaire (sécrétion constitutive), aux organelles, dans les granules sécrétoires ou des endosomes de stockage (sécrétion régulée), (**Figure 1.43**).

Cette machinerie est régulée par un certain nombre de protéines présentes dans les différents compartiments, permettant leurs mouvements ou leur fusion à chaque étape du transport. Ces protéines sont réparties de façon irrégulière dans les différents compartiments,

qui peuvent ainsi être définis par un enrichissement de ces protéines. Les grandes familles de protéines régulant le trafic sont les petites GTPases de la famille ARF/Sar (ADP ribosylation factor), les petites GTPases de la famille Rab et les protéines SNARE (Lacy and Stow, 2011).

Les protéines de la famille ARF/Sar et leurs protéines accessoires jouent un rôle dans le transport bi-directionnel entre le RE et le Golgi. Elles permettent de trier et de charger les protéines dans des vésicules. Dans le TGN, les protéines ARF isolent les protéines dans des vésicules recouvertes de clathrine pour le transport vers les endosomes tardifs, mais pour les protéines de sécrétion comme les cytokines, le chargement se fait généralement dans des transporteurs tubulo-vésiculaires non recouverts de clathrine, pour un transport vers les endosomes ou directement à la surface cellulaire. Les moteurs de l'actine et des microtubules participent également aux mouvements des transporteurs et vésicules dans la cellule. La formation, l'ancrage et la fusion des vésicules sont régulés par les protéines Rab et SNARE. Les protéines Rab s'associent aux membranes vésiculaires et recrutent de nombreux effecteurs pour former les vésicules et les ancrer aux membranes. Rab5, 7 et 11 s'associent aux endosomes précoces, tardifs et de recyclage, respectivement. Rab6 et 10 sont associées au Golgi et au TGN. Les protéines SNARE, elles, contrôlent directement la fusion des vésicules. Ce sont les protéines de trafic les plus étudiées dans la sécrétion des cytokines, et incluent les sous-familles VAMP et syntaxine. Elles sont associées soit à la vésicule (v-SNARE, vesicles-associated), soit à la membrane cible (t-SNARE, target-membrane). La fusion des vésicules est un processus qui intervient à chaque étape du transport intracellulaire, ainsi que pour le relargage des cytokines par la fusion des granules, vésicules ou endosomes avec la membrane plasmique. De nombreuses molécules de la machinerie de trafic intracellulaire sont régulées par l'activation des cellules : soit par leur recrutement aux membranes, soit par la régulation de leur expression et de leur activité.

#### **4.2.2- Sécrétion des cytokines dans les macrophages**

Les macrophages sécrètent des cytokines permettant de réguler la progression de la réponse inflammatoire. L'équipe de J. Stow a décrit différentes voies de sécrétion et d'exocytose des cytokines après activation des macrophages avec du LPS. Le TNF- $\alpha$  néo-synthétisé est rapidement accumulé dans le Golgi, puis transporté dans les endosomes de recyclage, avant d'être transporté vers la membrane plasmique, pour y être sécrété au niveau des coupes phagocytiques (Murray et al., 2005). L'IL-6 suit un trafic similaire : la cytokine

est chargée sur des structures émergent du trans-Golgi, qui fusionnent avec les endosomes de recyclage, mais contrairement au TNF- $\alpha$ , l'IL-6 n'est pas sécrété au niveau des coupes phagocytiques.

La synaptotagmine XI appartient au large groupe de protéines membranes contrôlant l'ancrage et la fusion des vésicules en régulant l'action des SNARE. Cette protéine s'associe aux endosomes de recyclage et son expression régule négativement la sécrétion des deux cytokines et la phagocytose. Ainsi l'inhibition d'expression de cette protéine avec des siRNA dans les macrophages, entraîne une augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (Arango Duque et al., 2013). Les auteurs proposent que cette synaptotagmine bloque l'interaction entre les t- et v-SNARE, modulant ainsi la sécrétion.

La sécrétion du TNF- $\alpha$  a été étudiée en détail par le groupe de J. Stow. Ainsi, ce groupe a montré que l'activité PI-3 kinase de p110 $\delta$  contrôlait la fission de structures émanant du TGN et contenant le TNF- $\alpha$  (Low et al., 2010). Plus récemment, le même groupe a montré que les deux isoformes de Rab6A, Rab6a/a' sont impliquées dans le transport post-Golgi du TNF- $\alpha$  dans les macrophages inflammatoires (Micaroni et al., 2013). Ces résultats indiquent que la dernière étape d'exocytose est strictement régulée et peut diverger selon les facteurs sécrétés, même s'ils ont emprunté les mêmes voies de trafic intracellulaire. De la même façon, il a été décrit que l'IL-10 pouvait être sécrétée suivant deux voies différentes après la sortie du Golgi : une passant par les endosomes de recyclage et une passant par des vésicules distinctes amenant la cytokine à la surface cellulaire (Stanley et al., 2012).

#### 4.2.3- Sécrétion des cytokines dans les LT CD4<sup>+</sup>

La fonction majeure des LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires est de sécréter des cytokines permettant d'orchestrer la réponse immunitaire en recrutant et activant d'autres cellules. De la même façon que pour la description des granules cytotoxiques à la synapse, l'équipe d'A. Kupfer a montré que dans les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires, certaines cytokines comme l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2, étaient polarisées à la synapse entre LT CD4<sup>+</sup> et CPA, localisées au niveau de l'appareil de Golgi (Kupfer et al., 1991), (**Figure 1.44**). Cette polarisation a également été mise en évidence pour l'IL-2 *in vivo* sur des coupes de ganglions (Reichert et al., 2001). Quelques années plus tard, le groupe de M. Davis a proposé un modèle dans lequel les cytokines, une fois produites, seraient sécrétées en suivant deux voies d'exocytose différentes : l'une polarisée vers la CPA

pour des cytokines comme l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  (modèle Th1) ou l'IL-10 (modèle Th2) ; et une autre voie multidirectionnelle pour des chimiokines comme MIP1- $\alpha$  ou RANTES ou des cytokines comme le TNF- $\alpha$  (modèle Th1) ou l'IL-4 (modèle Th2), (Huse et al., 2006). Ce modèle est basé sur l'idée que certaines cytokines doivent être sécrétées uniquement vers la CPA présentant le peptide agoniste, sans affecter les cellules avoisinantes, alors que d'autres facteurs solubles comme les chimiokines, en étant sécrétées de façon multidirectionnelle, vont permettre le recrutement de nombreuses cellules et ainsi stimuler localement une réponse inflammatoire.

Cette idée que les cytokines sécrétées à la synapse donneraient un signal uniquement à la cellule en contact avec le LT a été remise en question par des expériences réalisées *in vivo*. Dans une première étude, les auteurs ont analysés la réponse aux cytokines dans les cellules cibles. Ainsi l'analyse de la phosphorylation des protéines STAT a permis de montrer que la majorité des cellules des ganglions drainants recevaient le signal de l'IL-4 ou de l'IFN- $\gamma$  (dans différents types d'infection des souris), suggérant que les cytokines étaient dispersées dans le ganglion et non pas restreintes à un contact direct entre cellules (Perona-Wright et al., 2010). Ces analyses ont été réalisées *ex vivo* et ne rendent donc pas compte de la dynamique des cellules au sein du ganglion. Puis des expériences d'imagerie bi-photonique ont permis de montrer *in vivo* cette fois que les cellules T CD4<sup>+</sup> qui ne formaient pas de contact mais étaient proches de conjugués, recevaient également le signal IFN- $\gamma$ , suggérant que la sécrétion de la cytokine n'était pas restreinte à la seule zone synaptique ou qu'il y avait diffusion hors de la zone d'interaction entre les deux cellules (Muller et al., 2012). Force est donc de constater que la « directionnalité » et la régulation de la sécrétion des différentes cytokines restent mal connues.

Les mécanismes moléculaires régulant la sécrétion des cytokines dans les LT CD4<sup>+</sup> sont eux aussi encore très largement inconnus. Il a été proposé que Rab3d et Rab19 co-localisaient avec l'IL-2 à la synapse, tandis que la protéine SNARE Syntaxine-6 était associée aux vésicules contenant le TNF- $\alpha$  (Huse et al., 2006). Mais depuis, aucun résultat publié n'a confirmé cette étude. En dehors de ces protéines de régulation du trafic, la protéine WASp semble également impliquée dans la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ , qui est bloquée dans les LT de souris WASp<sup>-/-</sup> (Morales-Tirado et al., 2004). Tout comme dans les LT CD8<sup>+</sup>, la polarisation du MTOC est vue comme induisant la polarisation de l'appareil de Golgi et de la machinerie sécrétoire, et donc impliquée dans la sécrétion des cytokines par les LT CD4<sup>+</sup>. L'équipe de S.

Valitutti a ainsi montré que la protéine PKC $\zeta$  contrôlait la polarisation du MTOC et la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  et du CD40L à la synapse (Bertrand et al., 2010). Mais nous verrons dans la suite de ce manuscrit que nos données ne vont pas dans ce sens.

Une étude plus récente a montré que la sortiline, un récepteur transmembranaire présent dans le Golgi et les endosomes précoces, était impliquée dans le transport des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  du TGN aux endosomes précoces (Herda et al., 2012). Les souris déficientes pour ce récepteur présentent une augmentation de la cytotoxicité des CTL et des cellules NK, liée, selon les auteurs, à une augmentation de l'expression de VAMP7. Mais l'absence de la sortiline entraîne une forte diminution de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les CTL, les Th1 et les cellules NK, alors que la sécrétion de TNF- $\alpha$  n'est pas affectée (Herda et al., 2012). L'absence de la sortiline altère le relargage des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  du TGN. La transferrine, la sortiline et l'IFN- $\gamma$  sont amenées vers les mêmes endosomes précoces, mais suivent ensuite d'autres routes, avec l'IFN- $\gamma$  qui ne passe pas par les endosomes de recyclage dans les CTLs. Les auteurs pointent ici à nouveau une différence dans les voies de sécrétion de différentes cytokines comme l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Nos résultats non publiés, suggèrent également que dans les LT CD4<sup>+</sup>, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2 transitent dans des compartiments de recyclage. En effet, ces deux cytokines sont mises en évidence dans des compartiments transferrine positifs en microscopie électronique, de plus leur sécrétion est inhibée par l'inactivation de ces compartiments.

## 5. Objectifs de la thèse

---

Nous avons vu que les LT scannent les CPA à la recherche des complexes CMH-peptides agonistes. La reconnaissance de ces complexes par le TCR permet la mise en place d'une synapse immunologique à l'interface entre les deux cellules. Cette synapse est le résultat des premiers événements de signalisation en aval du TCR et fait intervenir des mouvements du cytosquelette des LT : le MTOC est recruté et se polarise en face de la CPA, amenant les microtubules sous la membrane plasmique permettant le transport des microclusters de signalisation ; et l'actine se polymérise activement dans la zone de contact et est exclue du centre de la synapse par des mouvements centripètes de flux. Cette dynamique permet les mouvements des récepteurs à la surface des LT et l'organisation de la synapse.

L'interaction entre LT et CPA ainsi que la mise en place de la synapse, qui ont initialement été décrites comme des événements relativement stables et maintenus pendant plusieurs heures pour permettre l'activation du LT, sont aujourd'hui analysés d'un point de vue beaucoup plus dynamique. Cette dynamique est prise en compte à différents niveaux : au niveau cellulaire, la dynamique des contacts entre les deux cellules, et l'importance des contacts successifs très courts dans l'activation des LT ; et au niveau moléculaire, la dynamique des mouvements des microclusters à la synapse dans la signalisation et l'établissement d'un contact productif aboutissant aux réponses cellulaires T.

Les différents mécanismes aboutissant à la réorganisation du cytosquelette des LT lors de la mise en place de la synapse ont été extensivement étudiés mais le rôle de ce remodelage du cytosquelette d'actine et de microtubules dans les fonctions des LT CD4<sup>+</sup> était encore largement inconnu. Les travaux effectués au cours de ma thèse avaient donc pour objectif dans un premier temps, d'analyser le rôle de la réorganisation du cytosquelette dans une des fonctions majeures des LT CD4<sup>+</sup>, la sécrétion de cytokines. Pour cela, nous avons étudié le rôle de la petite RhoGTPases Cdc42 dans la réorganisation du cytosquelette et la sécrétion des cytokines par les LT CD4<sup>+</sup> primaires humains, en utilisant une approche d'inhibition de l'expression de cette protéine par des shRNA contenus dans des vecteurs lentiviraux. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'un des partenaires de Cdc42, la protéine IQGAP1, pour tenter d'approfondir le mécanisme mis en évidence dans la première étude, et comprendre le lien que crée le cytosquelette entre signalisation en aval du TCR et dynamique d'interaction LT-CPA.



# ***MATERIELS ET METHODES***

---

# MATERIELS ET METHODES

---

## 1- Cellules

Dans cette étude, nous utilisons les lignées cellulaires T Jurkat J77 cl20, et B Raji, maintenues en culture dans un milieu RPMI 1640/GlutaMax, 100 µg/mL streptomycine, 100 U/mL pénicilline, et 10% SVF (Biowest). Cette lignée a été transfectée stablement avec une construction centrin-1-GFP, donnée par M.Bornens (Institut Curie, Paris). Des cellules primaires humaines sont également isolées à partir de sang de donneurs sains : des monocytes (cellules CD14<sup>+</sup> isolées positivement à partir des PBMCs) et dérivées en cellules dendritiques en présence d'IL-4 et de GM-CSF recombinants humains (BruCells) pendant cinq jours, et des cellules T CD4<sup>+</sup> isolées négativement à partir des PBMCs en utilisant les kits de purification Miltenyi Biotec. Les cellules primaires sont maintenues en culture en milieu RPMI 1640/GlutaMax, 50 µM 2-β-mercaptoethanol, 10 mM HEPES, 100 µg/mL streptomycine, 100 U/mL pénicilline, et 10% SVF (Biowest).

## 2- Traitement des cellules T avec différentes drogues

### 2.1- Colchicine

Les cellules T CD4<sup>+</sup> purifiées sont traitées avec 50 µg/mL de colchicine (Sigma-Aldrich) pendant 5min à 37°C, lavées trois fois et laissées 1h à 37°C en milieu complet pour retirer l'excès de colchicine, puis lavées encore avant utilisation.

### 2.2- Inhibiteur des PKC atypiques

Les cellules T sont pré-traitées pendant 1h à 37°C avec 12,5 µM d'inhibiteur des PKC atypiques (pseudo-substrat PKC-ζ myristoylé, Invitrogen), puis l'inhibiteur est ajouté dans les co-cultures LT-DC ou LT-billes anti-CD3+anti-CD28 (Dynal/Invitrogen).

### 2.3- Latrunculine-B

Les cellules T transduites avec les shRNA sont activées avec les billes pendant 3h, puis la latrunculine B (Calbiochem) est ajoutée à 50nM pendant les trois dernières heures d'activation.

### **3- Préparation des vecteurs codant l'IFN- $\gamma$ -GFP**

Le cDNA IFN- $\gamma$  humain a été amplifié par PCR en utilisant les oligonucléotides suivants : Sens : 5'-AAAAAGCAGGCTTCACCATGAAATATACAAGTTATATC-3'

Antisens : 5'-AGAAAGCTGGGTGTTACTGGGATGCTCTTCGACC-3'

Le cDNA est ensuite introduit dans un plasmide pE-GFP-N1 (Clontech Laboratories), puis amplifié par PCR à partir du plasmide avec les oligonucléotides suivants :

Sens: 5'-AAAAAGCAGGCTTCACCATGAAATATACAAGTTATATC-3'(IFN- $\gamma$ )

Antisens: 5'-AGAAAGCTGGGTGTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3' (GFP)

Le produit PCR est ensuite cloné dans un plasmide lentiviral pWXLN en utilisant la technologie Gateway (Invitrogen).

### **4- Production des lentivirus**

Les particules lentivirales sans capacité répliquative pseudotypées avec la protéine d'enveloppe G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV G) sont produites dans des cellules HEK 293T co-transfectées avec un mixte de trois plasmides : psPAX2, pMD2.G (plasmides Addgene 12260 et 12259, respectivement) et soit le plasmide pWXLN IFN- $\gamma$ -GFP, soit pLKO.1-puro contenant le shRNA Cdc42 (MISSION™ shRNA TRCN0000047628=shCdc42-1, TRCN0000047630=shCdc42-3, Sigma), soit pLKO.1-puro contenant le shRNA IQGAP1 (MISSION™ shRNA TRCN0000047628=shIQGAP1-1, TRCN0000047630=shIQGAP1-5, Sigma) ou un shRNA contrôle (MISSION™ shRNA SHC002=shCtl, Sigma). Les surnageants sont collectés 48h après et concentrés 40X par ultracentrifugation (120.000 x g pendant 90min à 4°C).

### **5- Infection des cellules T humaines**

#### **5.1- Cellules T Jurkat**

Les cellules Jurkat sont infectées avec le lentivirus codant le shRNA et le gène de résistance à la puromycine pendant 24h. Les cellules sont lavées 3 fois et reprises en milieu frais contenant de la puromycine (Sigma) à 2  $\mu$ g/mL. Les cellules sont utilisées 72h après traitement.

## 5.2- Cellules T primaires

Les cellules T CD4<sup>+</sup> primaires isolées à partir des PBMCs sont activées sur plaques 96 puits préalablement recouverts d'Ac anti-CD3 (eBioscience, clone OKT3, à 2,5 µg/mL, incubation sur la nuit à 4°C), avec de l'Ac anti-CD28 soluble (BioLegend, clone CD28.2, à 2,5 µg/mL), et de l'IL-2 humain recombinant (20 U/mL). Après 24h d'activation, les cellules sont infectées avec le lentivirus codant le shRNA et la résistance à la puromycine, en présence de polybrène B (Sigma, à 10 µg/mL). 24h après, les cellules sont lavées trois fois et reprises dans du milieu frais avec de l'IL-2 et de la puromycine (à 2,5 µg/mL). Après 72h de traitement puromycine, les cellules transduites sont récupérées et centrifugées sur ficoll (800g/15min) pour éliminer les cellules mortes.

## 6- RT-PCR quantitative

L'ARN total des cellules T ou des co-cultures 6h LT-billes, LT-DC, est isolé en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen) et transcrit en cDNA (Invitrogen Life Technologies). L'expression de l'IFN- $\gamma$ , Cdc42 et IQGAP1 est analysée par PCR quantitative avec un test d'expression génique TaqMan (Applied Biosystems; détails du protocole de PCR sur [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com), numéro catalogue: HS-99999909 pour HPRT1 et HS-00989291-M1 pour IFN- $\gamma$ ) et un ABsolute QPCR ROX MIX de Abgene. Le niveau d'expression d'un gène dans un échantillon donné est représenté comme une augmentation (méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ).

## 7- Mesure de l'efficacité des shRNA par Western-Blot

Cdc42 et IQGAP1 sont détectés par immunoblot sur des lysats de cellules infectées avec les lentivirus (100.000 cellules/conditions) en utilisant des Ac anti-Cdc42 et anti-IQGAP1 (clone 44/CDC42 et clone 24/IQGAP1 respectivement, BD Transduction Laboratories), un Ac anti-Tubuline- $\alpha$  (clone DM1A, Calbiochem) ou anti-GP96 (clone 9G10, Enzo Life Sciences) comme contrôles de charge. Les Ac secondaires anti-espèce couplés HRP sont de Jackson ImmunoResearch Laboratories. Les complexes Ac/Ag sont visualisés par un test ECL (Amersham Pharmacia Biotech). L'intensité du signal de chaque bande est quantifiée avec le logiciel QuantityOne, et normalisée par rapport à l'intensité du contrôle de charge.

## **8- Activation des LT**

### **8.1- Activation des LT avec des Ac**

Les cellules T Jurkat exprimant le shRNA contrôle ou les deux shRNA spécifiques d'IQGAP1 sont incubées 15min à 37°C, puis 1min avec l'Ac anti-CD3 (clone OKT3, eBiosciences à 125ng/mL), puis le fragment Fab'2 anti-Ig de souris est ajouté (6µg/mL) dans tous les tubes sauf pour le point 0 (10<sup>6</sup> cellules par point). La cinétique 3/10/30min est réalisée à rebours, et arrêtée par addition de PBS froid. Les échantillons sont centrifugés et les cellules sont lysées dans un tampon RIPA contenant des anti-protéases et anti-phosphatases comme décrit précédemment pour le Western-Blot. IQGAP1 est détecté avec l'Ac anti-IQGAP1 et on utilise les Ac anti-Tubuline- $\alpha$  ou anti-GP96 comme contrôles de charge. La détection des protéines totales et des phospho-protéines est faite avec différent Ac (Cell Signaling).

### **8.2- Activation des LT avec des CPA**

Les mêmes cellules Jurkat sont également incubées 15min à 37°C avec des LB Raji (2 LT pour 1 LB). Le sAg SEE à 100ng/mL est ajouté à différents temps. La cinétique 3/10/30min est effectuée à rebours. Puis les cellules sont lysées comme précédemment.

## **9- Détection des cytokines**

La production des cytokines est mesurée dans les surnageants de co-cultures par ELISA (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN) ou par CBA (CBA, Becton Dickinson).

## **10- Analyse de l'expression des cytokines par cytométrie de flux**

Les co-cultures LT/DC et LT/billes anti-CD3+anti-CD28 sont réalisées en présence de Brefeldine A (Sigma-Aldrich, à 4 µg/mL) ajoutée pendant les deux dernières heures d'incubation. Les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD4 seuls (co-cultures LT/billes) ou anti-CD4 et anti-CD1a (co-cultures LT/DC, BD Biosciences), puis fixées avec 3% paraformaldéhyde, perméabilisées avec le tampon Perm/Wash de Becton Dickinson avant le marquage avec l'Ac anti-IFN- $\gamma$  (clone 45.15, IoTest). Les cellules marquées sont analysées au FACS Calibur (BD Biosciences) et l'expression de l'IFN- $\gamma$  est mesurée dans les cellules

CD4<sup>+</sup> (LT/billes) ou CD4<sup>+</sup>/CD1a<sup>-</sup> (LT/DC). Les données sont ensuite analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

## **11- Xcelligence**

On utilise des plaques 16 puits (taille identique aux plaques 96 puits) Xcelligence. Les puits sont recouverts de poly-L-lysine 0.02% pendant 30min RT, puis d'Ac anti-CD3/anti-CD28 à 10µg/mL sur la nuit à 4°C. 50µL de RPMI sont ajoutés par puits, pendant 15min à 37°C. Puis le niveau basal est mesuré dans chaque puits pendant 1min. Les cellules sont ensuite ajoutées dans les puits (50.000/puits) et l'analyse est lancée pendant 2h avec une mesure toutes les 10sec. Le profil des courbes d'impédance et le « cell index » sont analysés avec le logiciel RTCA Software (Roche).

## **12- Microscopie**

### **12.1- Formation des conjugués**

Les cellules T CD4<sup>+</sup> primaires sont cultivées avec des billes anti-CD3+anti-CD28 (1 LT pour 1 bille) ou avec des DCs autologues (2 LT pour 1 DC) chargées avec un mixte de trois superantigènes (SEE, SEB, TSST1, à 100ng/mL, Toxin Technology) pendant 6h sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine 0.02% (Sigma-Aldrich). Les cellules sont fixées avec 3% paraformaldéhyde et incubées en PBS-Glycine (10 mM). Les cellules sont ensuite perméabilisées avec 0.05% saponine, marquées avec des Ac anti-IFN-γ-biotinylé (clone B27, SouthernBiotech), anti-α-Tubuline (clone YL1/2, AbCys), et la phalloïdine couplée alexa fluor 546 ou 647 (Molecular Probes), puis avec les Ig anti-espèce appropriés ou la Streptavidine couplés à des fluorochromes (Jackson Immunoresearch et Molecular Probes). Les lamelles sont ensuite montées sur des lames de verre avec du Fluoromount-G (SouthernBiotech).

Les cellules B Raji sont chargées avec le mixte de trois sAg, marquées avec un CellTracker bleu (50µM, Invitrogen) pendant 30min à 37°C, lavées et incubées avec les cellules T primaires ou Jurkat pendant 1h ou 6h. Les lamelles sont traitées comme décrit précédemment.

## **12.2- Test d'étalement**

Les lamelles sont recouvertes de poly-L-lysine 0.02% 30min RT, puis avec 10µg/mL d'Ac anti-CD3/anti-CD28 et/ou de l'ICAM-1-Fc recombinant humain (R&D) sur la nuit à 4°C. Les cellules sont ensuite déposées sur lamelles en RPMI sans sérum pendant 10min à 37°C, puis marquées de la même façon que les conjugués.

## **12.3- Analyse des lames**

Les images sont acquises avec un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse 90i) équipé pour la déconvolution des images, avec un objectif 100X à immersion. Une série de plans est prise pour chaque image, avec une distance de 0.2 µm entre chaque.

Les séries de plans pour chaque image sont déconvoluées automatiquement en utilisant un algorithme dérivé de Gold-Meinl développé par la plateforme PICT-IBiSA de l'Institut Curie (Sibarita, 2005). Les images sont ensuite analysées avec le logiciel ImageJ.

La position des centrioles est calculée en générant un profil d'intensité de fluorescence partant de la synapse vers l'extrémité de la cellule T. Pour les mesures d'étalement des cellules sur les différents substrats (poly-L-lysine, anti-CD3/anti-CD28), on applique un seuil de détection automatique mettant en évidence les contours des cellules. L'aire des cellules est ensuite mesurée avec la fonction « Analyse de particules » d'ImageJ. La quantification des vésicules IFN-γ à la synapse est réalisée sur des images 8-bits sur lesquelles on applique un seuil de détection automatique mettant en évidence des spots, qui sont ensuite comptés (uniquement les spots supérieurs à 4pixels) avec la fonction « Analyse de particules » d'ImageJ. Au sein d'une même expérience, on applique un seuil de détection automatique pour toutes les images pour sh-Ctl et sh-Cdc42. Ces valeurs sont notées, puis on retient la valeur médiane qui est ensuite appliquée à toutes les images au sein d'une même expérience. Pour la quantification de la dispersion des vésicules IFN-γ, les mêmes images sont utilisées pour déterminer les positions en x et en z du centre de masse de chaque spot, ces positions sont ensuite normalisées par rapport aux tailles en x et en z de la synapse. Nous avons ensuite généré un graphique avec toutes les images analysées (71 pour sh-Ctl et 64 pour sh-Cdc42), montrant la position relative et la taille (aire des bulles) de chaque vésicule à la synapse.

## **12.4- Préparation des lames pour la microscopie électronique à balayage**

Les lamelles sont recouvertes de poly-L-lysine 0.02% 30min RT, puis avec 10µg/mL d'Ac anti-CD3/anti-CD28 et/ou de l'ICAM-1-Fc recombinant humain (R&D) sur la nuit à 4°C. Les cellules sont ensuite déposées sur lamelles en RPMI sans sérum pendant 10min à

37°C, puis rincées en tampon PB (sans sel), fixées pendant 1h RT en tampon PB-2% Glutaraldéhyde, et rincées en PB. Les échantillons sont ensuite préparés et observés dans le service de M. Trichet (service de microscopie électronique, Institut de biologie intégrative, IFR 83, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI).

## **13- Vidéomicroscopie**

### **13.1- Spinning-disk**

Les images de fluorescence confocale réalisées au spinning-disk sont acquises sur un TI-E Nikon équipé d'un objectif 60X à immersion. Les cellules Jurkat exprimant l'IFN- $\gamma$ -GFP sont déposées sur une boîte 35mm (Fluorodish) recouverte d'anticorps anti-CD3, placées sous la chambre du vidéomicroscope à 37°C dans une atmosphère 5% CO<sub>2</sub>. L'acquisition est réalisée avec le logiciel Metamorph, sur plusieurs plans (0,3 $\mu$ m entre chaque), toutes les 5 secondes. Les films présentent le plan de contact entre la cellule et la lamelle.

### **13.2- Vidéomicroscope à épifluorescence**

L'analyse du mouvement des cellules T primaires sur des surfaces recouvertes d'Ac anti-CD3 ou d'ICAM-1 ou d'anti-CD3+ICAM-1, se fait sur un vidéomicroscope à épifluorescence Nikon Ti équipé d'une caméra CCD (Roper Scientific), avec un objectif 20X 1.40NA. Les cellules sont préalablement marquées avec un CellTracker bleu (50 $\mu$ M, Invitrogen) pendant 30min à 37°C, puis lavées. 60.000 cellules sont déposées par boîte. L'acquisition est faite avec le logiciel Metamorph, avec 6 plans espacés de 0.5 $\mu$ m en Transmission, et un plan au focus à chaque temps pour le CFP, toutes les 30sec pendant 30min, dans une atmosphère à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Les trajectoires, vitesse et mouvement des cellules sont ensuite analysés avec le logiciel Imaris (Bitplane Scientific Software).

## **14- Analyse statistique**

Nous avons utilisé un Student *t* test paire pour l'analyse de la production des cytokines dans les cellules T non traitées, traitées avec des drogues ou avec les lentivirus contenant le sh-Contrôle ou les deux sh-Cdc42 ; et un Student *t* test impaire pour les analyses de microscopie (exclusion de l'actine et dispersion des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  à la synapse). Dans tous les cas les analyses sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism.



## ***RESULTATS***

---

# 1. Cdc42 contrôle le remaniement de l'actine à la synapse nécessaire à la sécrétion des cytokines par les LT CD4<sup>+</sup> [article 1]

---

**Cytokine secretion by CD4<sup>+</sup> T cells at the immunological synapse requires Cdc42-dependent local actin remodeling but not microtubule organizing center polarity**

Karine Chemin<sup>1</sup>, Armelle Bohineust<sup>1</sup>, Stéphanie Dogniaux, Marie Tourret, Sarah Guégan, Francesc Miro, and Claire Hivroz

*Journal of Immunology*, 2012, 189 : 2159-2168. <sup>1</sup> contributed equally to this work

## Résumé

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la sécrétion des cytokines par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> joue un rôle majeur dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Cependant, la façon dont les cytokines une fois produites, étaient transportées dans la cellule T et la régulation éventuelle de leur sécrétion n'étaient pas décrites. Dans cette étude, nous avons analysé le rôle du remaniement du cytosquelette à la synapse immunologique dans la sécrétion des cytokines. Nous avons montré que la petite Rho GTPase Cdc42, contrôlait la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires humains. De façon surprenante, la polarité du MTOC à la synapse n'est pas contrôlée par Cdc42, et contrairement à la polymérisation des microtubules, n'est pas nécessaire à la sécrétion des cytokines. Nous avons également montré que la réorganisation de l'actine à la synapse, qui dépend de Cdc42, contrôle la formation d'un anneau d'actine polymérisée à la synapse, la concentration des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  à l'intérieur de cet anneau, et la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  vers la cellule présentatrice d'antigènes.

## 1.1- Introduction

La production des cytokines sécrétées par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est régulée par de nombreux évènements bien connus, comme la signalisation par le TCR et les molécules de co-stimulation, la régulation de la transcription, le contrôle de la stabilité des ARNm, ainsi que des modifications épigénétiques, mais les étapes d'exocytose n'étaient à ce jour pas

clairement décrites. Il avait été montré il y a une vingtaine d'années que les cytokines étaient polarisées vers la cellule présentatrice (Kupfer et al., 1991), et plus récemment, il avait été proposé que les cytokines sécrétées par les cellules T CD4<sup>+</sup> activées, utilisaient au moins deux voies distinctes : l'une dirigée vers la CPA et l'autre multidirectionnelle (Huse et al., 2006). Dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, il avait été montré que la réorganisation des cytosquelettes d'actine (Banerjee et al., 2007; Butler and Cooper, 2009; Orange et al., 2002) et de microtubules (Kupfer and Dennert, 1984; Stinchcombe et al., 2006; Tsun et al., 2011) à la synapse jouaient un rôle majeur dans le transport et la sécrétion des granules cytotoxiques vers la cellule cible. Nous avons donc cherché à comprendre le rôle du remaniement du cytosquelette à la synapse dans l'exocytose des cytokines. Pour cela, nous avons utilisé une approche d'extinction lentivirale avec des short hairpin RNA (shRNA) pour inhiber l'expression de Cdc42 et étudier l'effet de cette inhibition sur le remaniement du cytosquelette et la sécrétion de cytokines dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

## 1.2- Résultats

### 1.2.1- En absence de Cdc42, la sécrétion des cytokines est altérée dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires humains

Dans ce projet, nous étudions le rôle de la réorganisation du cytosquelette à la synapse dans la sécrétion des cytokines, en utilisant une approche d'inhibition de l'expression de Cdc42. Nous avons donc débuté cette étude en analysant l'effet de l'absence de Cdc42 sur la sécrétion des cytokines. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires humains sont infectés avec des lentivirus contenant un shRNA contrôle ou deux shRNA dirigés contre Cdc42. Le niveau d'expression de Cdc42 est inhibé de 56% pour le shCdc42-1 et de 76% pour le shCdc42-3 (**Figure 2.1.A-B**). Les cellules T transduites sont activées pendant 6h avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3+anti-CD28 ou avec des cellules dendritiques autologues chargées en superantigènes. On observe une inhibition de la concentration d'IFN- $\gamma$  dans le surnageant (**Figure 2.1.C**), des LT exprimant les shRNAs spécifiques de Cdc42, qui dépend du niveau d'inhibition de chaque sh-Cdc42. Cette diminution d'IFN- $\gamma$  dans le surnageant est due à une inhibition au niveau de la sécrétion et pas au niveau de la transcription, comme le montre le taux identique d'ARNm exprimé par les LT activés exprimant le sh-Ctl ou les deux sh-Cdc42 (**Figure 2.1.D**), ou au niveau de la traduction de la protéine comme le montrent les

quantités équivalentes d'IFN- $\gamma$  mesurées par FACS intracellulaire (**Figure 2.1.E-G**).

Ce défaut de sécrétion apparaît comme général et non restreint à l'IFN- $\gamma$ , compte tenu du profil de sécrétion d'une autre cytokine, TNF- $\alpha$ , et de la chimiokine MIP1- $\alpha$  (**Figure 2.1H-I**). Nous avons confirmé ces résultats dans le modèle Jurkat également utilisé au cours de cette étude. Dans ces expériences, les cellules Jurkat sont infectées avec les lentivirus contenant les shRNA, et avec un lentivirus codant pour une construction IFN- $\gamma$ -GFP. Dans ces cellules, l'expression de Cdc42 est inhibée de 60 et 80% pour le shCdc42-1 et shCdc42-3 respectivement (**Figure 2.2.A-B**). Lorsque les Jurkat exprimant le shRNA et l'IFN- $\gamma$ -GFP sont activées avec des cellules B Raji en présence de sAg SEE, on observe la même inhibition de la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ -GFP que celle mise en évidence dans les cellules T primaires. Les niveaux d'inhibition de sécrétion corrént également avec les niveaux d'inhibition de l'expression de Cdc42 par les deux shRNA (**Figure 2.2.C**). Là encore, seule la sécrétion est altérée, et non le niveau intracellulaire d'IFN- $\gamma$  (**Figure 2.2.D**).

Nous avons donc montré ici que Cdc42 est nécessaire à la sécrétion de cytokines et chimiokines par les LT CD4<sup>+</sup>.

### **1.2.2- L'inhibition d'expression de Cdc42 n'affecte pas la polarisation du MTOC à la synapse dans les cellules T primaires et Jurkat**

Nous avons initialement émis l'hypothèse que le remaniement des cytosquelettes d'actine et de microtubules contrôlait la sécrétion des cytokines, et il a été montré que Cdc42 contrôlait la polarisation du MTOC à la synapse (Stowers et al., 1995), nous avons donc supposé que Cdc42 contrôlait la sécrétion d'IFN- $\gamma$  en régulant la polarisation du MTOC et le transport de l'IFN- $\gamma$  à la synapse. Pour tester cette hypothèse, nous avons activé les lymphocytes T primaires exprimant un shRNA contrôle ou spécifique de Cdc42 avec des billes recouvertes d'anti-CD3+anti-CD28, ou avec des DCs autologues chargées en sAg, et nous avons observé au microscope la position du MTOC et de l'IFN- $\gamma$  dans ces cellules T (**Figure 2.3.A**). L'inhibition de Cdc42 par les shRNA dans les LT primaires n'affecte globalement pas la polarisation du MTOC ou des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ . Le contrôle de la polarisation du MTOC par Cdc42 dans les LT était encore sujet à controverse. Nous avons donc quantifié plus précisément la polarisation du MTOC dans les lymphocytes T primaires exprimant les shRNA (**Figure 2.3.B**) et dans les cellules Jurkat exprimant les shRNA et une construction centrine-GFP, permettant de visualiser le centrosome (**Figure 2.3.C-D**). Pour les

cellules T primaires, la position du MTOC, déterminée comme le signal Tubuline- $\alpha$  maximum, est comptée à l'aveugle en distinguant trois positions : distale, proximale (polarisée vers la CPA) et « docked » (collée à la synapse). Une moyenne de 55 conjugués est comptée pour chaque condition de stimulation (bille vs DC) et pour chaque shRNA (contrôle, Cdc42-sh1 et sh3), et cette quantification confirme que l'inhibition de Cdc42 n'altère pas le recrutement du centrosome à la synapse. Nous obtenons le même résultat en mesurant la distance entre le MTOC (signal centrine-GFP) de LT Jurkat et la synapse formée avec des LB Raji-SEE, montrant que Cdc42 ne contrôle pas non plus la polarisation du MTOC dans le modèle Jurkat. Ce résultat confirme des résultats publiés par le groupe de Billadeau (Gomez et al., 2007). Les différences observées, dans différents types cellulaires, pour le rôle joué par Cdc42 dans la polarité du MTOC reflètent probablement le fait que Rac1 joue un rôle important dans la polarité des LT (Gomez et al., 2007).

### **1.2.3- La polarisation du MTOC à la synapse n'est pas nécessaire à la sécrétion des cytokines par les LT**

Nous venons donc de montrer que Cdc42 contrôlait la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  mais pas la polarisation du centrosome. Ce dernier résultat était toujours sujet à controverse jusqu'à présent, nous avons donc voulu nous assurer qu'effectivement il n'y avait pas de lien entre polarité du MTOC et sécrétion d'IFN- $\gamma$ , d'autant plus que le rôle de la polarisation du centrosome à la membrane dans le transport et le recrutement à la synapse des granules cytotoxiques (Stinchcombe et al., 2006) et de certains récepteurs membranaires (Bertrand et al., 2010; Das et al., 2004; Tourret et al., 2010) avait déjà été décrit. Nous avons donc inhibé la polarisation du MTOC avec un inhibiteur des PKC atypiques dans des LT CD4<sup>+</sup> primaires humains, et analysé l'effet sur la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Les LT traités ou non avec le pseudo-substrat des PKC atypiques ont été activés sur lame avec des cellules dendritiques chargées en sAg pendant 6h. Les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec des Ac anti-Tubuline- $\alpha$  et anti-IFN- $\gamma$ , et avec la phalloïdine marquant l'actine polymérisée (**Figure 2.4.A**). Le traitement avec l'inhibiteur induisait bien un défaut de polarisation du MTOC, comme le montrent les images de microscopie et la quantification réalisée en aveugle, de la polarisation du MTOC dans les conjugués LT-DCsAg (**Figure 2.4.B**). Les LT traités ou non avec l'inhibiteur ont été activés en parallèle avec des DC chargées en sAg pendant 20h en plaque, et les concentrations d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants mesurées par ELISA (**Figure**

**2.4.C).** L'inhibition de la polarisation du MTOC n'affectait pas la sécrétion de la cytokine. Les mêmes expériences ont été réalisées avec le modèle d'activation des cellules T avec des billes anti-CD3+anti-CD28 (**Figure 2.4.D-E**), et on obtient les mêmes résultats à savoir pas d'inhibition de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  en absence de polarité du centrosome. On remarque même que les concentrations d'IFN- $\gamma$  sont supérieures lorsque les cellules T sont traitées avec l'inhibiteur des PKC atypiques, mais nous reviendrons plus tard sur ce résultat.

Ainsi la polarité du MTOC n'est pas nécessaire à la sécrétion des cytokines, cela suggère que si les cellules T sont en conjugués avec plusieurs CPA, ces dernières reçoivent un signal cytokinique. Mais cela ne signifie pas que toutes les CPA vont recevoir la même qualité de signal, car notre équipe et d'autres ont récemment montré que la polarité des LT à la synapse était nécessaire à la sécrétion d'IL-12 dépendante de CD40L par les DC (Bertrand et al., 2010; Tourret et al., 2010).

#### **1.2.4- L'intégrité du réseau de microtubules est nécessaire à la sécrétion des cytokines**

La polarisation du MTOC n'est donc pas nécessaire à la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ , nous nous sommes ensuite demandé si le réseau de microtubules était important pour le relargage de la cytokine. Pour cela, nous avons traité les cellules T CD4<sup>+</sup> primaires avec la colchicine, une drogue qui inhibe la polymérisation des microtubules et la polarisation du MTOC. Les cellules sont pré-traitées 5min avec la drogue ou le contrôle DmsO, lavées trois fois, puis laissées en milieu complet à 37°C pendant 1h, pour laisser le temps aux cellules de se débarrasser des excédents de colchicine. Notre équipe avait précédemment montré que ce traitement n'affectait pas la viabilité des cellules, l'activation des LT avec des DC ou des billes, ou encore la formation de conjugués (Tourret et al., 2010). Les cellules sont relavées puis incubées avec des billes anti-CD3+anti-CD28 ou des cellules dendritiques chargées en sAg pendant 8h sur lamelles poly-L-lysine ou en plaque 96 puits (**Figure 2.5**). On vérifie tout d'abord par microscopie l'efficacité du traitement colchicine (ColX) en marquant le réseau de microtubules avec un Ac anti-Tubuline- $\alpha$ , on marque également l'IFN- $\gamma$ , et on observe que le réseau de microtubules a bien disparu dans les cellules traitées colchicine, seul le MTOC est visible (**Figure 2.5.A**). L'IFN- $\gamma$  semble dispersé dans les cellules traitées colchicine, suggérant un rôle des microtubules dans le transport des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ . En

parallèle, les cellules T traitées ou non avec la colchicine sont activées en plaque avec les billes ou les DCsAg. Les surnageants sont récupérés au bout de 6h et les concentrations d'IFN- $\gamma$  sont analysées par ELISA (**Figure 2.5.B**). On observe une forte inhibition de la sécrétion après traitement avec la colchicine. Les cellules sont lysées au bout des 6h d'activation et les lysats sont analysés par PCR quantitative (**Figure 2.5.C**), et on observe que le défaut de sécrétion n'est pas dû à un défaut de production d'IFN- $\gamma$ , en tout cas au niveau transcriptionnel. L'analyse par FACS intracellulaire du pourcentage de cellules exprimant l'IFN- $\gamma$  et de l'intensité de fluorescence (**Figure 2.5.D**) confirme que les cellules traitées à la colchicine produisent de l'IFN- $\gamma$ . On remarque également un pourcentage de cellules IFN- $\gamma^+$  et une MFI supérieures dans les cellules traitées colchicine par rapport au contrôle DmsO, probablement dû à une accumulation de la cytokine non sécrétée.

Ces résultats montrent donc que la polymérisation des microtubules, permettant le maintien de l'intégrité du réseau, est nécessaire à la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et non à la production, et que la polarisation du MTOC ne joue pas de rôle dans l'exocytose de la cytokine.

### **1.2.5- Le remaniement de l'actine à la synapse est altéré dans les cellules T ayant perdu l'expression de Cdc42**

Nous avons montré que Cdc42 ne contrôlait pas la polarisation du MTOC, nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de Cdc42 dans le remaniement du cytosquelette d'actine à la synapse. Pour cela, les cellules T primaires infectées avec les lentivirus contenant le shRNA contrôle ou les deux shRNA spécifiques de Cdc42 ont été activées pendant 6h sur des lamelles poly-L-lysine avec des billes ou des cellules B Raji chargées en sAg. Les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées avec un Ac anti-Tubuline- $\alpha$  et la phalloïdine pour marquer l'actine polymérisée. Les lames sont analysées au microscope et l'analyse est faite sur les projections de tous les plans et sur les projections orthogonales de la zone synaptique (**Figure 2.6.E et G**). On remarque que l'actine polymérisée est normalement concentrée à la synapse et le MTOC bien polarisé vers la cellule B ou la bille dans les cellules contrôles ou en absence de Cdc42. Mais lorsqu'on analyse plus précisément le remaniement de l'actine au niveau de la zone synaptique, on remarque que l'actine polymérisée est bien exclue du centre de la synapse dans les cellules contrôles comme précédemment décrit (Dustin and Cooper, 2000), mais pas dans les cellules exprimant les sh-Cdc42. De plus, comme montré

précédemment, le MTOC est recruté à la synapse dans les deux conditions. Nous avons alors cherché à quantifier ce défaut d'exclusion d'actine observé dans les cellules exprimant les sh-Cdc42. Pour cela les six plans médians sur les projections orthogonales des zones synaptiques ont été sélectionnés (**Figure 2.6.B**), et ont été utilisés pour obtenir les profils d'intensité de fluorescence de l'actine polymérisée marquée avec la phalloïdine (**Figure 2.6.C**). On détermine ensuite la valeur d'intensité de fluorescence maximum aux bords de la synapse (valeur «  $a$  »), et la moyenne des intensités de fluorescence au centre de la synapse (valeur «  $b$  »). Le ratio entre ces deux valeurs nous donne une valeur numérique permettant d'évaluer l'exclusion de l'actine au centre de la synapse. Plus le ratio tend vers zéro et plus l'actine est concentrée au niveau du pSMAC, plus le ratio tend vers un et moins l'actine est exclue du cSMAC.

Cette quantification nous a permis de confirmer que l'actine polymérisée était moins exclue du centre de la synapse dans les cellules Jurkat exprimant les sh-Cdc42 en conjugués avec des LB Raji (**Figure 2.6.D**), ainsi que dans les cellules T primaires exprimant les sh-Cdc42 en conjugués avec des billes (**Figure 2.6.F**) ou des LB Raji (**Figure 2.6.H**).

### **1.2.6- Le recrutement et la sécrétion des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ à la synapse requière un remaniement de l'actine dépendant de Cdc42**

Jusqu'ici nos résultats ont montré que Cdc42 contrôlait la sécrétion des cytokines dans les lymphocytes T et l'exclusion de l'actine au centre de la synapse. Pour tenter de comprendre comment ce défaut de remodelage de l'actine pouvait affecter la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ , nous avons suivi de façon dynamique les mouvements des vésicules contenant la cytokine. Les cellules T Jurkat ont été infectées avec les lentivirus contenant les sh-RNA contrôle ou spécifique de Cdc42, et avec un lentivirus codant pour l'IFN- $\gamma$ -GFP. Ce vecteur ne contient pas de résistance à la puromycine, seules survivront les cellules qui auront intégré le shRNA et l'IFN- $\gamma$ -GFP ou uniquement le shRNA. Ces cellules sont déposées sur des lamelles recouvertes d'Ac anti-CD3 et placées sous la chambre du spinning disk à 37°C. Ce modèle très utilisé (Bunnell et al., 2001) d'étalement des cellules T au contact des anticorps activateurs, permet de mimer d'une façon très minimaliste une cellule présentatrice, et ainsi de mieux visualiser ce qui sera considéré comme la zone synaptique. La **figure 2.7.A** présente les images de la zone de contact entre la cellule T et la lame, issues du film réalisé au



vidéomicroscope. Dans les cellules contrôles, la majorité des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  est concentrée dès que la cellule rentre en contact avec la lame. Les vésicules en périphérie semblent transportées progressivement vers le centre de la cellule. Dans les cellules exprimant le sh-Cdc42, les vésicules sont moins concentrées lorsque la cellule rentre en contact avec la lame et les vésicules restent en périphérie sans rejoindre le centre de la cellule.

Cette observation suggère une fois encore un défaut de transport des vésicules IFN- $\gamma$ , ainsi qu'un défaut de concentration des vésicules au centre de la cellule. Nous avons alors analysé la distribution des vésicules à la synapse entre LT Jurkat et LB Raji (**Figure 2.7.B**) et entre LT primaires et cellules dendritiques (**Figure 2.7.D**). Dans les deux cas, l'IFN- $\gamma$  est concentré autour du MTOC polarisé à la synapse, dans une zone contenant peu d'actine polymérisée, pour les cellules contrôles. Mais dans les cellules exprimant les sh-Cdc42, l'actine est moins exclue du centre de la synapse, le MTOC est toujours polarisé vers la cellule présentatrice, et les vésicules IFN- $\gamma$  sont dispersées à la synapse. Pour quantifier cette dispersion, nous avons utilisé les projections orthogonales des zones synaptiques avec les marquages IFN- $\gamma$ , sur lesquelles a été appliqué un seuil de détection (**Figure 2.7.C**). Pour déterminer ce seuil, toutes les images pour sh-Contrôle et sh-Cdc42 d'une même expérience sont ouvertes sur le logiciel ImageJ et on applique un seuil automatique. Cette valeur est notée et on applique finalement le même seuil à toutes les images au sein d'une même expérience, correspondant à la valeur médiane de tous les seuils détectés de façon automatique. On détermine ensuite grâce à la fonction d'analyse des particules du logiciel, le nombre et la taille des spots sur chaque image. Cette quantification a mis en évidence un plus grand nombre de spots à la synapse des cellules exprimant les sh-Cdc42 que des cellules contrôles, dans le modèle Jurkat (**Figure 2.7.C**) et dans le modèle de LT primaires (**Figure 2.7.E**). L'augmentation du nombre de spots suggère une distribution plus dispersée des vésicules IFN- $\gamma$ . Afin d'analyser plus précisément la localisation de ces vésicules, nous avons repris les projections orthogonales décrites précédemment, et nous avons déterminé la position en  $x$  et en  $z$  du centre de masse de chaque vésicule. Ces valeurs ont été normalisées en fonction de la taille de la synapse pour chaque cellule, puis superposées sur le même graphe. Ceci nous permet d'avoir une image moyenne du marquage IFN- $\gamma$  à la synapse dans les deux conditions expérimentales utilisées : LT exprimant le shRNA contrôle et LT exprimant un shRNA spécifique de Cdc42. Cette analyse montre que le marquage de l'IFN- $\gamma$  est concentré au centre de la synapse dans les cellules contrôles et dispersées sur toute la zone synaptique dans les cellules exprimant sh-Cdc42 (**Figure 2.8**). Cette quantification a également confirmé qu'il n'y

avait pas de défaut de production d'IFN- $\gamma$  dans les cellules sh-Cdc42, car la somme des aires des vésicules analysées pour chaque condition est identique. Nous avons mis en évidence jusqu'à présent que Cdc42 contrôlait la réorganisation de l'actine polymérisée à la synapse, nécessaire à la concentration des vésicules IFN- $\gamma$ , et que l'absence de Cdc42 inhibait la sécrétion de la cytokine. Ces résultats suggèrent que l'exclusion de l'actine est nécessaire au relargage de l'IFN- $\gamma$  dans la zone synaptique. Nous avons donc supposé que la dépolymérisation de l'actine dans les sh-Cdc42 permettrait de restaurer la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Afin de tester cette hypothèse, nous avons activé les LT primaires exprimant le sh-Ctl ou les deux sh-Cdc42 avec des billes anti-CD3+anti-CD28 pendant 6h à 37°C, et ajouté une faible concentration de latrunculine-B, une drogue qui bloque la polymérisation de l'actine, pendant les trois dernières heures d'activation. En effet, il a été montré que la latrunculine-B bloquait la formation des conjugués entre LT et cellule présentatrice et l'activation du LT. On active donc les LT pendant 3h, permettant ainsi aux conjugués de se former, sans bloquer l'activation des cellules T, puis on ajoute la latrunculine afin de n'intervenir qu'au niveau de l'étape de sécrétion de l'IFN- $\gamma$ . Les concentrations d'IFN- $\gamma$  sont dosées par ELISA dans les surnageants, et normalisées pour chaque shRNA par rapport aux concentrations obtenues dans la condition traitée en dms0 (**Figure 2.9**). On observe que l'addition de latrunculine-B restaure partiellement la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules exprimant les sh-Cdc42. Ceci suggère fortement que la dynamique de polymérisation et dépolymérisation de l'actine à la synapse contrôle le recrutement et le relargage d'IFN- $\gamma$  vers la cellule présentatrice.

## 1.3- Discussion

Nous avons donc montré avec cette étude que la réorganisation du cytosquelette d'actine à la synapse était dépendante de Cdc42 et contrôlait le recrutement et la concentration des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ , et le relargage final de la cytokine vers la cellule présentatrice (**Figure 2.10**).

### 1.3.1- Le remaniement de l'actine contrôle l'exocytose des cytokines : quel pourrait être le mécanisme ?

Il a récemment été montré dans les mastocytes que les deux protéines régulatrices de l'actine, Coronine 1a et 1b, contrôlaient la sécrétion des cytokines sans affecter leur

production (Foger et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que les fonctions régulatrices d'actine de la coronine contrôleraient le trafic vésiculaire. En effet, des processus dépendants de l'actine ont été impliqués dans le transport de vésicules du Golgi vers la membrane plasmique (Miserey-Lenkei et al., 2010), une voie de transport cellulaire utilisée pour l'exocytose de cytokines nouvellement synthétisées. L'actine pourrait également former une barrière physique à la synapse bloquant l'accès des vésicules contenant les cytokines, comme il a été montré pour le relargage de granules dans les cellules chromaffines (Perrin and Aunis, 1985). Toutefois, la formation dynamique de nouveaux filaments d'actine est sans doute nécessaire au recrutement et à l'accrochage des vésicules à la membrane plasmique, comme c'est le cas pour les granules cytolytiques dans les cellules NK (Brown et al., 2011; Rak et al., 2011).

Deux mois après la publication de cet article, deux autres ont été publiés montrant que dans les cellules NK, les vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  ainsi que les granules cytotoxiques étaient localisées à la synapse au niveau de zones libres d'actine polymérisée (Brown et al., 2012), et que les mouvements de ces granules étaient contrôlés par la dynamique de polymérisation d'actine (Mace et al., 2012). Ces résultats ainsi que les nôtres suggèrent que la dynamique de polymérisation de l'actine à la synapse permet à la fois l'accrochage de vésicules et granules dans cette zone et l'ouverture de « pores » permettant leur exocytose.

### **1.3.2- Quels sont les régulateurs en aval de Cdc42 ?**

Il a été montré que WASp qui interagit avec Cdc42 (Zeng et al., 2003) et lie la signalisation du TCR aux remaniements de l'actine (Cannon et al, 2001 ; Badour et al, 2003), contrôle la sécrétion en aval de Cdc42 dans des cellules neuroendocrines via la formation de nouveaux filaments d'actine (Gasman et al., 2004). Les LT de souris WASp KO produisent aussi de l'IFN- $\gamma$  sans le sécréter (Morales-Tirado et al., 2004). IQGAP1 contrôle la sécrétion dans les cellules pancréatiques  $\beta$  et les cellules de carcinome de sein (Rittmeyer et al, 2008 ; Sakurai-Yageta et al, 2008), ainsi que l'exocytose des granules cytolytiques par les cellules NK (Kanwar and Wilkins, 2011). C'est également un régulateur de l'actine (Brandt and Grosse, 2007). De plus IQGAP1 lie à la fois des protéines régulant l'actine (Brandt et al, 2007 ; Le Clainche et al, 2007) et des protéines liant l'extrémité plus des microtubules (Fukata et al., 2002), ce qui fait de cette protéine un candidat idéal pour poursuivre la description du mécanisme de régulation de la sécrétion des cytokines par le cytosquelette.

## 2. Rôle d'IQGAP1 dans la signalisation en aval du TCR et la réorganisation du cytosquelette d'actine [résultats complémentaires]

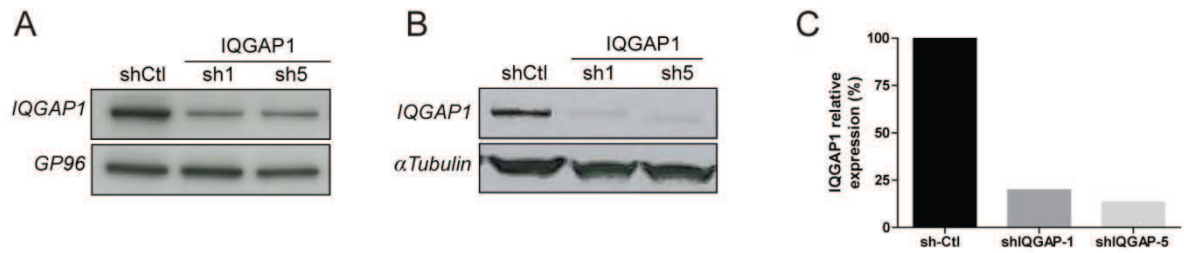
---

### 2.1- Introduction

Notre étude précédente a permis de mettre en évidence que la dernière étape de production de l'IFN- $\gamma$ , l'exocytose, était régulée par le cytosquelette du LT. Nous savons maintenant que Cdc42 permet d'ouvrir le réseau d'actine polymérisée au niveau du cSMAC, mais par quel mécanisme ? Les films réalisés sur les cellules exprimant l'IFN- $\gamma$ -GFP et étalées sur les lames recouvertes d'Ac anti-CD3 et les expériences d'inhibition de la polymérisation des microtubules suggéraient que les vésicules d'IFN- $\gamma$  étaient recrutées à la synapse via le réseau de microtubules, mais on ignore encore comment, et quelles sont les protéines impliquées. Pour tenter de répondre à cette question nous nous sommes intéressés à l'un des partenaires de Cdc42, IQGAP1. Cette protéine liant à la fois l'actine polymérisée (Bashour et al., 1997) et les microtubules via CLIP-170 (Fukata et al., 2002), son inhibition pourrait nous en apprendre beaucoup sur le rôle du cytosquelette dans la sécrétion des cytokines.

Nous avons donc débuté cette étude en espérant poursuivre la description du mécanisme de régulation de l'exocytose des cytokines, conforté par les résultats récents décrivant le lien entre IQGAP1 et le complexe exocyste (Sakurai-Yageta et al., 2008), et démontrant que ces deux partenaires favorisaient l'accumulation de métalloprotéases à l'invadopode des cellules cancéreuses, et la dégradation de la matrice extracellulaire. Le parallèle avec la sécrétion des cytokines à la synapse par les LT CD4 était envisageable.

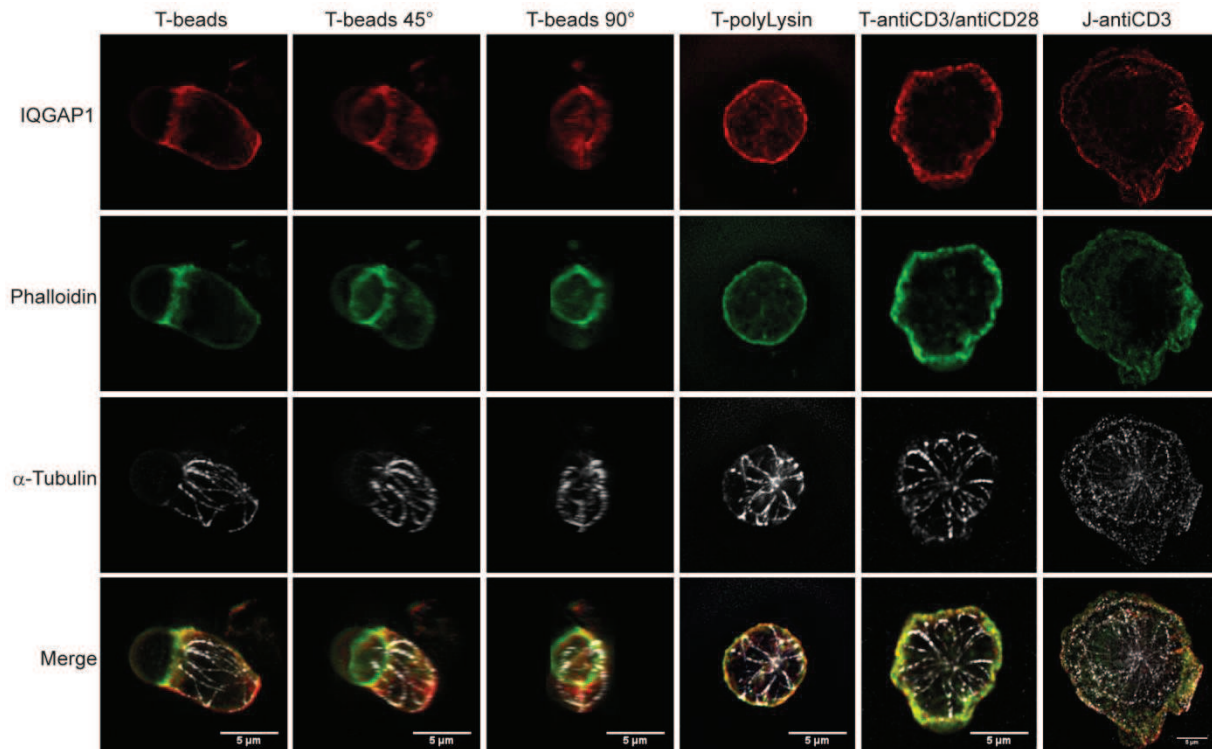
Au moment de la mise en place de ce projet, peu de choses étaient connues sur le rôle d'IQGAP1 dans les LT. Le groupe de G. Griffiths avait décrit dans les CTL, une localisation d'IQGAP1 à la synapse au niveau de l'anneau d'actine polymérisée, exclue du cSMAC (Stinchcombe et al., 2006). De plus, un article du groupe de D. Billadeau portant sur le rôle des formines dans la mise en place de la synapse (Gomez et al., 2007), suggérait en discussion qu'IQGAP1 contrôlait la polarisation du MTOC à la synapse dans la lignée Jurkat. Il semblait donc que cette protéine pouvait jouer un rôle dans le remaniement du cytosquelette des LT à la synapse et de ce fait pouvait être un bon candidat dans le contrôle de l'exocytose des cytokines.



**Figure 2.11 : Efficacité de l'inhibition de l'expression d'IQGAP1**

(A et B) Analyse par Western-Blot de l'expression d'IQGAP1 dans les LT primaires (A) et les cellules Jurkat (B) transduits avec les shRNA. L'expression de GP96 (A) et de la Tubuline- $\alpha$  (B) sont utilisés comme contrôle de charge.

(C) Analyse du taux d'inhibition au niveau de l'ARNm IQGAP1 par Q-PCR dans les LT Jurkat, exprimé en pourcentage par rapport au contrôle.



**Figure 2.12 : Localisation d'IQGAP1 dans les LT CD4<sup>+</sup>**

Les LT CD4<sup>+</sup> primaires sont activés avec des billes anti-CD3+anti-CD28 pendant 30min à 37°C, ou sur lamelles poly-L-lysine 0.02%, ou 10min sur lamelles recouvertes d'Ac anti-CD3+anti-CD28. Les cellules Jurkat sont déposées 10min sur lamelles recouvertes d'Ac anti-CD3. Les lames sont ensuite fixées, perméabilisées et marquées avec des Ac anti-IQGAP1, anti-Tubuline- $\alpha$ , et la phalloïdine pour marquer l'actine polymérisée. Les images des conjugués LT-billes ou des cellules sur poly-L-lysine correspondent à la projection de tous les plans, les images des cellules étalées sur anti-CD3+/-anti-CD28 présentent le plan de contact entre la cellule et la lamelle. Barre d'échelle : 5µm.

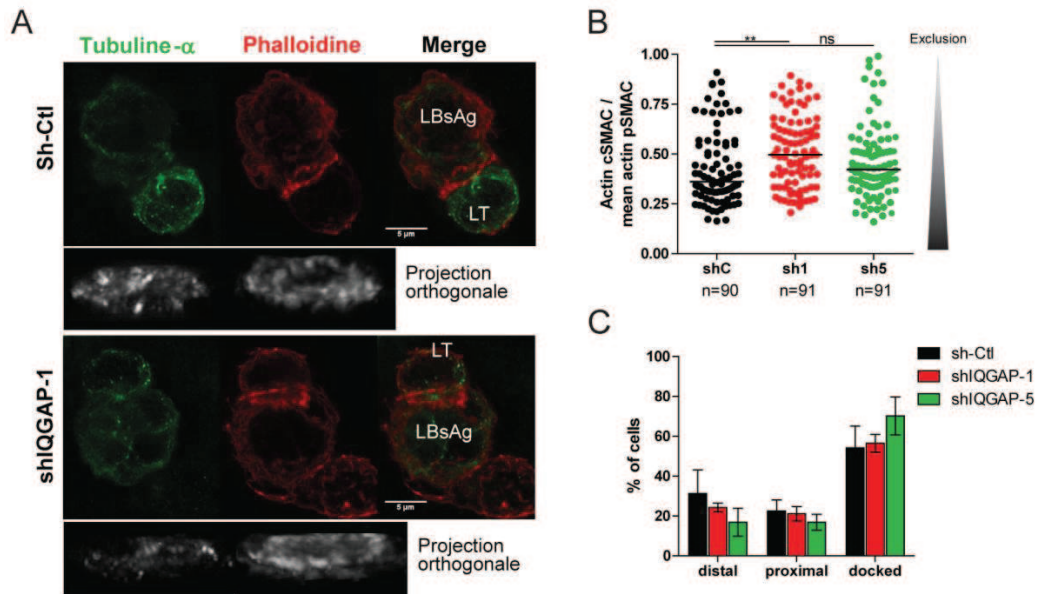
Cependant, je ne peux plus écrire aujourd'hui d'introduction sur ce projet sans citer l'article publié l'année dernière également par le groupe de D. Billadeau, décrivant le rôle d'IQGAP1 dans la polymérisation d'actine, la signalisation par le TCR et la production de cytokines par les lymphocytes T CD4 et CD8 murins (Gorman et al., 2012). Cet article est arrivé un peu trop tôt de notre point de vue, mais nous discuterons plus tard certains de ces résultats, et nous montrerons qu'ils nous ont à la fois confortés dans nos recherches et poussés à démontrer qu'ils ne reflétaient que partiellement le rôle d'IQGAP1.

Revenons aux idées de départ qui nous ont amenées à construire ce projet. IQGAP1 semblait donc le candidat idéal pour continuer à décrire le rôle du cytosquelette dans la sécrétion des cytokines. Pour cette étude nous avons utilisé la même approche d'inhibition de l'expression d'IQGAP1 dans les lymphocytes T CD4 humains primaires ou Jurkat, avec les lentivirus contenant des shRNA (**Figure 2.11**), pour décrire l'effet de l'inhibition d'IQGAP1 sur le remaniement des cytosquelettes d'actine et de microtubules et sur la sécrétion de cytokines.

## 2.2- Résultats

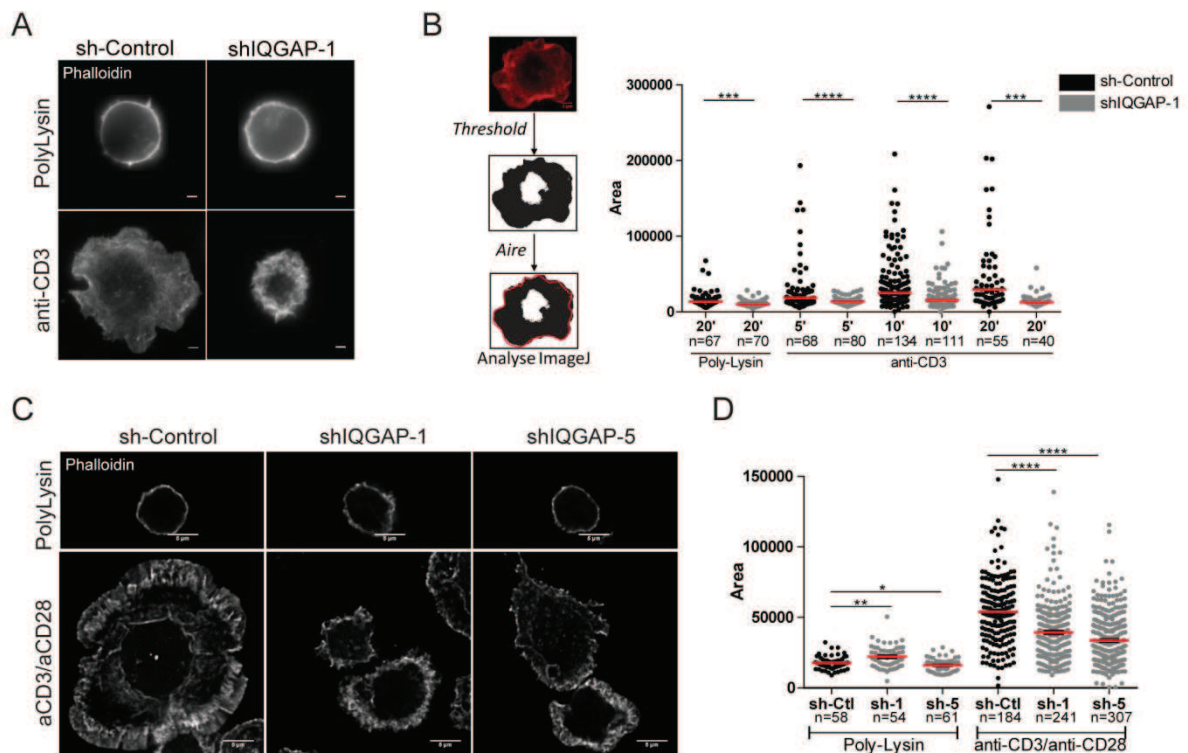
### 2.2.1- Localisation d'IQGAP1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Comme mentionné précédemment, il avait été montré qu'IQGAP1 co-localisait avec l'actine-F à la synapse, et était donc exclue du cSMAC dans les CTL (Stinchcombe et al., 2006). La première étape de cette étude était de décrire la localisation d'IQGAP1 dans nos modèles de LT primaires et Jurkat. Les LT CD4<sup>+</sup> primaires sont activés comme précédemment avec des billes anti-CD3+anti-CD28 permettant de bien visualiser l'exclusion de l'actine à la synapse. Les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées avec des Ac anti-Tubuline- $\alpha$ , anti-IQGAP1 et la phalloïdine (**Figure 2.12**). On observe une co-localisation entre IQGAP1 et l'actine polymérisée. La rotation de 90° des images met en évidence l'exclusion d'IQGAP1 et de l'actine-F au niveau du centre de la synapse entre LT et billes, et la polarisation du MTOC vers la bille. Les images d'étalement des cellules T primaires et Jurkat sur des lames recouvertes d'Ac anti-CD3/anti-CD28 et anti-CD3 respectivement, indiquent qu'IQGAP1 est concentré avec l'actine polymérisée au niveau du lamellipode.



**Figure 2.13** : Rôle d'IQGAP1 sur l'exclusion de l'actine et la polarisation du MTOC

(A) Conjugués entre LT primaires transduits avec les shRNA et LB Raji chargés en sAg, et projections orthogonales des zones synaptiques. Barres d'échelle : 5μm. (B) Quantification de l'exclusion de l'actine à la synapse pour chaque condition. Chaque point représente une cellule (description de la quantification Figure 2.6.A-D). (C) Quantification en aveugle de la polarisation du MTOC (quantification identique à celle réalisée Figure 2.3.B).



**Figure 2.14** : Rôle d'IQGAP1 dans le remaniement de l'actine

(A et C) Cellules Jurkat (A) et primaires (C) transduites avec les shRNA étalées 30min sur lamelles poly-L-lysine ou 10min sur lamelles recouvertes d'Ac anti-CD3 (A) ou antiCD3+antiCD28 (C), marquage phalloïdine. (B et D) Description de la quantification de l'étalement des cellules, avec mesure de l'aire, et quantification de l'étalement des Jurkat (B) et T primaires (D).

Cette localisation est cohérente avec le fait qu'IQGAP1 lie directement l'actine-F au niveau de son domaine CHD (Fukata et al., 1997).

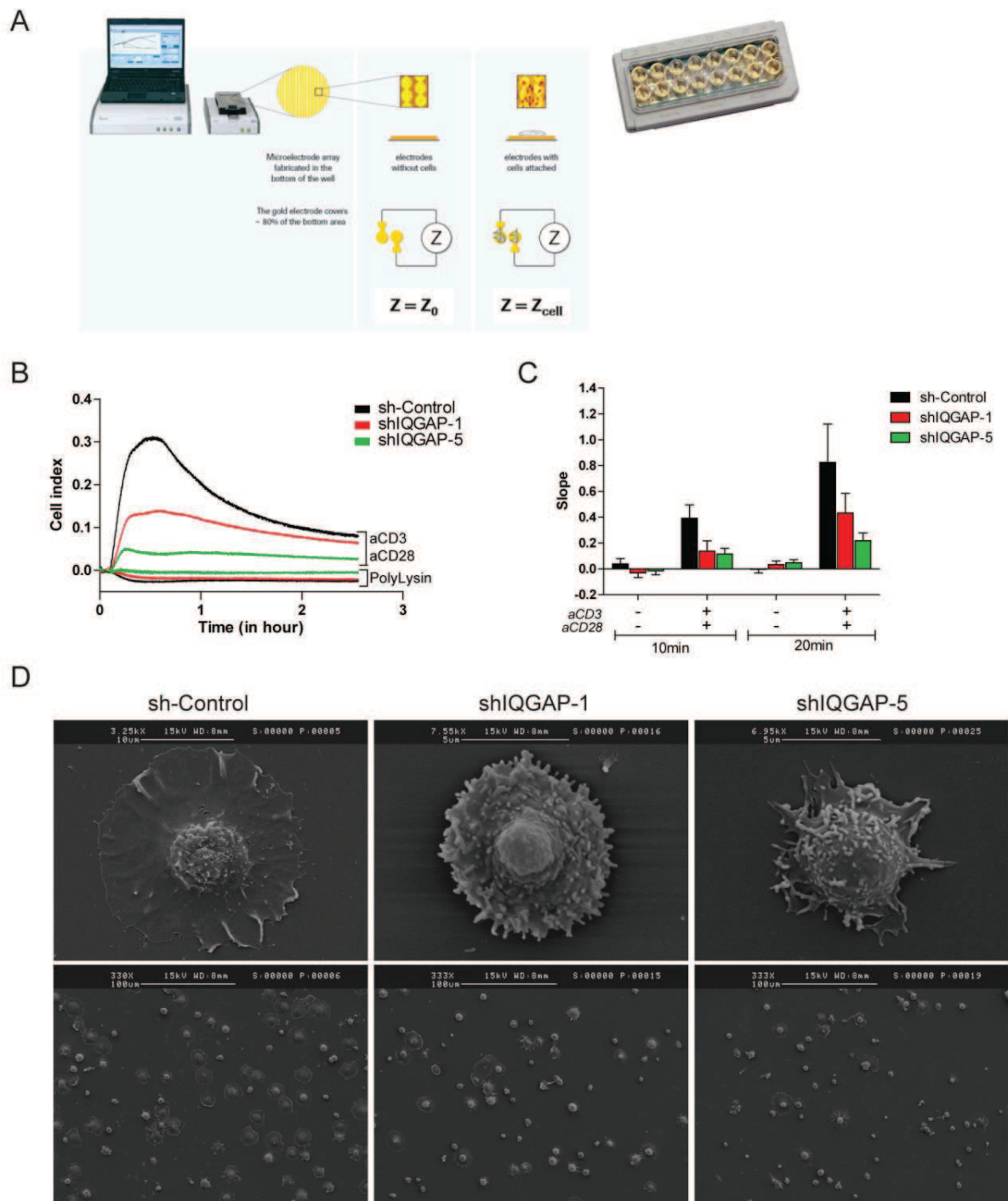
### 2.2.2- Rôle d'IQGAP1 sur le remaniement du cytosquelette

IQGAP1 qui lie l'actine-F co-localise donc avec l'actine polymérisée à la synapse et dans le lamellipode, et IQGAP1 se lie à Cdc42 (Hart et al., 1996) qui contrôle la réorganisation de l'actine à la synapse, nous avons donc analysé l'effet de l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 dans les LT sur la réorganisation de l'actine. Les LT primaires exprimant le shRNA contrôle ou les deux shRNA spécifiques pour IQGAP1 sont activés avec des LB Raji chargés en sAg sur lames pendant 1h. Les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées avec un Ac anti-Tubuline- $\alpha$  et la phalloïdine (**Figure 2.13.A**). Les projections orthogonales des zones synaptiques sont utilisées pour quantifier l'exclusion de l'actine du centre de la synapse, quantification d'autant plus nécessaire qu'aucune différence ne ressort visuellement. On utilise pour cela la même stratégie que celle utilisée pour Cdc42 (**Figure 2.6.A-D**). Cette quantification indique que l'actine polymérisée est moins exclue du centre de la synapse dans les cellules exprimant les sh-IQGAP1 que dans les cellules contrôles (**Figure 2.13.B**). Le résultat est significatif pour le shIQGAP-1 et on observe la même tendance pour le deuxième sh-IQGAP1.

La quantification de la polarisation du MTOC vers la cellule présentatrice est également réalisée sur ces images, en utilisant une fois encore la stratégie utilisée pour le projet Cdc42 (**Figure 2.3.B**), et ne montre pas de différence entre le sh-Contrôle et les sh-IQGAP1. Ces résultats sont similaires à ceux publiés il y a quelques mois (Gorman et al., 2012).

Les résultats sur l'exclusion de l'actine à la synapse étaient surprenants. En effet le lien direct entre l'actine-F et IQGAP1 et les résultats sur Cdc42 nous permettaient d'envisager un résultat plus net. Nous avons donc réalisé des expériences d'étalement des cellules Jurkat et T primaires sur des lames poly-L-lysine ou recouvertes d'Ac activateurs anti-CD3 et anti-CD3+anti-CD28 respectivement (**Figure 2.14**). Les cellules sont fixées et marquées avec la phalloïdine. Au contact des Ac activateurs, les cellules T s'étaient, ces changements morphologiques sont dépendants entre autres de l'actine. Ce modèle nous permet donc de détecter si les cellules ont un défaut général de polymérisation et/ou d'organisation de





**Figure 2.15 : IQGAP1 contrôle l'étalement des cellules T**

(A) Présentation de la machine Xcelligence (d'après le site de Roche), des plaques et description de la mesure d'impédance.

(B) Les cellules T primaires transduites avec les shRNA sont activées sur puits recouverts de poly-L-lysine ou d'Ac anti-CD3+antiCD28, en plaque 16 puits Xcelligence. Les courbes représentent la mesure de l'impédance toutes les 10 secondes pendant 2h.

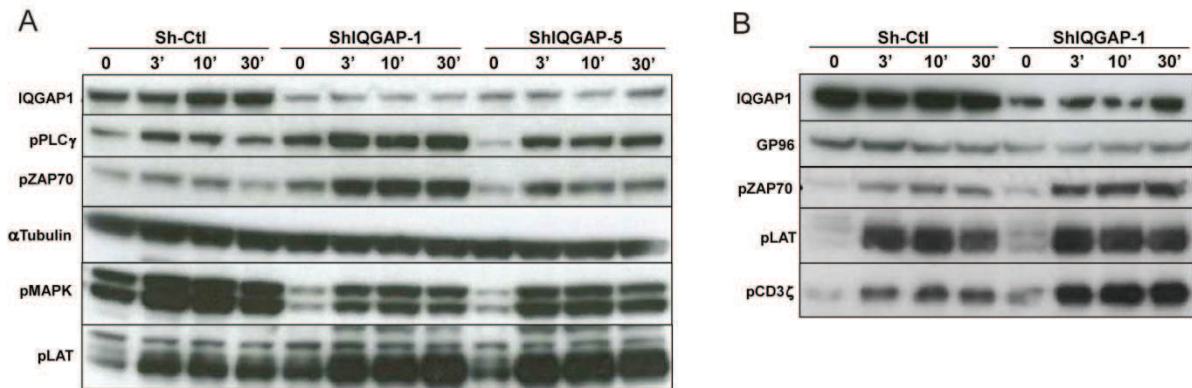
(C) Quantification de la pente de chaque courbe à 10 min et 20 min.

(D) Les cellules T primaires transduites avec les shRNA sont activées 10min sur lames recouvertes d'Ac anti-CD3+antiCD28, et observées par microscopie électronique à balayage.

l'actine, même si l'étalement implique également d'autres protéines comme les myosines. On remarque de façon très nette que les cellules qui ont perdu l'expression d'IQGAP1 (shIQGAP) ne s'étaient pas autant que les cellules contrôles au contact des Ac activateurs dans nos deux modèles : Jurkat (**Figure 2.14.A**) et LT primaires (**Figure 2.14.C**). Pour quantifier ce défaut d'étalement, nous avons appliqué un seuil de détection de l'intensité de fluorescence de la phalloïdine, identique pour chaque condition, permettant de mesurer l'aire de la cellule. Cette mesure d'aire indique clairement l'augmentation de la taille des cellules au cours du temps pour les cellules contrôles mais pas pour les cellules qui n'expriment plus IQGAP1 (**Figure 2.14.B**). La quantification effectuée sur les LT primaires donne un résultat similaire pour les deux sh-IQGAP1 (**Figure 2.14.D**).

Ce défaut d'étalement des cellules T traduit un défaut de réorganisation du cytosquelette d'actine nécessaire aux changements de forme des cellules et à la formation du lamellipode induit par la stimulation du TCR. Cependant cette quantification a été réalisée sur cellules fixées à un temps donné, et ne rend pas compte de la cinétique d'étalement des cellules qui pourrait simplement être différée dans les LT exprimant le sh-IQGAP1. Pour répondre à ce biais de la quantification d'images fixées, nous avons utilisé la machine Xcelligence, qui permet de mesurer l'impédance au cours du temps (**Figure 2.15.A**). Pour ces expériences, les cellules T sont déposées dans une plaque 16 puits, dont la taille correspond à ceux d'une plaque 96 puits. Les puits sont recouverts d'électrodes, qui recouvrent 80% de la surface des puits. Lorsque les cellules se déposent au fond du puits, elles vont recouvrir les électrodes et ainsi modifier le courant électrique qui les parcourt. Plus il y a de cellules dans le puits ou plus les cellules s'étaient au fond du puits, et plus l'impédance augmente, représentée par une courbe de « cell index » par rapport au temps. Ces expériences sont réalisées avec des cellules T primaires transduites avec les shRNA, et les puits sont recouverts de poly-L-lysine ou d'Ac anti-CD3+anti-CD28. L'impédance est mesurée toutes les 10 secondes pendant 2h (**Figure 2.15.B**). Ces courbes confirment que les cellules exprimant les sh-IQGAP1 s'étaient moins au contact des Ac activateurs et indiquent qu'il ne s'agit pas d'une cinétique d'étalement altérée, car lorsque l'on mesure la pente de chaque courbe à 10 et 20 min (temps utilisés pour les expériences d'étalement en immunofluorescence), la diminution de l'étalement est notable pour les 2 shRNA spécifiques d'IQGAP1, par rapport au contrôle (**Figure 2.15.C**).

Nous avons donc mis en évidence un défaut d'étalement des cellules après stimulation du TCR, reflétant probablement un remaniement altéré de l'actine polymérisée ou une



**Figure 2.16 : L'inhibition d'IQGAP1 affecte la signalisation en aval du TCR**

(A) Les cellules Jurkat exprimant les shRNA sont activés pendant 3, 10 et 30min à 37°C avec des Ac anti-CD3+anti-CD28, puis lysées dans un tampon contenant des anti-protéases et des anti-phosphatases. La phosphorylation des protéines de la signalisation du TCR est analysée par Western-Blot. Une expérience représentative de 5.

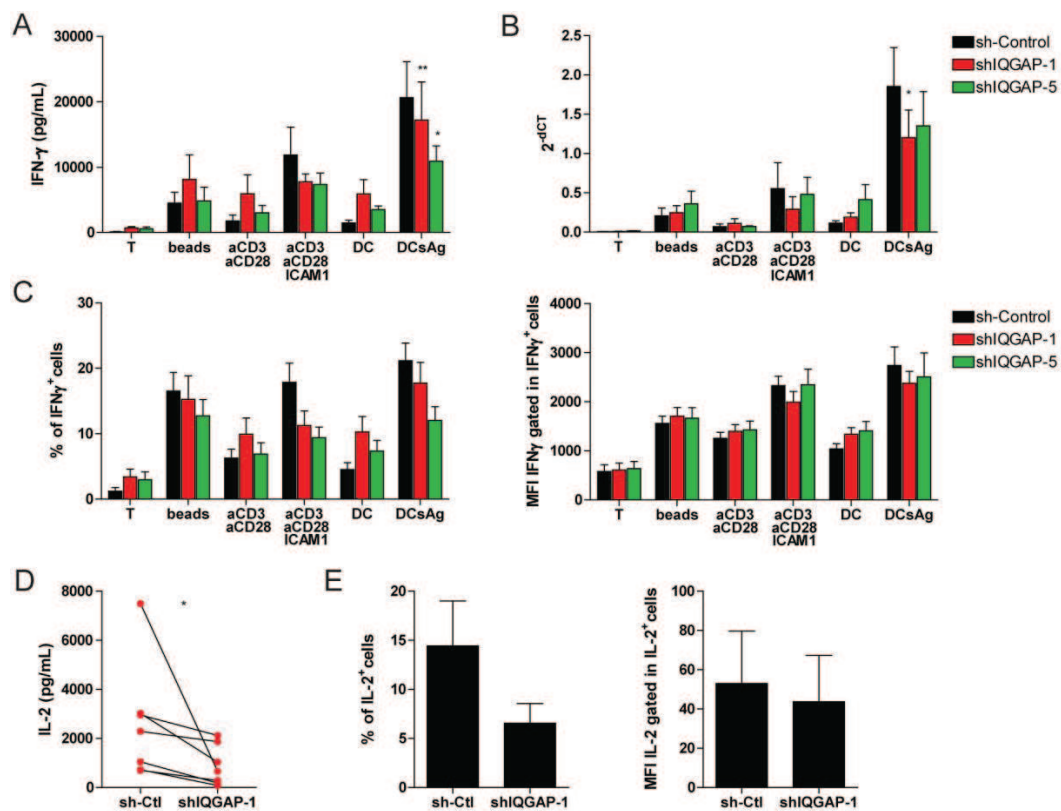
(B) Les cellules Jurkat exprimant les shRNA sont incubés pendant 15min à 37°C avec des LB Raji, puis le sAg SEE est ajouté (à 100ng/mL) pendant 3, 10 et 30min. Puis les cellules sont ensuite lysées et les lysats sont analysés par Western-Blot comme précédemment.

polymérisation altérée. D'après Gorman et collègues (2012), l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 entraînerait un mouvement très rapide du flux d'actine polymérisée au niveau du lamellipode de la cellule en étalement, mais les auteurs ne mentionnaient pas de défaut d'étalement, et se concentraient sur les mouvements de polymérisation d'actine dans le lamellipode. Il nous paraît peu probable que les auteurs n'aient pas fait état de ce défaut d'étalement que nous avons mis en évidence avec plusieurs approches différentes. Cependant, ce désaccord nous a poussé à observer les cellules de plus près. Nous avons donc activé les cellules T primaires transduites avec les shRNA sur des lames recouvertes d'Ac anti-CD3+anti-CD28 pendant 10 min, comme pour les expériences d'immunofluorescence. Les lames ont ensuite été observées avec un microscope électronique à balayage (**Figure 2.15.D**).

Ces expériences ont confirmé une fois de plus nos précédents résultats, et montrent clairement un défaut d'étalement des cellules sh-IQGAP1. L'augmentation de la résolution nous montre également que les cellules sh-IQGAP1 semblent commencer à s'étaler et à former un petit lamellipode, mais se figent dans cet état que nous avons appelé « étalement frustré ». Ce lamellipode semble très épais comparé à celui formé par les cellules contrôles, rappelant les résultats de Gorman et collègues.

### 2.2.3- IQGAP1 et la signalisation en aval du TCR

L'absence d'IQGAP1 affecte donc la réorganisation de l'actine nécessaire à la formation du lamellipode, or on sait que les remaniements des cytosquelettes d'actine et de microtubules sont induits par la stimulation du TCR. Nous avons donc étudié la phosphorylation des protéines dans la voie de signalisation du TCR. Pour cela, les cellules Jurkat infectées avec les lentivirus codant les shRNA sont activées avec des Ac solubles anti-CD3+anti-CD28 pendant 3, 10 et 30min à 37°C. Les cellules sont ensuite lysées et les lysats analysés par Western-Blot (**Figure 2.16.A**). On remarque qu'IQGAP1 est bien inhibé dans cette expérience, et que les protéines sont phosphorylées au cours du temps après stimulation du TCR dans les cellules contrôles et dans les cellules sh-IQGAP1, avec une phosphorylation plus importante dans les sh-IQGAP1 de PLC- $\gamma$ , ZAP-70 et LAT. Seule la phosphorylation des MAPK-p42/44 est diminuée dans les cellules sh-IQGAP1 par rapport au contrôle. Cela pourrait être dû à l'interaction directe d'IQGAP1 avec Erk1/2 (Roy et al., 2004) et MEK1/2 (Roy et al., 2005). Le recrutement de ces protéines pourrait être altéré en absence d'IQGAP1. L'inhibition de l'expression d'IQGAP1 est plus forte avec le shRNA-1 par rapport au shRNA-



**Figure 2.17 : IQGAP1 régule la production des cytokines dans les LT CD4<sup>+</sup> humains**

(A-C) Les LT CD4<sup>+</sup> transduits sont activés pendant 6h avec des billes ou sur des puits recouverts d'Ac anti-CD3+anti-CD28 avec ou sans ICAM-1 recombinant humain, ou avec des DC chargées en sAg (1ng/mL). La production d'IFN- $\gamma$  est mesurée dans les surnageants par ELISA (A), dans les lysats cellulaires par PCR quantitative (B), et par FACS intracellulaire (C). (A : n=6 ; B : n=4 ; C : n=6 expériences).

(D-E) Les cellules T Jurkat transduites sont activées pendant 6h avec des LB Raji et du sAg SEE. La production d'IL-2 est mesurée dans les surnageants par ELISA (D) et le pourcentage de cellules exprimant l'IL-2 et la MFI sont analysés par FACS intracellulaire (E). (E : n=2 expériences).

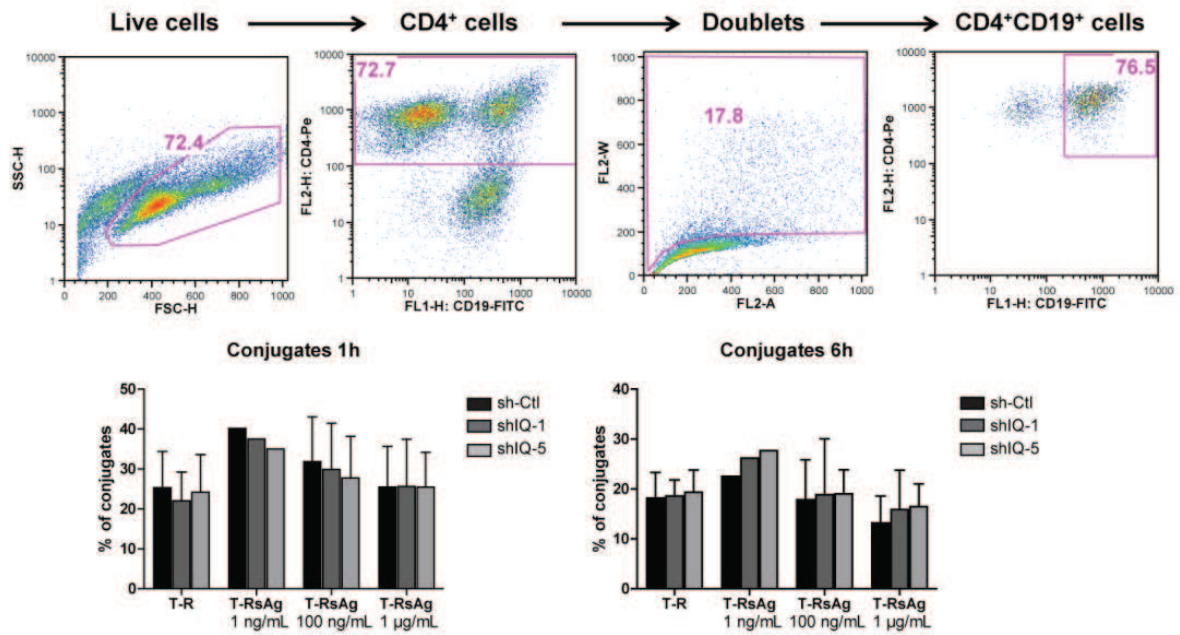
5 et on remarque que la phosphorylation est également augmentée mais de façon moindre pour ZAP-70, PLC- $\gamma$  et LAT avec le sh-5. De la même façon la phosphorylation de MAPK-p42/44 est inhibée dans les cellules exprimant le sh-5 mais moins que dans les cellules exprimant le sh-1. Les deux shRNA donnent donc le même phénotype avec un effet dose par rapport au taux d'inhibition d'IQGAP1.

La phosphorylation des protéines de signalisation a également été analysée dans les LT Jurkat activés avec des LB Raji et du sAg, modèle permettant d'analyser la stimulation du TCR par une CPA. On observe là encore une augmentation de la phosphorylation de ZAP-70, LAT et la chaîne  $\zeta$  du complexe CD3 dans les cellules exprimant un sh-IQGAP1 (**Figure 2.16.B**). Ces derniers résultats sont encore préliminaires et devront être reproduits.

#### 2.2.4- IQGAP1 et sécrétion de cytokines

L'inhibition d'IQGAP1 affecte donc le remaniement de l'actine, mais pas la polarisation du MTOC, et augmente la signalisation par le TCR, sauf pour Erk1 et Erk2. Pour poursuivre la description du mécanisme de régulation de la sécrétion des cytokines par le cytosquelette, nous avons donc analysé l'effet de l'absence d'IQGAP1 sur la sécrétion des cytokines.

Les LT primaires ont été infectés avec les lentivirus contenant les shRNA, puis activés avec notre modèle de billes anti-CD3+anti-CD28, ou dans des puits recouverts d'Ac anti-CD3+anti-CD28 pendant 6h, comme le système utilisé dans l'étude précédente (Gorman et al., 2012). On remarque que dans ces deux conditions, il n'y a pas de différence de sécrétion d'IFN- $\gamma$  entre les cellules contrôles et celles exprimant des sh-IQGAP1, voire une sécrétion plus importante dans les sh-IQGAP1 (**Figure 2.17.A**). Ce résultat est identique à celui obtenu par l'équipe de D. Billadeau, et cohérent avec l'augmentation de la signalisation par le TCR mise en évidence précédemment. Les LT ont ensuite été activés avec des DC chargées en sAg, et dans ces conditions plus physiologiques, on observe une diminution de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  en absence d'IQGAP1. Un des co-activateurs importants du TCR est l'intégrine LFA-1 (Hogg et al., 2011). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation par LFA-1 pouvait être altérée dans les LT dont l'expression d'IQGAP1 est diminuée. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'activation des LT en présence de ligands de LFA-1, i.e. des molécules ICAM-1-Fc humain recombinantes. Dans ces conditions de stimulation, on obtient le même profil qu'avec les CPA : les cellules exprimant les sh-IQGAP1 sécrètent moins



**Figure 2.18 : Formation des conjugués entre LT primaires et DC**

Stratégie de gating au FACS. Les LT primaires sont incubés 1h ou 6h avec des DC chargées en sAg à différentes concentrations, marquées avec des Ac anti-CD4 et anti-CD1a et le pourcentage de conjugués est analysé par FACS.

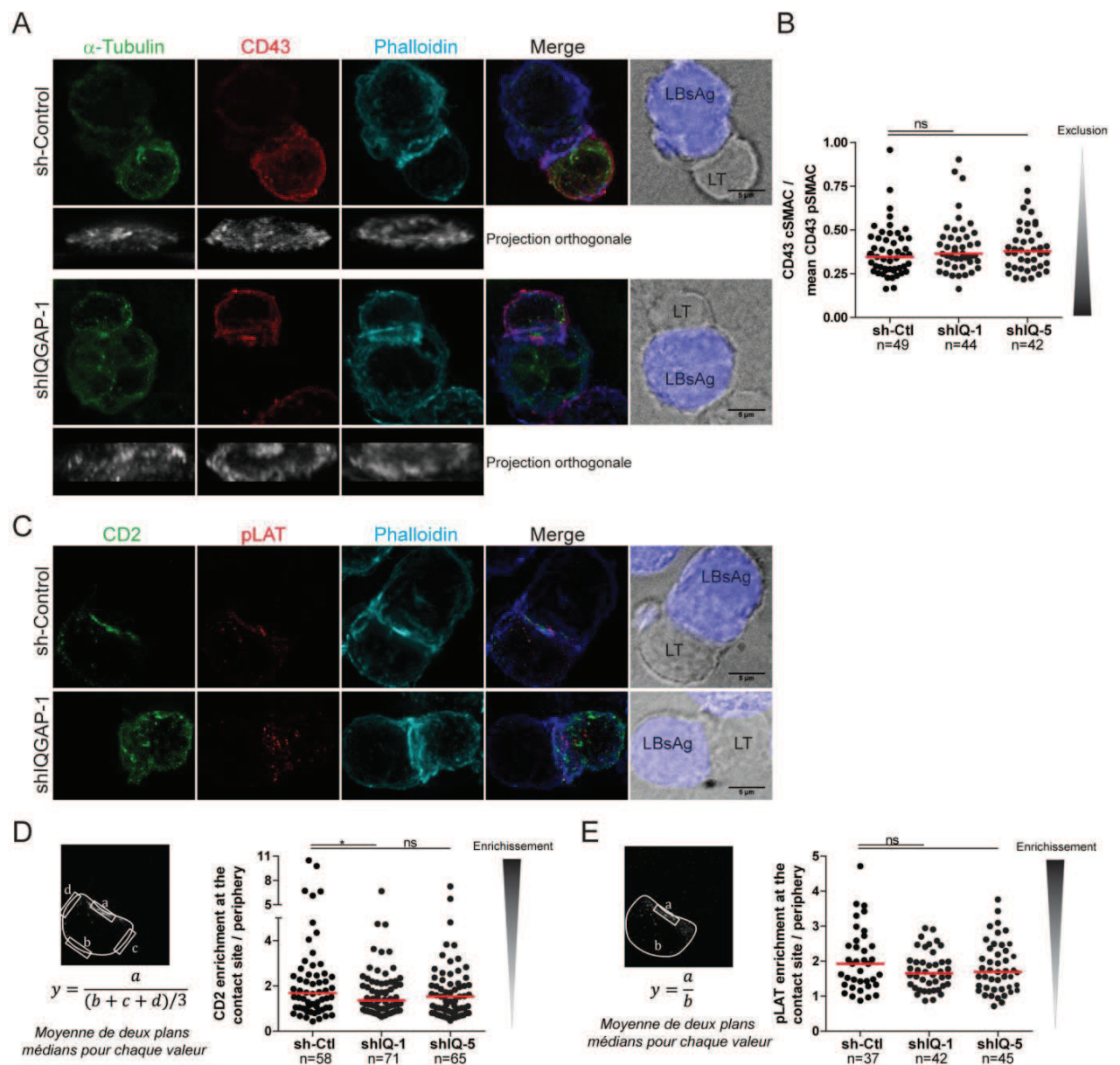
d'IFN- $\gamma$  (**Figure 2.17.A**). La présence d'ICAM-1 induit une augmentation de la sécrétion de cytokines, par les cellules contrôles, mais pas par les cellules exprimant le sh-IQGAP1. Nous reviendrons par la suite sur ce dernier résultat. Les effets observés sur la sécrétion d'IFN- $\gamma$  sont dus à un défaut de production de la cytokine, comme l'attestent les quantifications par PCR quantitative des ARNm IFN- $\gamma$  (**Figure 2.17.B**) et par FACS intracellulaire de la production d'IFN- $\gamma$  (**Figure 2.17.C**). Les résultats sur la sécrétion d'IL-2 par les cellules Jurkat transduites avec les shRNAet activées avec des LB Raji chargés en sAg SEE présentent le même profil d'inhibition de la production d'IL-2 que les cellules primaires avec l'IFN- $\gamma$  en absence d'IQGAP1 (**Figure 2.17.D et E**). Or on avait vu précédemment que les cellules T Jurkat activées avec des CPA présentaient une phosphorylation des protéines de la voie de signalisation du TCR plus importante (**Figure 2.16.B**). L'inhibition de la production d'IL-2 dans les Jurkat ne serait donc pas due à un défaut de signalisation. Il faudra par la suite reproduire ces résultats avec les LT primaires activés avec des CPA, mais on peut raisonnablement supposé que les résultats seront identiques.

On remarquera que les MFI IFN- $\gamma$  et IL-2 obtenues par FACS intracellulaire sont identiques dans les cellules contrôles et sh-IQGAP1, seuls les pourcentages de cellules produisant les cytokines sont altérés. Ceci pourrait refléter un défaut de formation des conjugués. Nous avons donc analysé le pourcentage de conjugués après 1h et 6h de co-culture entre LT primaires et DC chargées en sAg (**Figure 2.18**). Aucun défaut de formation des conjugués n'est mis en évidence dans les cellules exprimant les sh-IQGAP1. Cependant ces expériences nous donnent une information à un temps donné, et même si deux points de cinétique ont été testés ici, ces résultats ne rendent pas compte de la dynamique d'interaction entre LT et DC.

### 2.2.5- IQGAP1 et formation de la synapse

En absence d'IQGAP1, les cellules T produisent moins de cytokines après activation par des CPA, mais pas par anti-CD3+anti-CD28. Ces résultats ne semblent pas dus à un défaut de signalisation après stimulation du TCR, ni à un défaut de formation des conjugués. Nous avons alors analysé la formation de la synapse entre LT et CPA, car une synapse mal organisée pourrait aboutir à des interactions LT-CPA non productives. Les cellules T primaires exprimant les shRNA contrôle ou spécifiques d'IQGAP1 ont donc été activées avec des LB Raji chargés en sAg sur lames pendant 1h. Les LB ont été préférés aux cellules dendritiques car la structure de la synapse est plus facilement analysable dans des conjugués





**Figure 2.19 : Organisation de la synapse entre LT primaires et LB**

Les LT primaires exprimant le shRNA contrôle ou les 2 shRNA spécifiques d'IQGAP1 sont activés sur lames avec des LB Raji chargés en sAg, pendant 1h à 37°C. Les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées avec la phalloïdine et différents Ac permettant de visualiser des protéines localisées au niveau des différents SMAC : anti-CD43 au dSMAC (A)

anti-CD2 et phospho-LAT au cSMAC (C)

(A et C) Les images présentent la projection des différents plans, et les projections orthogonales des zones synaptiques. Barres d'échelle : 5µm.

(B) Quantification de l'exclusion de CD43 au niveau du dSMAC, réalisée avec la même stratégie que pour mesurer l'exclusion de l'actine polymérisée (Figure 2.6.A-D).

(D) Quantification du recrutement de CD2 à la synapse

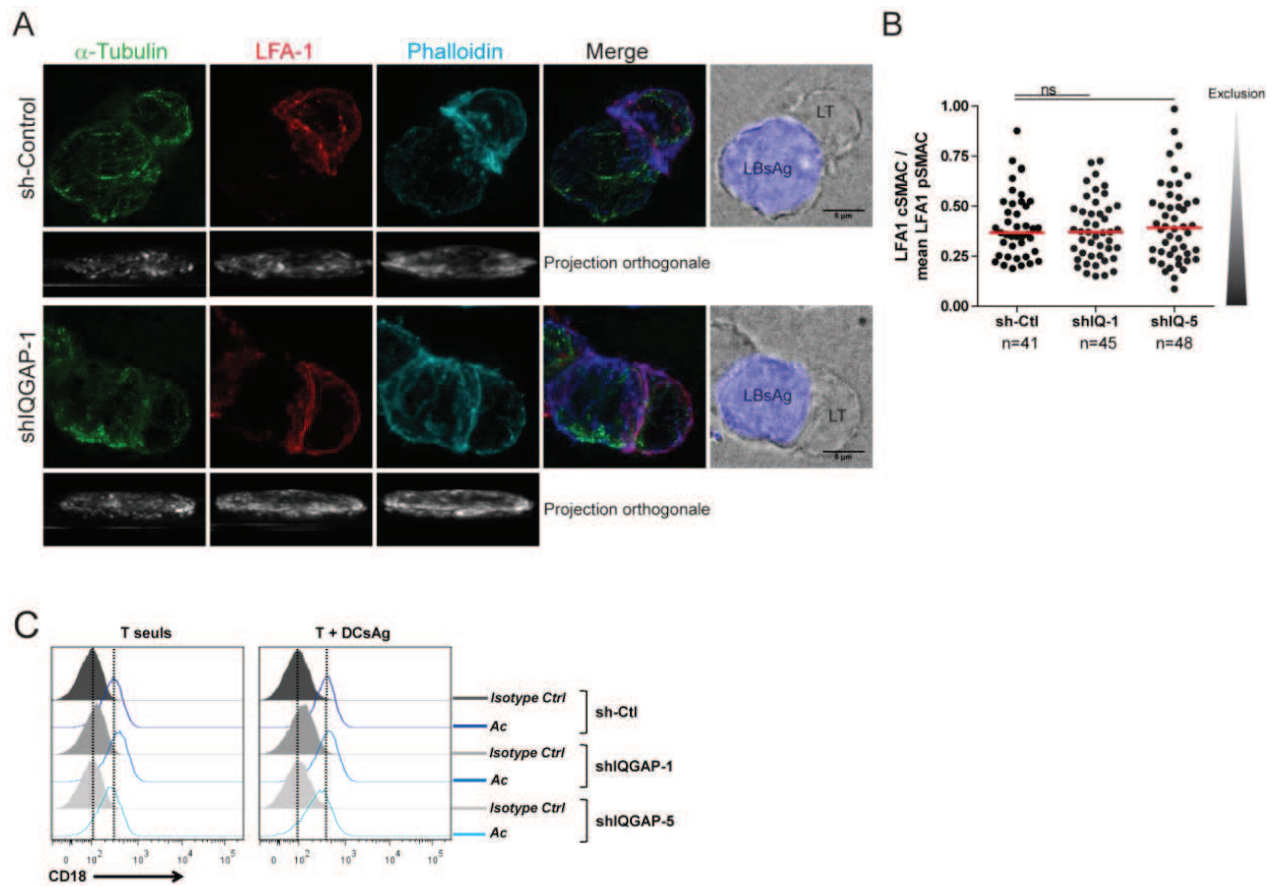
(E) Quantification du recrutement de phospho-LAT à la synapse

LT-LB. Les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec des Ac anti-Tubuline- $\alpha$ , anti-CD43 (pour visualiser le dSMAC) et la phalloïdine (**Figure 2.19.A**). On observe l'actine polymérisée exclue du centre de la synapse, le MTOC polarisé vers la CPA, et CD43 également exclu du cSMAC. Cette exclusion a été quantifiée en suivant la même stratégie que pour l'exclusion de l'actine-F, et on n'observe pas de différence d'exclusion du CD43 en périphérie de la synapse (**Figure 2.19.B**). Ce résultat peut paraître surprenant compte tenu de l'effet d'IQGAP1 sur le remaniement de l'actine, nécessaire à l'exclusion de CD43, cependant nous avons montré que l'absence d'IQGAP1 induisait un fort défaut d'étalement, mais une exclusion peu altérée de l'actine-F à la synapse.

Les cellules ont également été marquées avec des Ac anti-CD2 et anti-phospho-LAT, une protéine d'adhésion membranaire et une protéine de signalisation intracellulaire (respectivement) toutes deux recrutées et enrichies au niveau du cSMAC. On observe sur ces images que CD2 est localisé sur toute la surface membranaire et pas uniquement au niveau de la synapse dans les cellules exprimant les sh-IQGAP1, et bien recruté au centre de la synapse dans les cellules contrôles (**Figure 2.19.C**). Il en est de même pour le marquage phospho-LAT, qui semble plus épars dans les cellules sh-IQGAP1. Le recrutement de ces deux protéines a été quantifié plus finement. CD2 étant une protéine membranaire, l'intensité de fluorescence est mesurée au niveau de la synapse et dans trois autres zones de la cellule T (à l'uropode et sur les bords de la cellule), sur deux plans médians pour chaque zone (**Figure 2.19.D**). Puis le ratio est fait entre la zone synaptique et la moyenne des trois zones qui ne sont pas en contact avec la CPA. Cette quantification indique qu'il semble en effet y avoir un défaut de recrutement de CD2 à la synapse, significatif pour le sh-1. Phospho-LAT étant une protéine intracellulaire, l'intensité de fluorescence est cette fois mesurée à la synapse et dans le reste de la cellule, là encore sur deux plans médians pour chaque zone sélectionnée (**Figure 2.19.E**). Cette fois-ci la quantification met en évidence une tendance, à un enrichissement moins important de phospho-LAT à la synapse entre LB et LT exprimant sh-IQGAP1. L'analyse d'un plus grand nombre de conjugués sera nécessaire pour conclure. Pour ces deux quantifications, les zones de sélection sont toujours identiques pour toutes les cellules analysées.

### 2.2.6- IQGAP1 et LFA-1

Nous avons précédemment mis en évidence que les cellules T activées par des CPA



**Figure 2.20 : Expression et localisation de LFA-1**

(A-B) Les LT primaires exprimant le shRNA contrôle ou les 2 shRNA spécifiques d'IQGAP1 sont activés sur lames avec des LB Raji chargés en sAg, pendant 1h à 37°C. Les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées avec des Ac anti-Tubuline- $\alpha$ , anti-LFA-1 et la phalloïdine.

(A) Les images présentent la projection des différents plans, et les projections orthogonales des zones synaptiques. Barres d'échelle : 5 $\mu$ m.

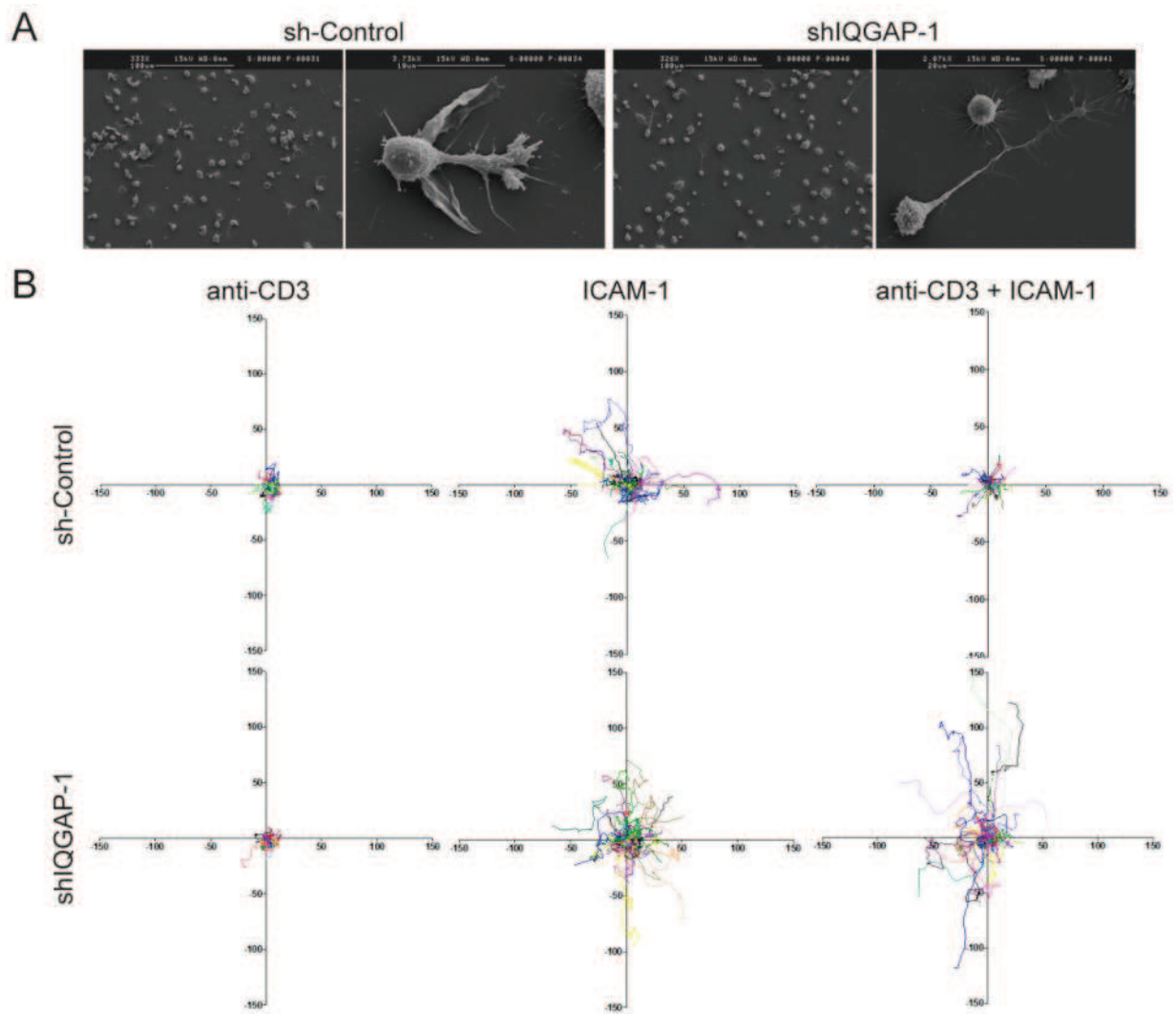
(B) Quantification de l'exclusion de LFA-1 au niveau du pSMAC, réalisée avec la même stratégie que celle utilisée pour l'exclusion de l'actine polymérisée (Figure 2.6.A-D).

(C) Les LT primaires exprimant le shRNA contrôle ou les 2 shRNA spécifiques d'IQGAP1 sont activés pendant 1h à 37°C avec des DC chargées en sAg. Les cellules sont marquées avec des Ac anti-CD4 et anti-CD1a, pour distinguer les LT des DC, et anti-LFA-1 total (CD18). Les cellules sont ensuite analysées par FACS.

produisaient moins d'IFN- $\gamma$  (cellules T primaires) et d'IL-2 (cellules Jurkat) en absence d'IQGAP1, et que la présence d'ICAM-1 sur une surface recouverte d'Ac anti-CD3+anti-CD28 n'augmentait pas l'activation des cellules T. Ces résultats peuvent suggérer qu'en absence d'IQGAP1, les cellules ne reconnaissent pas ICAM-1. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'expression et la localisation de LFA-1 dans les cellules exprimant des shRNAs spécifiques d'IQGAP1. Les LT primaires ont été activés sur lames pendant 1h avec des LB Raji chargés en sAg, et la localisation de LFA-1 a été analysée à la synapse (**Figure 2.20.A**). On observe une exclusion de LFA-1 du centre de la synapse dans les cellules contrôle et sh-IQGAP1. La quantification de cette exclusion est réalisée en utilisant une fois de plus la stratégie de quantification de l'actine (décrite **Figure 2.6.A-D**), et confirme qu'il n'y a pas de défaut de localisation et d'exclusion de LFA-1 à la synapse en absence d'IQGAP1 (**Figure 2.20.B**). L'expression de LFA-1 total est analysée par Facs extracellulaire dans les cellules T primaires exprimant les shRNA (**Figure 2.20.C**). Ces marquages indiquent une expression identique de LFA-1 en présence ou non d'IQGAP1.

L'absence de co-stimulation des cellules T par l'interaction LFA-1/ICAM-1 dans les cellules sh-IQGAP1 (observée **Figure 2.17.A**) n'est donc pas due à un défaut d'expression de LFA-1 ou à une mauvaise réorganisation de LFA-1 à la synapse. Il nous reste maintenant à analyser le changement de conformation de LFA-1, la signalisation en aval de LFA-1, et observer le recrutement de protéines comme la Taline, Rap1 et ADAP, pour comprendre pourquoi les cellules ne sont pas co-activées en présence d'ICAM-1.

L'interaction de LFA-1 avec ses ligands augmente la sensibilité des cellules T aux Ag d'environ 100 fois (Bachmann et al., 1997), et ICAM-1 est nécessaire à la mise en place d'interactions cellulaires stables entre LT et DC, requises pour le développement d'une réponse T mémoire (Scholer et al., 2008). Ces effets sont probablement liés au rôle de LFA-1 dans la formation des synapses immunes stables entre LT et les CPA (Fooksman et al., 2010). Cependant, l'interaction de LFA-1 avec ICAM-1 contrôle également la mobilité des LT, mobilité qui peut jouer un rôle critique dans le « scanning » de l'APC par le LT, avec la balance des signaux « stop and go » entre le TCR et LFA-1 (Dustin, 2004). Afin d'étudier les effets potentiels de l'extinction d'IQGAP1 sur ces phénomènes, nous avons déposé des cellules sur des lames recouvertes d'Ac anti-CD3 et d'ICAM-1 pendant 10min et analysé leur morphologie par microscopie électronique à balayage (**Figure 2.21.A**). On remarque que les cellules sont polarisées, probablement fixées pendant un mouvement, contrairement aux cellules qui s'étalent sur anti-CD3+anti-CD28 (**Figure 2.15.D**). Les cellules semblent



**Figure 2.21 : Mouvements des cellules sur ICAM-1**

(A) Les cellules T primaires transduites avec les shRNA sont activées 10min sur lames recouvertes d'Ac anti-CD3+ICAM-1, et observées par microscopie électronique à balayage.

(B) Analyse du mouvement des cellules T primaires sh-Control et shIQGAP-1 sur des surfaces recouvertes d'anti-CD3, d'ICAM-1 ou d'anti-CD3+ICAM-1 pendant 30min à 37°C (n=104 pour chaque condition). Axes en  $\mu\text{m}$ .

polarisées dans les deux cas, cependant on observe de très longues projections dans les LT exprimant un sh-IQGAP1, ce qui suggère que les cellules n'arrivent pas à se détacher du substrat. Nous avons alors suivi, de façon dynamique pendant 30min à 37°C, les cellules interagissant avec des lames recouvertes d'anti-CD3, ou d'ICAM-1, ou d'anti-CD3+ICAM-1 (**Figure 2.21.B**). On remarque que les cellules sont peu mobiles sur les surfaces recouvertes d'anti-CD3. En revanche les cellules bougent beaucoup sur des surfaces recouvertes d'ICAM-1. ICAM-1 induit donc la mobilité des cellules sh-IQGAP1. Mais lorsque les LT contrôles sont sur anti-CD3+ICAM-1, le signal TCR prend le dessus et les cellules sont peu mobiles. En absence d'IQGAP1, les cellules se comportent comme sur ICAM-1 seul.

Ces résultats ne sont pas simples à interpréter, car ils montrent qu'ICAM-1 induit le mouvement des cellules en absence d'IQGAP1, mais ils suggèrent également un défaut d'arrêt de ces cellules au contact de l'anti-CD3. On peut alors imaginer un déséquilibre de la balance « stop and go » induit par le signal ICAM-1 dans les cellules sh-IQGAP1. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

En résumé, nos résultats indiquent que la molécule IQGAP1 :

- est nécessaire au remodelage de l'actine qui accompagne l'activation par CD3 et CD28
- inhibe la phosphorylation, induite par l'activation de CD3 et CD28, de nombreuses protéines de signalisation (la baisse d'expression d'IQGAP1 est accompagnée d'une phosphorylation exacerbée de protéines de signalisation)
- n'est pas requise pour la production et la sécrétion de cytokines induites par CD3 et CD28
- est en revanche nécessaire à la co-stimulation par LFA-1, qui induit une augmentation de production de cytokines par les LT
- contrôle la mobilité des LT sur des ligands de LFA-1.

Pour tenter d'intégrer ces différents résultats dans un schéma général, on peut proposer l'hypothèse suivante : la molécule IQGAP1 en contrôlant le remodelage de l'actine, contrôle les changements d'avidité ou d'affinité de LFA-1 pour son ligand, modulant ainsi à la fois l'activité co-stimulatrice et de motilité de cette intégrine. Il reste à déterminer si ces défauts sont liés à une augmentation de la signalisation par le TCR. Nous discuterons de cette hypothèse dans la discussion.

## ***DISCUSSION***

---

# 1. Critique des modèles utilisés

---

Dans nos études, nous avons choisi de travailler avec des modèles de LT humains primaires ou avec la lignée Jurkat, infectés par des lentivirus contenant les shRNA spécifiques de Cdc42 ou IQGAP1. Les LT sont activés de différentes façons : avec des CPA (LB Raji ou DC dérivées de monocytes) chargées en sAg, avec des Ac anti-CD3/anti-CD28 solubles, sur lames ou sur billes. Les remaniements du cytosquelette et la localisation des cytokines dans ces LT exprimant les shRNA, ont été analysés par immunofluorescence. Dans cette première partie, nous discuterons de ces différents modèles et techniques, de leurs avantages et inconvénients, et des conséquences que le choix de ces modèles peut avoir sur les résultats obtenus.

## 1.1- Le système lentivirus

Pour inhiber l'expression de Cdc42 et IQGAP1 dans les LT primaires et Jurkat, nous utilisons des lentivirus contenant des shRNAs contrôles ou deux shRNAs spécifiques de Cdc42 ou IQGAP1. Les deux différents shRNAs permettent de confirmer les résultats, d'avoir un effet dose et de diminuer les risques d'effets non spécifiques du shRNA. Ces shRNA contiennent également un gène de résistance à la puromycine, permettant de sélectionner les cellules ayant intégré les shRNA. Pour des approches fonctionnelles, comme les expériences réalisées pour mesurer la sécrétion de cytokines, travailler uniquement avec des cellules exprimant le shRNA est un paramètre très important, même si on ignore le nombre de copies de shRNA ayant été intégrées, et donc le niveau d'inhibition de l'expression de la protéine par cellules. Nous travaillons donc avec une population hétérogène de LT, et seul le niveau moyen d'inhibition de toute la population est évalué par Western-Blot. Le fait que Cdc42 et IQGAP1 soient impliqués dans la prolifération des cellules suggère que l'inhibition de l'expression de ces protéines pourrait affecter la viabilité et la prolifération des cellules. Les cellules avec une inhibition de l'expression de ces protéines presque totale ne survivent probablement pas.

Pour que le shRNA soit intégré par les LT, les cellules doivent être activées et se diviser. Les LT sont donc activés pendant 24h avant infection, et l'activation est maintenue



pendant l'infection et la sélection. Les LT utilisés dans nos expériences sont donc des blastes (à jour 5), et nous n'avons donc jamais étudié les effets des shRNAs sur des cellules au repos ou naïves. Ceci sera à prendre en compte pour les expériences d'analyse de l'expression de la forme affine de LFA-1, car les blastes expriment cette forme de haute affinité au niveau basal, plus fortement que les LT au repos (Hogg et al., 2011). Dans ce cas-là, l'utilisation des siRNA semble préférable car les LT n'ont pas besoin d'être activés, mais les taux de transfection de LT primaires humains avec des siRNA obtenus dans le laboratoire restent, à ce jour, très faibles et la sélection n'est pas possible.

## **1.2- Les modèles d'activation**

### **1.2.1- CPA et superantigènes**

Au cours de ce projet, nous avons utilisé des superantigènes pour induire l'activation des LT par les CPA. Les superantigènes sont des protéines d'origine virale ou bactérienne qui se lient aux molécules de CMH-II et aux domaines V $\beta$  du TCR (Li et al., 1999), et n'ont donc pas besoin de subir le processus d'apprêtement par les CPA comme les Ag peptidiques classiques. Chaque sAg interagit préférentiellement avec certaines familles de V $\beta$  données : le SEE (*Staphylococcus Enterotoxin E*) se lie à la famille V $\beta$ 8, le SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*) se lie à la famille V $\beta$ 3, et le TSST1 (toxin shock syndrom toxin 1) se lie à la famille V $\beta$ 2. Au niveau des molécules du CMH-II, le sAg se fixe préférentiellement à la chaîne  $\beta$  plutôt qu'à la chaîne  $\alpha$ . La liaison du sAg au CMH-II et au TCR entraîne l'activation des LT, avec une spécificité restreinte à la famille V $\beta$  reconnue par le sAg. Cette stimulation massive d'une population polyclonale de LT (de 5 à 20% pour un sAg donné) est intéressante dans le cas d'étude sur des lymphocytes T primaires humains. Dans les expériences avec les LT Jurkat, seul le SEE est utilisé et permet d'activer toute la population lymphocytaire (le SEE se lie préférentiellement au V $\beta$ 8), alors que dans le cas des LT primaires, un cocktail de trois sAg SEE+SEB+TSST1 est utilisé pour charger les CPA, et permet d'activer une partie seulement des LT (environ 40%).

L'utilisation des sAg est donc un modèle intéressant permettant d'activer les LT primaires humains, cependant certaines études ont montré que la signalisation ou l'internalisation du TCR induites par la stimulation du TCR avec les complexes CMH-sAg

n'était pas la même que celle induite par les complexes CMHp. Il a par exemple été montré que l'activation par des CPA chargées en sAg, de LT Jurkat ou primaires humains déficients pour Lck, aboutissait à une production d'IL-2 par activation d'une voie distincte de Lck, activant les protéines G $\alpha$ 11 et la PLC- $\beta$  (Bueno et al., 2006). Contrairement aux LT stimulés avec des complexes CMHp, dont la signalisation passe par Lck (Salmond et al., 2009). La liaison du sAg au TCR seul peut induire l'internalisation du TCR et l'accumulation de TCR-CD3 dans des vésicules endocytiques (Niedergang et al., 1995). L'activation des LT par les sAg permet ainsi d'induire une signalisation plus importante que par des peptides antigéniques, car la signalisation est déclenchée par les TCR stimulés et par des TCR non stimulés, qui sont tous internalisés (Niedergang et al., 1997; Niedergang et al., 1998). L'utilisation des sAg pour l'activation des LT n'est donc pas strictement comparable à celle de peptides antigéniques, mais permet néanmoins une activation massive d'une population hétérogène de LT primaires humains.

### **1.2.2- Ac anti-CD3/anti-CD28**

Nous utilisons également des Ac activateurs anti-CD3/anti-CD28 pour activer les LT. Ces Ac peuvent être soit solubles (Western-Blot), soit couplés à des billes (microscopie), à des puits de plaque 96 (sécrétion et production des cytokines), ou à des lamelles (test d'étalement en microscopie).

#### *1.2.2.1- Sur billes*

L'utilisation des billes recouvertes d'Ac anti-CD3/anti-CD28 permet de mimer une CPA (LB et DC matures), car les LT interagissent avec un objet 3D. Cependant, leur diamètre est de 4 $\mu$ m, donc beaucoup plus petit que celui d'une CPA. Pour différents marquages en microscopie, ces billes permettent de mettre en évidence très distinctement les marqueurs du LT seul, par exemple dans le cas du marquage de l'actine polymérisée. Cela facilite l'analyse des images pour des marqueurs qui sont aussi présents sur les CPA. Les mouvements de la membrane du LT sont comparables à ceux d'un LT interagissant avec un LB, car le LT s'étale sur la bille, jusqu'à ce qu'il l'internalise. En revanche, ces mouvements ne ressemblent pas à ceux d'un LT interagissant avec une DC, car dans ce cas, le LT « n'englobe pas » la CPA comme avec un LB, mais étend juste un petit lamellipode vers la DC. Nous avons observé

qu'un LT pouvait internaliser jusqu'à 4 billes tout en établissant de nouveaux contacts avec une autre bille. Ce phénomène ne s'applique évidemment pas à une CPA, que ce soit un LB ou une DC. Enfin, l'activation des LT ne se fait que par deux récepteurs CD3 et CD28, et ne rend compte ni de la multitude de ligands et co-récepteurs présentés à la surface d'une CPA, ni de leur distribution peut-être inhomogène, ni de leur mobilité à la membrane.

#### *1.2.2.2- Ac solubles*

L'activation des LT Jurkat ou primaires avec des Ac solubles anti-CD3/anti-CD28 a été réalisée pour analyser la phosphorylation des protéines de signalisation en aval du TCR. Dans ce cas-là, seul l'engagement du TCR (et du CD28) est induit, sans prendre en compte le remaniement de l'actine et du cytosquelette de microtubules dans un contexte de synapse établie entre un LT et une CPA. On ne peut donc pas parler dans ces expériences de mouvement des microclusters de signalisation, même s'il apparaît que les molécules de TCR s'agrègent dans une zone particulière de la membrane plasmique (phénomène appelé « capping ») suggérant une compartimentalisation des molécules de surface et donc probablement des molécules de signalisation au niveau intracellulaire (LT activés avec des Ac anti-CD3 « cross-linkés », fixés puis déposés sur lame et observés au microscope, données de C. Hivroz non publiées).

#### *1.2.2.3- Ac fixés sur puits ou lamelles*

Lorsque les LT sont déposés sur une surface recouverte d'Ac activateurs anti-CD3/anti-CD28, les cellules s'étalent au contact des Ac. Ce modèle d'étalement est utilisé très fréquemment pour les analyses d'organisation de la synapse et des mouvements des microclusters comme nous l'avons vu dans l'introduction. Ce modèle permet de mimer une cellule présentatrice et de mieux visualiser ce qui correspond à la zone synaptique sur un support plan. Cependant le mouvement des microclusters a également été analysé sur des bi-couches lipidiques contenant des complexes CMHp et de l'ICAM-1. Dans le premier cas, les microclusters de TCR restent fixes lorsqu'ils interagissent avec les Ac recouvrant la surface. Dans le deuxième cas, les microclusters sont mobiles, et il a ainsi pu être mis en évidence que ces clusters migraient vers le cSMAC où ils étaient internalisés. On ne peut raisonnablement pas imaginer que l'un ou l'autre de ces modèles représentent ce qu'il se passe au niveau

physiologique entre un LT et une CPA. En effet, les molécules transmembranaires, comme les molécules de CMH et d'ICAM-1 présentées par la CPA, sont mobiles à la surface cellulaire, et non fixes, mais elles interagissent généralement avec le cortex d'actine et ne peuvent donc pas diffuser librement à travers la membrane plasmique. Les deux modèles d'Ac fixés et de bi-couches lipidiques ne prennent donc pas en compte la résistance imposée par le cortex d'actine d'une CPA. Une étude intéressante a montré les effets de la fluidité membranaire sur la signalisation par le TCR et la formation de la synapse (Hsu et al., 2012). En faisant varier la composition lipidique d'une bi-couche, les auteurs ont montré que lorsque les molécules de CMH diffusaient librement à la membrane, la signalisation par le TCR était très importante (phosphorylation des résidus tyrosine et concentrations intracellulaires de  $Ca^{2+}$ ). En revanche, lorsque les molécules de CMH étaient très peu mobiles sur la bi-couche lipidique, la formation du cSMAC était retardée et la signalisation était diminuée. Le flux rétrograde d'actine a été observé sur toutes les surfaces, mais l'étalement des LT et la contraction du cytosquelette associée sont plus prononcées sur des membranes mobiles ou fluides. Enfin la dynamique des microclusters de ZAP-70 est plus rapide avec des trajectoires plus longues lorsque les ligands sont plus mobiles, alors que les microclusters de SLP-76 sont relativement insensibles à ce paramètre (Hsu et al., 2012). Ces résultats montrent donc que la diffusion des molécules transmembranaires à la membrane plasmique impacte sur la signalisation et donc la réponse T et suggèrent l'importance de la résistance imposée par le cortex d'actine dans ces processus.

Les analyses de la sécrétion et de la production des cytokines par les LT activés pendant 6h sur des puits recouverts d'Ac anti-CD3/anti-CD28, ne prennent pas non plus en compte la mobilité des cellules T. En effet, les expériences de vidéo-microscopie des LT sur des lames recouvertes d'Ac anti-CD3 ont montré que les cellules ne bougent pas sur la lame et restent fixées aux Ac qu'elles rencontrent lorsqu'elles se déposent sur la lame. Le paradigme synapse versus kinapse (Dustin, 2007) n'est donc pas pris en compte dans ces expériences, et la production des cytokines est analysée dans un contexte d'activation exacerbée des LT, sans que ceux-ci aient besoin de chercher les signaux activateurs, comme lorsqu'ils scannent les CPA dans les ganglions.

### 1.3- L'immunofluorescence

La microscopie a permis de comprendre comment s'organisaient les interactions entre LT et CPA (structure de la synapse, mouvements des microclusters...). Cependant, cet outil est à manipuler avec précaution car de nombreux artefacts et mauvaises interprétations peuvent fausser les résultats et observations. Dans nos projets, nous nous intéressons à la synapse dans un contexte de conjugués LT-CPA ou en utilisant le modèle d'étalement sur lames. Il semblait intéressant ici d'attirer l'attention sur certaines questions et problèmes que nous avons rencontrés au cours de nos études. Tout d'abord on peut se demander ce qui définit un conjugué. En effet, lorsqu'on veut analyser la structure de la synapse entre LT et CPA, il faut tout d'abord faire l'acquisition d'images de conjugués. Il me paraît indispensable de travailler à l'aveugle dans ce type de contexte, il faut donc réfléchir à une stratégie d'acquisition n'induisant pas de biais dans l'analyse ultérieure des images. Ainsi, les images sont choisies avec la lumière blanche la plupart du temps, permettant ainsi de ne pas sélectionner les conjugués en fonction d'un résultat attendu : MTOC déjà polarisé ou bien l'actine polymérisée enrichie à la synapse, ou encore le TCR concentré au cSMAC... Les conjugués sont choisis en considérant un LT au minimum légèrement étalé sur une CPA (LB ou DC), signant une interaction « vraie ». Cette stratégie peut poser problème dans l'analyse de la polarisation du MTOC dans les LT exprimant les sh-IQGAP1. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de cette protéine induisait un défaut d'étalement des LT sur des lames recouvertes d'Ac activateurs. Ainsi, on peut imaginer que les LT déficients pour IQGAP1 s'étaient également moins sur les CPA. Notre stratégie d'acquisition des images induirait alors un biais dans l'analyse, car si les LT exprimant le moins IQGAP1 ne s'étaient pas sur les CPA, alors ils ne seront pas considérés comme des conjugués et ne seront pas analysés. Alors, même si les quantifications de polarisation du MTOC sont réalisées en double aveugle (choix des conjugués en lumière blanche pour l'acquisition et quantification des images par une tierce personne n'ayant pas connaissance des conditions), le défaut potentiel de polarisation du MTOC dans les cellules exprimant le moins IQGAP1 ne pourrait pas être mis en évidence. Pour remédier à ce problème, nous avons prévu de quantifier la position du MTOC dans les LT exprimant le sh-contrôle ou les sh-IQGAP1 avec la technologie Imagemstream, une méthode quantitative alliant les propriétés classiques d'un cytomètre de flux et d'un microscope à fluorescence, et permettant d'analyser un très grand nombre de doublets, sans condition d'étalement. Néanmoins, si on imagine que l'absence

d'expression d'une protéine entraîne un défaut de polymérisation d'actine à la synapse ou d'étalement du LT sur la CPA, un défaut de polarisation du MTOC et d'organisation de la synapse comment définir un conjugué ?

La rigueur et l'intégrité sont également requises lors de l'analyse et de la quantification des images, dans notre cas avec le logiciel ImageJ. C'est pour cette raison que nous cherchons à quantifier nos images en double aveugle par une tierce personne, ou grâce au développement de techniques d'analyses partiellement automatisées, comme nous l'avons fait pour la quantification de l'exclusion d'actine à la synapse. Cette méthode nous a permis de définir le niveau d'exclusion par un chiffre, compris entre 0 et 1, et ainsi d'analyser statistiquement la relevance de l'ensemble de ces valeurs.

## 2. Cytosquelette et sécrétion des cytokines

---

Nous avons montré dans la première partie des résultats que Cdc42 contrôlait le remaniement de l'actine polymérisée à la synapse, permettant son exclusion au niveau du cSMAC. Ce remaniement permet le recrutement et la concentration des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  au centre de la synapse et le relargage de la cytokine vers la CPA. Nous avons également montré que la polarisation du MTOC n'était pas contrôlée par Cdc42 et ne régula pas la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , contrairement aux microtubules qui sont nécessaires à la sécrétion de la cytokine. Dans cette partie, nous discuterons ces différents résultats : le rôle du cytosquelette d'actine et des microtubules dans la sécrétion et l'absence de rôle de la polarisation du MTOC dans la régulation de la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ . Mais nous commencerons par discuter les mécanismes d'activation de Cdc42.

### 2.1- Activation de Cdc42

L'activation de Cdc42 dépend de protéines GEF, comme pour toutes les petites Rho GTPases, permettant l'hydrolyse du GDP en GTP. Dans les LT, l'activation de Cdc42 est régulée par la signalisation en aval du TCR, de CD28, mais aussi de LFA-1.

Cdc42 avait initialement été décrite dans les LT comme une protéine recrutée à l'interface entre LT et CPA dans sa forme active (Cannon et al., 2001). Cependant la localisation précise de Cdc42 sous formes active et inactive à la synapse n'est toujours pas établie. Il serait intéressant de déterminer si Cdc42 est recrutée à la synapse puis y est activée, ou si elle est recrutée directement dans sa forme active. De plus la localisation précise de Cdc42 donnerait des indications sur le mécanisme d'action de Cdc42 sur le remaniement de l'actine, mais nous reviendrons plus bas sur ce point. Cdc42 est-elle recrutée au niveau du pSMAC, du cSMAC, au niveau des clusters de TCR ? Dans notre étude, nous n'avons pas caractérisé cette localisation de Cdc42 et Cdc42-GTP, car les Ac ne fonctionnent pas en immunofluorescence. Néanmoins, nous avons prévu d'utiliser des cellules Jurkat sur-exprimant une construction Cdc42-GFP pour déterminer la dynamique de recrutement de Cdc42 à la synapse entre LT et CPA ou avec le test d'étalement des LT sur des lames recouvertes d'Ac anti-CD3 par vidéo-microscopie.

## 2.2- La polarité du MTOC ne régule pas la sécrétion d'IFN- $\gamma$

Nous avons montré que Cdc42 ne contrôlait pas la polarisation du MTOC à la synapse dans les LT CD4<sup>+</sup>, contrairement à d'autres types cellulaires (Pulecio et al., 2010; Yuseff et al., 2011). Cependant, une analyse dynamique du mouvement et du maintien du MTOC à la synapse avec des LT Jurkat exprimant une construction centrine-GFP en conjugués avec des LB Raji, permettrait de définir si le MTOC est bien stabilisé à la synapse. En effet, les quantifications de la polarisation du MTOC ont été réalisées sur des conjugués 1h et 6h après activation, mais ne rendent pas compte de la dynamique du mouvement du MTOC à la synapse. En effet, il a été décrit que le MTOC subissaient des mouvements légers induisant son ancrage et décrochage à la membrane plasmique au niveau du cSMAC (Huse, 2012), de façon similaire aux mouvements du MTOC décrits dans d'autres types cellulaires comme les LB lors de la capture de l'Ag (Yuseff et al., 2011). Il serait donc intéressant dans notre étude d'analyser plus spécifiquement la stabilisation du MTOC à la synapse.

L'utilisation d'un inhibiteur des PKC atypiques a permis d'inhiber la polarisation du MTOC dans les LT primaires en conjugués avec des billes anti-CD3/anti-CD28 ou avec des DC. Nos expériences ont montré que cette inhibition n'affectait pas la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , cependant la polarité du MTOC n'était pas complètement inhibée (75% d'inhibition avec les DCsAg et 55% avec les billes). L'hypothèse supposant que les LT avec un MTOC polarisé soient responsables de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  n'est donc pas exclue, et des expériences d'effet dose de cet inhibiteur permettraient de la tester. Cependant, il a été montré par l'équipe de S. Valitutti que le MTOC n'était pas non plus impliqué dans le « killing » des cellules cibles par les LT CD8<sup>+</sup> (Wiedemann et al., 2006). En effet, les LT CD8<sup>+</sup> sont capables de recruter et polariser leurs granules cytotoxiques vers plusieurs cibles en même temps, permettant de tuer ces différentes cibles. Ces résultats suggèrent que la polarisation du MTOC n'est pas nécessaire à la sécrétion des granules cytotoxiques et donc à la fonction de « killing » des LT CD8<sup>+</sup>. Ceci a été confirmé récemment par un article de la même équipe, montrant que la sécrétion des granules lytiques précède la polarisation du MTOC (Bertrand et al., 2013). Les résultats montrant que la polarisation du MTOC n'est pas nécessaire à la sécrétion des cytokines par les LT CD4<sup>+</sup> apparaissent confortés par ces résultats, n'excluant pas pour autant le fait que la cellule vers laquelle le MTOC est polarisé reçoive un signal cytokinique plus important.



## 2.3- Rôle des microtubules

Nous avons montré que les microtubules étaient, eux, nécessaires à la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> humains. En effet, l'ajout de colchicine qui dépolymérise les microtubules et donc détruit le réseau, bloque la sécrétion d'IFN- $\gamma$  mais pas la production. De plus, les expériences de vidéo-microscopie permettant de suivre les mouvements de vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  dans les cellules Jurkat déposées sur lames recouvertes d'Ac anti-CD3, suggèrent que ces vésicules migrent le long des microtubules vers le centre de la zone de contact. Ces résultats rappellent une fois de plus, le rôle des microtubules dans le transport des granules cytotoxiques à la synapse entre LT CD8<sup>+</sup> et cellule cible (Stinchcombe et al., 2006). Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier le rôle de la dynéine dans le transport des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  à la synapse, ainsi l'inhibition de l'expression de ce moteur devrait altérer la sécrétion de la cytokine. Des expériences d'immunofluorescence sur des images fixées nous permettraient d'analyser la co-localisation des vésicules, de la dynéine et des microtubules ; et la vidéo-microscopie donnerait une vision dynamique des mouvements respectifs de ces trois acteurs.

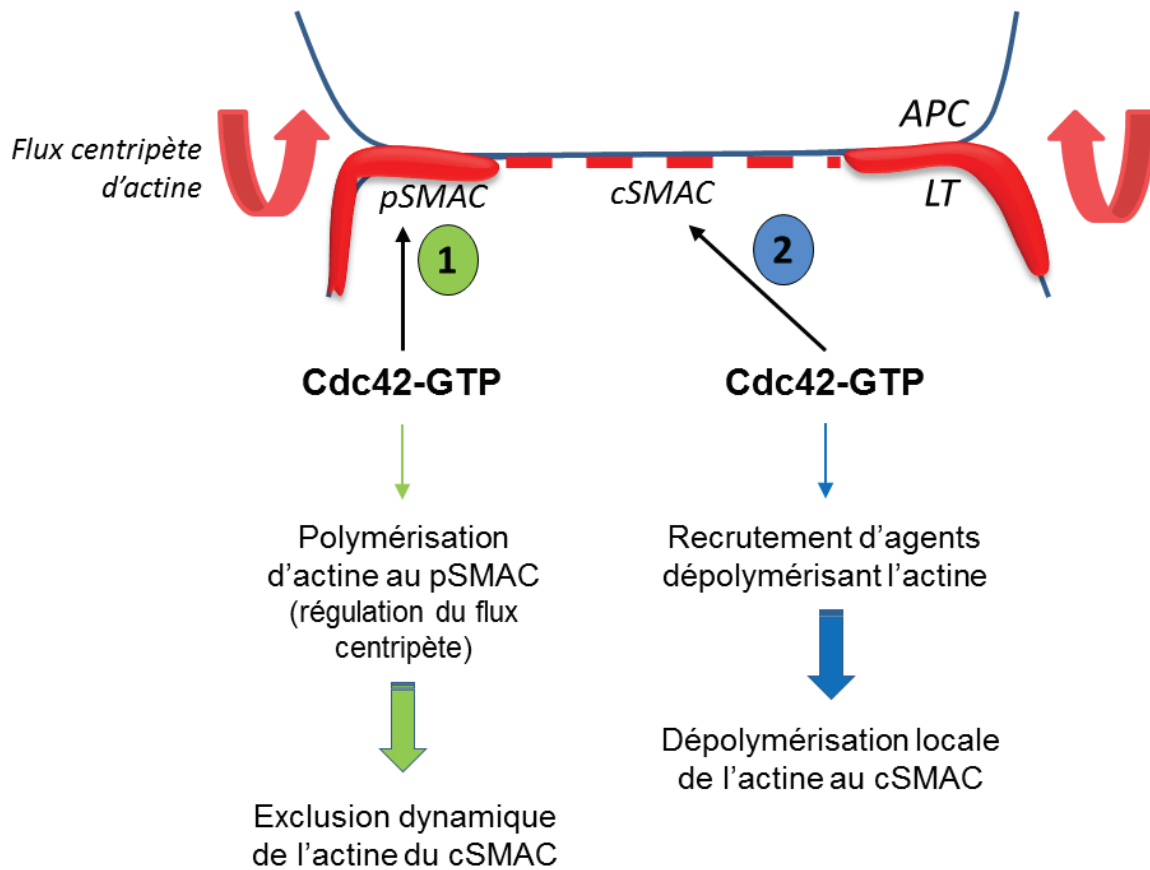
Le traitement des LT avec la colchicine ne bloque pas la production d'IFN- $\gamma$ , suggérant que cette drogue n'affecte pas la signalisation par le TCR. Nous avons même observé une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ . Cette production a été mesurée par cytométrie de flux dans les LT traités avec la colchicine et la brefeldine-A permettant de bloquer la sécrétion de la cytokine. L'analyse, par PCR quantitative, a révélé également une augmentation de la quantité d'ARNm IFN- $\gamma$  dans les LT traités à la colchicine, par rapport aux LT contrôles. Ce résultat n'est pas surprenant car les microtubules ont été décrits comme transportant les microclusters de signalisation à la synapse, or l'inhibition de la migration centripète des microclusters vers le cSMAC augmente la signalisation (Lasserre et al., 2010). Ainsi, le traitement colchicine bloquerait les mouvements des microclusters, induisant une augmentation de l'activation des LT, aboutissant à l'augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ .

## **2.4- Le remodelage de l'actine dans la zone synaptique contrôle la sécrétion d'IFN- $\gamma$**

### **2.4.1- Les vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ sont localisées dans des zones pauvres en actine polymérisée**

Notre étude a permis de montrer que le remaniement de l'actine à la synapse contrôlait le recrutement et la concentration des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  au cSMAC. Des études ultérieures sont venues confirmer, dans d'autres types cellulaires, que les vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  étaient localisées dans des zones libres en actine polymérisée. Ainsi, dans les cellules NK, l'équipe de D. Davis a montré avec de l'imagerie de haute résolution, que les vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ , tout comme les granules lytiques étaient localisés au niveau du cSMAC dans des zones dans lesquelles le réseau d'actine est plus lâche et ouvert (Brown et al., 2012). On peut effectivement imaginer que le réseau d'actine forme une barrière physique empêchant le relargage de cytokines contenues dans les vésicules ou de granules lytiques, néanmoins, les filaments d'actine semblent nécessaires à l'ancrage des vésicules et au relargage de leur contenu. Il a ainsi été montré dans des cellules endothéliales, que les vésicules contenant les chimiokines (CCL12) migraient le long des microtubules pour s'ancrer sur les filaments d'actine juste sous la membrane plasmique (Shulman et al., 2012). L'ancrage de ces vésicules permet la migration trans-endothéliale des LT.

Dans les mastocytes, il a été décrit que la coronine-1 décore et stabilise l'actine, régulant ainsi la sécrétion des cytokines mais pas leur production (Foger et al., 2011). Dans ces cellules par contre, l'actine ne régule pas la sécrétion des cytokines et la dégranulation de la même façon : les mastocytes Coro1<sup>-/-</sup> présentent une augmentation de la dégranulation et une diminution de la sécrétion des cytokines. Ainsi, la coronine-1 qui stabilise l'actine corticale est phosphorylée après activation des mastocytes, induisant son décrochage du cortex d'actine et sa relocalisation dans le cytosol, permettant à nouveau la dynamique de l'actine qui n'est plus stabilisée. Ce mécanisme semble donc distinct de ceux régulant la sécrétion des granules et des cytokines car l'augmentation de la dynamique de l'actine augmente la dégranulation et diminue la sécrétion des cytokines, montrant une fois de plus l'importance de l'actine dans les événements d'ancrage des vésicules à la membrane et du relargage du contenu vésicules dans le milieu extracellulaire. Nos résultats peuvent donc également être interprétés en terme de dynamique de polymérisation et dépolymérisation. Le



**Figure 3.1 : Hypothèses de régulation de l'actine à la synapse par Cdc42**

Hypothèse **1** : Cdc42-GTP est localisé au niveau du pSMAC et régule la polymérisation de l'actine, induisant ainsi les mouvements centripètes de flux d'actine aux bords de la synapse. L'exclusion de l'actine du cSMAC serait donc due à ce flux et régulée de façon mécanique.

Hypothèse **2** : Cdc42-GTP est localisé au niveau du cSMAC et recrute des agents induisant la dépolymérisation locale de l'actine dans cette région de la synapse.

centre du cSMAC, où a lieu la sécrétion de granules et de cytokines, serait un site actif de polymérisation /dépolymérisation nécessaire aux phénomènes d'exocytose.

#### 2.4.2- Cdc42 contrôle le remaniement de l'actine à la synapse

Notre étude a permis de montrer que Cdc42 contrôlait le remaniement de l'actine à la synapse nécessaire au recrutement, à la concentration et à la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  vers la CPA. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le rôle de Cdc42 sur l'actine : soit Cdc42 contrôle la polymérisation de l'actine au niveau du pSMAC régulant la dynamique et le flux centripète d'actine permettant d'exclure de façon mécanique l'actine polymérisée du cSMAC ; soit Cdc42 contrôle le recrutement d'agents dépolymérisant l'actine au niveau du cSMAC. Une expérience simple permettant de donner une indication sur l'une ou l'autre des hypothèses serait d'analyser la localisation de Cdc42 et Cdc42-GTP à la synapse. Si Cdc42-GTP est localisée au niveau du pSMAC, cela favoriserait la première hypothèse, alors qu'un recrutement au cSMAC favoriserait la deuxième (**Figure 3.1**), sachant que l'équipe de C. Wülfing a décrit Cdc42 plutôt au niveau du cSMAC dans les LT CD8<sup>+</sup> (Tskvitaria-Fuller et al., 2006). Comme nous le disions plus haut, nous n'avons pas étudié cette localisation car il n'existe pas d'Ac permettant de marquer Cdc42-GTP. Nous pourrions alors introduire une construction Cdc42-GTP, ou utiliser les sondes Raichu développées par l'équipe de M. Matsuda. Ces sondes permettent de détecter l'activité de Cdc42-GTP à la membrane par FRET (Itoh et al., 2002), et nous permettraient en plus, de savoir si Cdc42 est recrutée à la synapse puis y est activée, ou si la RhoGTPase est déjà sous forme active lorsqu'elle est recrutée.

Une étude récente a suggéré que le remaniement de l'actine nécessaire à la formation de la coupe phagocytaire et à la phagocytose dans les macrophages, était régulé par des protéines de régulation de l'actine (comme Rac1, Cdc42, N-WASp, Arp2/3) qui permettent l'accumulation de l'actine polymérisée au niveau de la coupe, mais surtout par des agents dépolymérisant l'actine qui permettent l'ouverture du réseau d'actine nécessaire à l'internalisation des particules. Ces agents sont recrutés dans des endosomes transportés au niveau du phagosome (Marion et al., 2012). Le parallèle entre l'anneau d'actine formé au niveau de la coupe phagocytaire, ou par les macrophages étalés sur des surfaces activatrices (phagocytose frustrée), et l'anneau d'actine formé par les LT au niveau de la CPA, nous permet d'envisager un mécanisme similaire. Dans le cas de la phagocytose par les

macrophages, le relâchement du réseau d'actine est nécessaire à l'internalisation, et dans le cas de la sécrétion de cytokines par les LT, ce relâchement est nécessaire à l'exocytose d'IFN- $\gamma$ . On pourrait donc imaginer le même mécanisme de recrutement de compartiments intracellulaires qui permettraient un apport de membrane nécessaire à l'étalement des LT sur les CPA et également un apport d'agent dépolymérisant l'actine au niveau du cSMAC.

Cette hypothèse d'agents qui dépolymériseraient l'actine est attrayante car il est difficile d'imaginer que l'actine serait exclue du centre de la synapse uniquement mécaniquement par un flux centripète aux bords de la synapse. D'un autre côté, le rôle de Cdc42 dans la polymérisation de l'actine a été décrit dans de nombreuses études (Stowers et al., 1995; Tskvitaria-Fuller et al., 2006), et il n'est pas exclu que cette polymérisation soit affectée dans les LT exprimant les sh-Cdc42. Nos images de microscopie n'ont pas révélé de différence d'enrichissement d'actine à la synapse dans les LT exprimant les sh-Cdc42 mais une quantification plus approfondie mériterait d'être faite. Néanmoins, le recrutement de WASp à la synapse a été décrit comme indépendant de l'activation de Cdc42 (Cannon et al., 2001), suggérant que l'actine peut être polymérisée à la synapse par WASp en absence de Cdc42. Cette hypothèse de Cdc42 régulant la polymérisation d'actine au pSMAC permettant le flux centripète d'actine, expliquerait que l'actine contrôle également la concentration des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ . Ainsi, ce sont les mouvements de flux qui permettraient d'entraîner les vésicules vers le cSMAC, tout comme les microclusters de TCR. Pour analyser le flux, nous pourrions suivre de façon dynamique le mouvement de l'actine sur des lames recouvertes d'Ac anti-CD3 des Jurkat-actine-GFP exprimant des shRNA spécifiques de Cdc42. On peut noter que ces cellules ne s'étaient pas normalement mais forment de multiples fronts de migration (nos observations). Ces vidéos nous permettraient d'analyser le flux centripète d'actine aux bords de la zone de contact et de le comparer dans des LT exprimant ou non Cdc42.

A la fin de cette étude, il paraissait clair que l'actine et les microtubules contrôlaient la sécrétion d'IFN- $\gamma$  dans les LT CD4<sup>+</sup>. Pour poursuivre la description du mécanisme de sécrétion, nous nous sommes donc intéressés à IQGAP1, un partenaire de Cdc42 qui interagit directement avec l'actine et indirectement avec les microtubules (via CLIP-170). Nous pensions donc pouvoir altérer le lien entre les deux cytosquelettes en inhibant l'expression de cette protéine et aller plus loin dans la compréhension de leur rôle respectif dans la sécrétion

d'IFN- $\gamma$ . Mais, de façon surprenante, l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 dans les LT n'inhibait pas uniquement la sécrétion d'IFN- $\gamma$  mais également sa production. Le projet a donc pris de nouvelles directions et nous nous sommes intéressés à la régulation, par le cytosquelette d'actine, de la signalisation en aval du TCR et des intégrines.

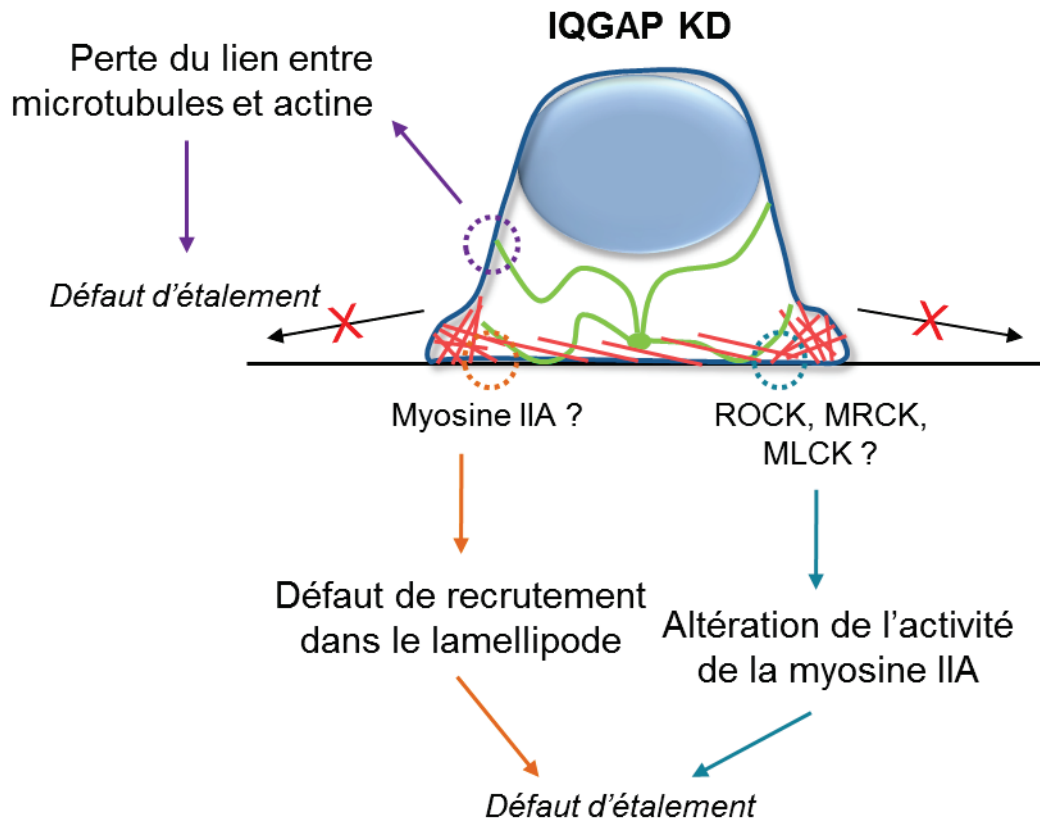
### 3. IQGAP1 contrôle le remaniement de l'actine à la synapse

---

L'étude du rôle d'IQGAP1 dans l'activation des LT nous a permis de mettre en évidence son implication dans le remaniement de l'actine, la signalisation en aval du TCR et de CD28, la co-stimulation par LFA-1 et la mobilité des T sur des ligands de cette intégrine. Cette multiplicité de rôle d'IQGAP1 peut être expliquée par la structure même de la protéine qui contient de nombreux domaines d'interaction avec des protéines aussi variées que Erk1/2, l'actine-F, la calmoduline, Cdc42, CLIP-170... (Voir paragraphe 1.5.2 de l'introduction). Ces domaines pourraient agir comme autant de modules, contrôlant de façon indépendante les divers phénomènes affectés par l'inhibition d'expression d'IQGAP1. Cependant, j'ai fait le choix ici de présenter mon hypothèse de travail : le rôle d'IQGAP1 dans le remodelage de l'actine des LT peut expliquer toutes nos observations. La discussion qui suit, vous présentera les diverses étapes du raisonnement.

#### 3.1- IQGAP1 contrôle le remaniement de l'actine

Les tests d'étalement sur lames recouvertes d'Ac anti-CD3/anti-CD28 ont montré qu'IQGAP1 contrôlait l'étalement des cellules T primaires humaines et Jurkat. L'étude publiée par le groupe de D. Billadeau n'ayant pas fait état de ce défaut d'étalement dans les LT exprimant les sh-IQGAP1 (Gorman et al., 2012), nous avons analysé et quantifié ce défaut à l'aide de différentes techniques : quantification de l'étalement sur des images de microscopie, mesure de l'impédance au cours du temps avec Xcelligence, et analyse de la morphologie des LT étalés par microscopie électronique à balayage. Nous avons ainsi montré que l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 dans les LT induisait un défaut d'étalement des cellules, reflétant un défaut de remaniement de l'actine. Le niveau global de polymérisation de l'actine a été analysé par cytométrie de flux et ne révèle pas de différence entre les LT contrôle et les LT exprimant les sh-IQGAP1. Nous avons alors quantifié l'exclusion de l'actine à la synapse entre LT exprimant le sh-Contrôle ou les sh-IQGAP1, et CPA. Cette quantification a révélé un défaut d'exclusion de l'actine au niveau du cSMAC, significatif pour l'un des deux shRNA. La quantification d'un plus grand nombre d'images révélera certainement une différence significative pour le deuxième sh-IQGAP1 qui présente pour l'instant la même tendance que le premier.



**Figure 3.2 : IQGAP1 et remaniement de l'actine**

Le défaut d'étalement observé dans les cellules exprimant les sh-IQGAP1 pourrait s'expliquer par l'absence d'IQGAP1 qui entraînerait une perte du lien entre microtubules et actine (violet), ou par un défaut de localisation de la myosine IIA au niveau du lamellipode (orange), affectant les mouvements du cortex acto-myosine, ou par un défaut de localisation ou d'activité des kinases ROCK, MRCK et MLCK régulant l'activité de la myosine IIA (bleu).



L'étude menée par l'équipe de D. Billadeau sur les Jurkat exprimant des sh-IQGAP1 décrivait, à défaut d'une altération de l'étalement des cellules, une augmentation du flux d'actine dans le lamellipode formé par les LT étalés sur une surface recouverte d'Ac anti-CD3 (Gorman et al., 2012). Nous n'avons pas quantifié ce phénomène, néanmoins il semble que les LT qui s'étalent peu ou pas, forment tout de même un lamellipode d'actine qui apparaît très dense, que nous avons appelé « spreading frustré ». Si ces données sont confirmées, il se pourrait alors qu'IQGAP1 régule négativement la polymérisation d'actine au niveau du pSMAC. Pourquoi, alors, les cellules ne s'étaleraient-elles pas ? Le fait qu'IQGAP1 se lie à l'actine-F au niveau de son domaine N-ter et indirectement aux microtubules via CLIP-170, fait d'IQGAP1 une protéine de liaison entre les deux cytosquelettes. L'inhibition d'IQGAP-1 entraînerait alors une rupture du lien entre actine et microtubules. Les mouvements du cytosquelette d'actine ne seraient donc pas suivis par les microtubules, empêchant la déformation de la cellule (**Figure 3.2**).

Une autre hypothèse serait que la cellule ne se déforme pas car elle est trop rigide, suggérant un rôle de la myosine IIA. IQGAP1 interagit avec la chaîne légère de la myosine au niveau de son domaine IQ (Weissbach et al., 1998). L'absence d'IQGAP1 pourrait altérer soit le recrutement de la myosine IIA, soit son activation, car une augmentation de l'activité de la myosine augmenterait la contraction acto-myosine et empêcherait le relâchement de la cellule (**Figure 3.2**). Pour tester cette hypothèse, nous commencerons par localiser la myosine IIA dans nos LT étalés sur des lames recouvertes d'Ac, nous permettant d'analyser si le recrutement de la myosine au niveau du lamellipode riche en actine polymérisée est affecté par l'inhibition d'IQGAP1. Nous avons vu dans la partie I de l'introduction que les voies de signalisation du calcium et des RhoGTPases jouaient un rôle majeur dans la régulation de l'activité de la myosine IIA (voir paragraphe 1.1.3). Il serait donc intéressant d'analyser la localisation des kinases ROCK (activée par RhoA), MRCK et MLCK dans nos LT exprimant les sh-contrôle et IQGAP1, ainsi que la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine après activation du TCR. En effet, une augmentation de la phosphorylation de cette chaîne légère rendrait compte d'une plus grande activité de la myosine suggérant une augmentation de la contraction acto-myosine pouvant expliquer le défaut d'étalement des LT en absence d'IQGAP1. De plus, MLCK est activée par le  $Ca^{2+}$  et la calmoduline, interagissant également avec IQGAP1 (Hart et al., 1996). L'augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire favorise l'activité de MLCK et la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Gallagher et al., 1991). Or une expérience préliminaire dans les LT Jurkat exprimant les sh-IQGAP1 a suggéré que les

concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires étaient maintenues anormalement élevées après activation des LT avec des Ac anti-CD3, par rapport aux cellules contrôles (données non publiées). L'analyse plus détaillée de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et de l'activité des kinases nous permettra de déterminer si la contraction acto-myosine est altérée dans les LT exprimant les sh-IQGAP1. Nous pourrions également traiter les LT avec de faibles concentrations de blebbistatine, l'inhibiteur de la myosine IIA, pour analyser l'étalement des cellules T sur les surfaces activatrices, permettant de valider l'hypothèse d'un rôle de la myosine.

Il nous reste donc à comprendre comment le défaut de remaniement de l'actine affecte l'étalement des LT sur des surfaces activatrices en absence d'IQGAP1. Il serait également intéressant d'analyser si ce défaut d'étalement est retrouvé dans un contexte de conjugués. En effet, nous n'avons jusqu'à présent, pas mis en évidence de défaut d'étalement des LT sur les CPA en absence d'IQGAP1. Mais comme discuter plus haut, le choix des conjugués en microscopie induit un biais dans l'analyse de ce paramètre. Il nous faut donc réfléchir à une nouvelle stratégie d'acquisition des images.

Pour analyser la contribution potentielle de certains partenaires d'IQGAP1 dans ce défaut d'étalement (actine-F, Cdc42, myosine IIA, CLIP-170), nous avons obtenu de P. Chavrier à l'institut Curie, des plasmides codant pour des versions d'IQGAP1 mutées dans les différents domaines CHD, IQ, GRD et RGCT. Malheureusement, nous n'avons jamais réussi à transfecter convenablement les cellules Jurkat avec des plasmides de grandes tailles (IQGAP1 a un poids moléculaire de 190kDa. Les taux de transfection obtenus étaient trop faibles pour permettre nos études en travaillant avec ces cellules transfectées de façon transitoire, et nous n'avons pas réussi à établir de lignées stables.

### **3.2- IQGAP1 régule négativement l'activation des LT**

L'inhibition de l'expression d'IQGAP-1 dans les LT humains primaires et Jurkat entraîne une augmentation de la signalisation en aval du TCR et de CD28 et une augmentation de la production des cytokines. Nous avons émis l'hypothèse que ce défaut de régulation de la signalisation était dû au défaut de remaniement de l'actine dans les LT exprimant les sh-IQGAP1.

### 3.2.1- Rôle d'IQGAP1 dans la signalisation en aval du TCR et de CD28

Le cytosquelette d'actine et de microtubules joue un rôle majeur dans les mouvements des microclusters de récepteurs transmembranaires et de protéines de signalisation à la synapse. Notre hypothèse est donc que l'altération du remaniement de l'actine à la synapse en absence d'IQGAP-1 entraînerait un défaut de mouvement des microclusters de signalisation vers le cSMAC, zone d'arrêt de la signalisation, et une augmentation de la phosphorylation des protéines de signalisation. Cette hypothèse est confortée par le fait que la localisation des protéines en périphérie de la synapse (CD43, LFA-1) n'est pas affectée par l'absence d'IQGAP1, alors que la localisation des protéines au cSMAC semble affecter (CD2, phospho-LAT).

Les seules protéines moins phosphorylées dans les LT exprimant les sh-IQGAP1 sont Erk1 et Erk2. Mais ces protéines interagissent directement avec IQGAP1 au niveau du domaine WW (Roy et al., 2004). On peut donc imaginer que l'absence d'IQGAP1 affecte directement le recrutement et/ou l'activation de ces kinases. Il serait intéressant d'analyser la quantité de Erk1/2 totale et non uniquement phosphorylée, dans les lysats de LT activés avec les Ac anti-CD3/anti-CD28, pour savoir si la diminution de la phosphorylation de Erk1/2 est due à un défaut d'expression des kinases. Nous avons également prévu d'analyser la localisation de Erk1/2 en immunofluorescence dans des conjugués LT-CPA, et de quantifier le recrutement à la synapse. L'analyse de l'activation des protéines en aval d'Erk1/2 nous permettrait également de voir si toute la voie MAPK est affectée. Cependant, le fait que la production des cytokines ne soit pas altérée lorsque les LT sont activés avec des Ac anti-CD3/anti-CD28 suggère que l'activation des LT est peu affectée.

L'analyse du mouvement des microclusters de signalisation à la synapse nous permettrait de valider notre hypothèse d'un défaut de recrutement au cSMAC. Mais cette expérience est rendue difficile par le fait que les LT exprimant les sh-IQGAP1 ne s'étalent pas sur les lames activatrices, nous pourrions alors uniquement suivre le mouvement des vésicules dans l'espace formé par le petit lamellipode dans les cellules sh-IQGAP1.

Nous avons donc, dans un premier temps, analysé le recrutement de phospho-LAT à la synapse dans des conjugués LT-Raji-sAg. La quantification de ce recrutement ne présente pas de différence significative entre les cellules exprimant le sh-Contrôle ou les sh-IQGAP1. Pour tenter d'analyser ce recrutement des protéines de signalisation à la synapse avec une technique plus quantitative que l'immunofluorescence, C. Hivroz a développé une stratégie

d'analyse du signalosome (inspiré du protocole de T. Harder (Harder and Kuhn, 2000)) : les cellules Jurkat exprimant les shRNA ont donc été activées avec des billes anti-CD3/anti-CD28 magnétiques pendant 5, 10 et 15min, ou des billes recouvertes d'Ig contrôles (pour le point 0). Les complexes cellules + billes sont lavés, une partie est lysée pour analyser la phosphorylation des différentes protéines de signalisation, appelée « input ». Le reste est passé sur aimant, pour isoler les complexes cellules + billes, et resuspendu en tampon hypertonique contenant du glycerol. Cette étape est suivie de 7 cycles de congélation dans l'azote/décongélation sur glace, et un passage sur aimant afin de retenir uniquement les fragments de membranes attachés aux billes, correspondant donc aux protéines recrutées au site d'activation. Ces échantillons sont appelés « signalosome ». Les lysats sont analysés par Western-Blot, et montrent que le recrutement ne semble pas altéré dans les cellules ayant perdu l'expression d'IQGAP1. Cette expérience préliminaire devra être reproduite, mais on peut conclure de ces résultats que les protéines de signalisation semblent recrutées et forment un signalosome au niveau de la zone de contact entre LT et billes anti-CD3/anti-CD28, en présence ou en absence d'IQGAP1. Cependant, cette expérience ne rend pas compte de la dynamique des clusters à la synapse et de la migration vers le cSMAC. Il faudra donc trouver un moyen d'étudier cette dynamique par vidéo-microscopie ou TIRF microscopie malgré le défaut d'étalement des LT exprimant les sh-IQGAP1. Une fois encore, le rôle de la myosine dans le mouvement des microclusters mériterait d'être étudié, même s'il est toujours controversé, et que certains résultats démontrent que la myosine IIA contrôle la stabilité de la synapse et non le mouvement des microclusters (Babich et al., 2012; Beemiller et al., 2012).

### **3.2.2- Rôle d'IQGAP1 sur la production des cytokines**

Comme nous l'avons mentionné dans la deuxième partie de cette discussion, l'étude d'IQGAP1 a débuté dans le but de poursuivre la description du mécanisme de régulation de la sécrétion des cytokines, pour deux raisons : premièrement nous avons montré que Cdc42 contrôlait le remaniement de l'actine à la synapse nécessaire à la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ , et deuxièmement, IQGAP1 avait été décrit comme une protéine clé de la sécrétion des métalloprotéases par son interaction avec les sous-unités Sec3 et Sec8 du complexe exocyste (Sakurai-Yageta et al., 2008). Malheureusement, nos résultats ont révélé que l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 affectait la production des cytokines, nous empêchant d'analyser le

rôle de cette protéine sur l'étape de sécrétion, nos résultats n'excluent en effet pas que cette étape soit affectée par l'absence d'IQGAP1.

Les défauts de production des cytokines correspondent à une augmentation ou à une inhibition selon le type de stimuli utilisés pour activer les LT. Avec les billes anti-CD3/anti-CD28 ou les Ac couplés aux puits de plaque 96, l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 entraîne plutôt une augmentation de la production de cytokines ; alors que lorsque les LT sont activés par des CPA, l'inhibition de l'expression d'IQGAP1 entraîne une diminution de la production, révélée par cytométrie de flux et PCR quantitative. Nous reviendrons plus bas sur la sécrétion des cytokines par les LT activés avec des CPA. Concernant l'activation avec les Ac, ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par le groupe de D. Billadeau (Gorman et al., 2012). Cette augmentation va avec l'augmentation de la signalisation discutée précédemment. L'augmentation de la phosphorylation des protéines de signalisation en aval du TCR est très importante, et nous aurions pu nous attendre à un effet plus marqué sur les concentrations d'IFN- $\gamma$  détectées dans le surnageant. Mais nous avons également montré que l'absence d'IQGAP1 induisait un défaut d'exclusion de l'actine au niveau du cSMAC. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'un défaut d'exocytose de l'IFN- $\gamma$  s'ajoute à une augmentation de la production de la cytokine, avec le mécanisme révélé dans la première étude (Chemin et al., 2012). Pour tester cette hypothèse, nous pourrions analyser la production des cytokines par marquages intracellulaires et cytométrie de flux en absence de brefeldine-A, pour voir s'il y a une accumulation des cytokines dans les LT exprimant les sh-IQGAP1.

Les premières expériences permettant d'analyser la sécrétion des cytokines dans les LT exprimant le sh-contrôle et les sh-IQGAP1, avaient été réalisées avec des CPA, pour être dans les conditions les plus physiologiques possibles. Elles révélaient une inhibition de l'activation des LT. Ces résultats étaient en contradiction apparente avec ceux publiés récemment par le groupe de D. Billadeau et nos propres résultats sur les LT activés par anti-CD3/anti-CD28, qui montrent une augmentation de l'activation des LT. Nous avons alors cherché à savoir quel signal donné par la CPA était altéré dans les LT n'exprimant pas IQGAP1. L'activation des LT avec des Ac anti-CD3/anti-CD28 et de l'ICAM-1 nous a permis d'émettre l'hypothèse que la différence entre ces deux phénotypes provenait du signal LFA-1.

### **3.3- Rôle d'IQGAP1 sur la signalisation LFA-1**

Les analyses de production des cytokines lorsque les LT sont activés avec des Ac anti-CD3/anti-CD28 et de l'ICAM-1 révèlent que l'absence d'IQGAP1 inhibe l'effet co-stimulateur de la liaison LFA1/ICAM1. Ces résultats peuvent s'expliquer par un défaut d'expression de LFA-1, un défaut de changement de conformation aboutissant à la forme de haute affinité de LFA-1 (signalisation outside-in), par un défaut d'agrégation ou d'avidité de LFA-1, ou par un défaut de signalisation inside-out des intégrines.

#### **3.3.1- Expression des différentes formes de LFA-1**

L'analyse par cytométrie de l'expression de LFA-1 n'a pas révélé de diminution d'expression dans les LT exprimant les sh-IQGAP1 par rapport aux LT contrôles. La quantification de l'exclusion de LFA-1 à la synapse, par microscopie, n'a également pas mis en évidence de défaut de localisation de l'intégrine en absence d'IQGAP1, ce qui pouvait paraître surprenant compte tenu du défaut d'exclusion de l'actine au centre de la synapse. L'expression de la forme de haute affinité de LFA-1 par les LT exprimant les shRNAs contrôle ou spécifiques d'IQGAP1, a été étudiée en utilisant les mAb-24 et NKIL-16 (voir paragraphe 2.3.1.2 de l'introduction). La spécificité de ces Ac a été testée avec des LT Jurkat sur-exprimant la forme affine de LFA-1, et des Jurkat exprimant ou non LFA-1 (données par O. Schwartz, Institut Pasteur, Paris). Ces Ac sont bien spécifiques de la forme affine, malheureusement, les LT que nous utilisons après infection par les lentivirus sont des blastes et non des LT au repos, et le niveau basal d'expression de la forme affine de LFA-1 est très élevé dans ces cellules. Nous n'avons pas observé de différence entre les LT exprimant le sh-Contrôle ou les sh-IQGAP1, mais nous n'avons pas non plus observé d'augmentation du marquage après activation des LT par des CPA. Les résultats sont donc difficilement interprétables. Les différentes lignées Jurkat obtenues de l'équipe d'O. Schwartz (sur-exprimant la forme affine de LFA-1 ou n'exprimant pas du tout LFA-1) pourraient être utilisées pour analyser la production des cytokines dans ces cellules exprimant les sh-IQGAP1. Si l'hypothèse d'un défaut de changement de conformation de LFA-1 est vraie, alors en infectant les LT Jurkat sur-exprimant la forme affine de LFA-1 avec les sh-IQGAP1, nous devrions retrouver une production normale de cytokines par rapport aux LT contrôles. Et en infectant les Jurkat n'exprimant pas du tout LFA-1, nous devrions obtenir des niveaux

similaires de production de cytokines entre LT exprimant le sh-contrôle et LT exprimant les sh-IQGAP1, activés par des CPA ou sur des surfaces recouvertes d'Ac anti-CD3/anti-CD28 + ICAM-1. Il faudrait alors analyser la production d'autres cytokines que l'IFN- $\gamma$ , qui n'est pas exprimé par les Jurkat. Malheureusement, ces cellules doivent être maintenues dans un milieu contenant de la puromycine, nous empêchant de sélectionner les cellules transduites après infection lentivirale. Il faudrait alors utiliser des shRNAs couplés à la GFP pour pouvoir sélectionner les cellules exprimant les shRNA sans utiliser la puromycine.

Nous avons vu dans la partie II de l'introduction, que l'agrégation des molécules de LFA-1, dépendante de l'actine, régulaient son avidité, et jouait donc un rôle sur l'activation de LFA-1 (van Kooyk and Figdor, 2000). Il serait donc tentant d'imaginer que le défaut de remaniement de l'actine induit par l'absence d'IQGAP1 entraîne un défaut d'agrégation des molécules de LFA-1. Cette hypothèse pourrait être testée en utilisant la microscopie de haute résolution permettant d'analyser la taille des clusters de LFA-1 à la surface cellulaire.

Nous n'avons donc pas pour l'instant de données solides concernant un défaut de changement de conformation de LFA-1 ou d'augmentation de l'avidité de l'intégrine.

### **3.3.2- LFA-1 et balance entre migration et stabilisation du contact**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, la liaison de LFA-1 à son ligand permet la migration des LT ainsi qu'un signal de maintien du contact entre LT et CPA après stimulation du TCR. Cette balance entre les signaux « stop and go » dépend de la conformation de LFA-1 régulant son affinité (Hogg et al., 2011). Les analyses du mouvement des LT sur des lames recouvertes d'ICAM-1 +/- anti-CD3 par vidéo-microscopie, nous ont apportés une information importante : les LT exprimant les sh-IQGAP1 migrent normalement sur l'ICAM-1 seul, mais ne stoppent pas sur les surfaces ICAM+anti-CD3, alors que les LT contrôles s'arrêtent sur ces surfaces. Ces résultats indiquent que LFA-1 en conformation intermédiaire est bien exprimé par les LT en absence d'IQGAP1, permettant ainsi la migration des cellules ; et suggèrent que le signal TCR n'induit pas de signal stop. Nous avons donc supposé que la signalisation inside-out des intégrines était altérée dans les LT exprimant les sh-IQGAP1, car le changement de conformation final induit par la signalisation inside-out et la liaison de LFA-1 à son ligand permet l'arrêt des cellules. Ceci n'exclut pas que la signalisation outside-in soit altérée. Nous avons vu dans l'introduction (paragraphe

3.4.1), que la signalisation LFA-1 se fait par la formation d'un complexe composé, entre autres, de la GTPase Rap1, de RapL, de la taline et de la kindline-3. Il nous faudra donc analyser la localisation de Rap1, car les défauts de remaniement de l'actine pourraient affecter le recrutement des vésicules contenant Rap1 au niveau du pSMAC. De plus IQGAP1 interagit directement avec Rap1 au niveau de son domaine IQ (Jeong et al., 2007), le recrutement de Rap1 par IQGAP1 pourrait donc être direct ou *via* l'actine-F. Nous analyserons également, par microscopie, le recrutement d'autres protéines de signalisation LFA-1 comme la taline, la kindline-3, et la formation des complexes de signalisation, dans les LT activés avec des CPA ou sur des surfaces recouvertes d'Ac anti-CD3/anti-CD28 +/- ICAM-1. Nous analyserons également l'activation de Rap1 par Western-Blot avec les lysats de LT exprimant les sh-contrôle ou spécifiques d'IQGAP1, activés avec des Ac anti-CD3/anti-CD28 +/- ICAM-1. Des défauts de recrutement ou d'activation de ces protéines bloqueraient la signalisation de LFA-1 et pourraient expliquer le défaut d'arrêt des LT exprimant les sh-IQGAP1 sur les surfaces recouvertes d'Ac anti-CD3 et d'ICAM-1.

L'analyse des mouvements des LT sur les surfaces recouvertes d'ICAM-1 +/- anti-CD3 par vidéo-microscopie, nous a montré que les LT exprimant les sh-IQGAP1 ne s'arrêtaient pas sur l'anti-CD3 en présence d'ICAM-1. Ceci explique l'absence de co-stimulation de la liaison LFA-1/ICAM-1 mise en évidence par l'analyse de la production des cytokines. Nous étudierons donc par vidéo-microscopie, le mouvement des LT sur des CPA. Deux résultats peuvent être attendus dans les LT exprimant les sh-IQGAP1 : soit les LT scanneront les CPA de façon plus intensive, en formant moins de contacts stables comme observé sur anti-CD3/ICAM-1, car les défauts de remaniement de l'actine affectent la signalisation LFA-1 empêchant l'ouverture de la protéine et la stabilisation du contact ; soit les LT, plus « rigides » interagissent avec les CPA sans s'étaler, les défauts de remaniement de l'actine bloquant la mobilité des cellules et la dissociation des conjugués nécessaires au scanning de plusieurs CPA. Dans les deux cas, l'inhibition de la production des cytokines est attendue (**Figure 3.3**).

Les différentes expériences proposées au cours de cette discussion nous permettront de mettre en évidence le rôle du remaniement de l'actine, contrôlé par IQGAP1, régulant la signalisation en aval du TCR et de LFA-1 nécessaire au scanning des CPA par les LT et à l'activation des LT aboutissant à la production et à la sécrétion des cytokines orchestrant la réponse immunitaire.



# ***BIBLIOGRAPHIE***

---

- Abdul-Manan, N., B. Aghazadeh, G.A. Liu, A. Majumdar, O. Ouerfelli, K.A. Siminovitch, and M.K. Rosen. 1999. Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*. 399:379-383.
- Adelstein, R.S., and M.A. Conti. 1975. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature*. 256:597-598.
- Alarcon, B., D. Mestre, and N. Martinez-Martin. 2011. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology*. 133:420-425.
- Allenspach, E.J., P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A.G. Tesciuba, J.L. Cannon, S.M. Takahashi, R. Morgan, J.K. Burkhardt, and A.I. Sperling. 2001. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity*. 15:739-750.
- Altman, A., and M. Villalba. 2003. Protein kinase C-theta (PKCtheta): it's all about location, location, location. *Immunological reviews*. 192:53-63.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *The Journal of biological chemistry*. 271:20246-20249.
- Ambach, A., J. Saunus, M. Konstandin, S. Wesselborg, S.C. Meuer, and Y. Samstag. 2000. The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *European journal of immunology*. 30:3422-3431.
- Andres-Delgado, L., O.M. Anton, F. Bartolini, A. Ruiz-Saenz, I. Correas, G.G. Gundersen, and M.A. Alonso. 2012. INF2 promotes the formation of deetyrosinated microtubules necessary for centrosome reorientation in T cells. *The Journal of cell biology*. 198:1025-1037.
- Andres-Delgado, L., O.M. Anton, R. Madrid, J.A. Byrne, and M.A. Alonso. 2010. Formin INF2 regulates MAL-mediated transport of Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *Blood*. 116:5919-5929.
- Anton, O., A. Batista, J. Millan, L. Andres-Delgado, R. Puertollano, I. Correas, and M.A. Alonso. 2008. An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 205:3201-3213.
- Arango Duque, G., M. Fukuda, and A. Descoteaux. 2013. Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. *J Immunol*. 190:1737-1745.
- Awasthi, A., A. Samarakoon, H. Chu, R. Kamalakannan, L.A. Quilliam, M. Chrzanoska-Wodnicka, G.C. White, 2nd, and S. Malarkannan. 2010. Rap1b facilitates NK cell functions via IQGAP1-mediated signalosomes. *The Journal of experimental medicine*. 207:1923-1938.
- Azar, G.A., F. Lemaitre, E.A. Robey, and P. Bousso. 2010. Subcellular dynamics of T cell immunological synapses and kinapses in lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:3675-3680.
- Babich, A., S. Li, R.S. O'Connor, M.C. Milone, B.D. Freedman, and J.K. Burkhardt. 2012. F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLCgamma1 signaling during T cell activation. *The Journal of cell biology*. 197:775-787.
- Bach, T.L., W.T. Kerr, Y. Wang, E.M. Bauman, P. Kine, E.L. Whiteman, R.S. Morgan, E.K. Williamson, E.M. Ostap, J.K. Burkhardt, G.A. Koretzky, M.J. Birnbaum, and C.S. Abrams. 2007. PI3K regulates pleckstrin-2 in T-cell cytoskeletal reorganization. *Blood*. 109:1147-1155.
- Bachmann, M.F., M. Barner, and M. Kopf. 1999. CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. *The Journal of experimental medicine*. 190:1383-1392.

- Bachmann, M.F., K. McKall-Faienza, R. Schmits, D. Bouchard, J. Beach, D.E. Speiser, T.W. Mak, and P.S. Ohashi. 1997. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity*. 7:549-557.
- Badour, K., J. Zhang, F. Shi, Y. Leng, M. Collins, and K.A. Siminovitch. 2004. Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation. *The Journal of experimental medicine*. 199:99-112.
- Baker, R.G., C.J. Hsu, D. Lee, M.S. Jordan, J.S. Maltzman, D.A. Hammer, T. Baumgart, and G.A. Koretzky. 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., V.A. Barr, and L.E. Samelson. 2009. Endocytic events in TCR signaling: focus on adapters in microclusters. *Immunological reviews*. 232:84-98.
- Balagopalan, L., E. Sherman, V.A. Barr, and L.E. Samelson. 2011. Imaging techniques for assaying lymphocyte activation in action. *Nature reviews. Immunology*. 11:21-33.
- Banerjee, P.P., R. Pandey, R. Zheng, M.M. Suhoski, L. Monaco-Shawver, and J.S. Orange. 2007. Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *The Journal of experimental medicine*. 204:2305-2320.
- Barda-Saad, M., A. Braiman, R. Titerence, S.C. Bunnell, V.A. Barr, and L.E. Samelson. 2005. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nature immunology*. 6:80-89.
- Bartolini, F., J.B. Moseley, J. Schmoranz, L. Cassimeris, B.L. Goode, and G.G. Gundersen. 2008. The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *The Journal of cell biology*. 181:523-536.
- Bashour, A.M., A.T. Fullerton, M.J. Hart, and G.S. Bloom. 1997. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *The Journal of cell biology*. 137:1555-1566.
- Becart, S., and A. Altman. 2009. SWAP-70-like adapter of T cells: a novel Lck-regulated guanine nucleotide exchange factor coordinating actin cytoskeleton reorganization and Ca<sup>2+</sup> signaling in T cells. *Immunological reviews*. 232:319-333.
- Beemiller, P., J. Jacobelli, and M.F. Krummel. 2012. Integration of the movement of signaling microclusters with cellular motility in immunological synapses. *Nature immunology*. 13:787-795.
- Beemiller, P., and M.F. Krummel. 2010. Mediation of T-cell activation by actin meshworks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a002444.
- Beglova, N., S.C. Blacklow, J. Takagi, and T.A. Springer. 2002. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nature structural biology*. 9:282-287.
- Belkina, N.V., Y. Liu, J.J. Hao, H. Karasuyama, and S. Shaw. 2009. LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:4707-4712.
- Benvenuti, F., C. Lagaudriere-Gesbert, I. Grandjean, C. Jancic, C. Hivroz, A. Trautmann, O. Lantz, and S. Amigorena. 2004. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol*. 172:292-301.
- Bergmeier, W., T. Goerge, H.W. Wang, J.R. Crittenden, A.C. Baldwin, S.M. Cifuni, D.E. Housman, A.M. Graybiel, and D.D. Wagner. 2007. Mice lacking the signaling

- molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *The Journal of clinical investigation*. 117:1699-1707.
- Bertrand, F., M. Esquerre, A.E. Petit, M. Rodrigues, S. Duchez, J. Delon, and S. Valitutti. 2010. Activation of the ancestral polarity regulator protein kinase C zeta at the immunological synapse drives polarization of Th cell secretory machinery toward APCs. *J Immunol*. 185:2887-2894.
- Bertrand, F., S. Muller, K.H. Roh, C. Laurent, L. Dupre, and S. Valitutti. 2013. An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:6073-6078.
- Bi, K., Y. Tanaka, N. Coudronniere, K. Sugie, S. Hong, M.J. van Stipdonk, and A. Altman. 2001. Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nature immunology*. 2:556-563.
- Billadeau, D.D., and J.K. Burkhardt. 2006. Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic*. 7:1451-1460.
- Bivona, T.G., H.H. Wiener, I.M. Ahearn, J. Silletti, V.K. Chiu, and M.R. Philips. 2004. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. *The Journal of cell biology*. 164:461-470.
- Blanchard, N., M. Decraene, K. Yang, F. Miro-Mur, S. Amigorena, and C. Hivroz. 2004. Strong and durable TCR clustering at the T/dendritic cell immune synapse is not required for NFAT activation and IFN-gamma production in human CD4+ T cells. *J Immunol*. 173:3062-3072.
- Blanchard, N., V. Di Bartolo, and C. Hivroz. 2002. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity*. 17:389-399.
- Bonello, G., N. Blanchard, M.C. Montoya, E. Aguado, C. Langlet, H.T. He, S. Nunez-Cruz, M. Malissen, F. Sanchez-Madrid, D. Olive, C. Hivroz, and Y. Collette. 2004. Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *Journal of cell science*. 117:1009-1016.
- Boureaux, A., E. Vignal, S. Faure, and P. Fort. 2007. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Molecular biology and evolution*. 24:203-216.
- Brakebusch, C., and R. Fassler. 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO journal*. 22:2324-2333.
- Brandt, D.T., and R. Grosse. 2007. Get to grips: steering local actin dynamics with IQGAPs. *EMBO reports*. 8:1019-1023.
- Brandt, D.T., S. Marion, G. Griffiths, T. Watanabe, K. Kaibuchi, and R. Grosse. 2007. Dial and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *The Journal of cell biology*. 178:193-200.
- Brill, S., S. Li, C.W. Lyman, D.M. Church, J.J. Wasmuth, L. Weissbach, A. Bernards, and A.J. Snijders. 1996. The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Molecular and cellular biology*. 16:4869-4878.
- Brossard, C., V. Feuillet, A. Schmitt, C. Randriamampita, M. Romao, G. Raposo, and A. Trautmann. 2005. Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *European journal of immunology*. 35:1741-1753.
- Brown, A.C., I.M. Dobbie, J.M. Alakoskela, I. Davis, and D.M. Davis. 2012. Super-resolution imaging of remodeled synaptic actin reveals different synergies between NK cell receptors and integrins. *Blood*. 120:3729-3740.
- Brown, A.C., S. Oddos, I.M. Dobbie, J.M. Alakoskela, R.M. Parton, P. Eissmann, M.A. Neil, C. Dunsby, P.M. French, I. Davis, and D.M. Davis. 2011. Remodelling of cortical

- actin where lytic granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy. *PLoS biology*. 9:e1001152.
- Brown, M.J., J.A. Hallam, E. Colucci-Guyon, and S. Shaw. 2001a. Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J Immunol*. 166:6640-6646.
- Brown, M.J., J.A. Hallam, Y. Liu, K.M. Yamada, and S. Shaw. 2001b. Cutting edge: integration of human T lymphocyte cytoskeleton by the cytolinker plectin. *J Immunol*. 167:641-645.
- Brown, M.J., R. Nijhara, J.A. Hallam, M. Gignac, K.M. Yamada, S.L. Erlandsen, J. Delon, M. Kruhlak, and S. Shaw. 2003. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood*. 102:3890-3899.
- Bruyns, E., A. Marie-Cardine, H. Kirchgessner, K. Sagolla, A. Shevchenko, M. Mann, F. Autschbach, A. Bensussan, S. Meuer, and B. Schraven. 1998. T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *The Journal of experimental medicine*. 188:561-575.
- Bubeck Wardenburg, J., C. Fu, J.K. Jackman, H. Flotow, S.E. Wilkinson, D.H. Williams, R. Johnson, G. Kong, A.C. Chan, and P.R. Findell. 1996. Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *The Journal of biological chemistry*. 271:19641-19644.
- Bueno, C., C.D. Lemke, G. Criado, M.L. Baroja, S.S. Ferguson, A.K. Rahman, C.D. Tsoukas, J.K. McCormick, and J. Madrenas. 2006. Bacterial superantigens bypass Lck-dependent T cell receptor signaling by activating a Galpha11-dependent, PLC-beta-mediated pathway. *Immunity*. 25:67-78.
- Bunnell, S.C., D.I. Hong, J.R. Kardon, T. Yamazaki, C.J. McGlade, V.A. Barr, and L.E. Samelson. 2002. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *The Journal of cell biology*. 158:1263-1275.
- Bunnell, S.C., V. Kapoor, R.P. Tribble, W. Zhang, and L.E. Samelson. 2001. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity*. 14:315-329.
- Bunnell, S.C., A.L. Singer, D.I. Hong, B.H. Jacque, M.S. Jordan, M.C. Seminario, V.A. Barr, G.A. Koretzky, and L.E. Samelson. 2006. Persistence of cooperatively stabilized signaling clusters drives T-cell activation. *Molecular and cellular biology*. 26:7155-7166.
- Burkhardt, J.K., E. Carrizosa, and M.H. Shaffer. 2008. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annual review of immunology*. 26:233-259.
- Burkhardt, J.K., J.M. McIlvain, Jr., M.P. Sheetz, and Y. Argon. 1993. Lytic granules from cytotoxic T cells exhibit kinesin-dependent motility on microtubules in vitro. *Journal of cell science*. 104 ( Pt 1):151-162.
- Butler, B., and J.A. Cooper. 2009. Distinct roles for the actin nucleators Arp2/3 and hDia1 during NK-mediated cytotoxicity. *Current biology : CB*. 19:1886-1896.
- Cai, L., A.M. Makhov, D.A. Schafer, and J.E. Bear. 2008. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell*. 134:828-842.
- Caloca, M.J., P. Delgado, B. Alarcon, and X.R. Bustelo. 2008. Role of chimaerins, a group of Rac-specific GTPase activating proteins, in T-cell receptor signaling. *Cellular signalling*. 20:758-770.
- Campbell, J.J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M.A. Siani, D.A. Thompson, and E.C. Butcher. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*. 279:381-384.

- Campi, G., R. Varma, and M.L. Dustin. 2005. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *The Journal of experimental medicine*. 202:1031-1036.
- Cannon, J.L., and J.K. Burkhardt. 2004. Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol*. 173:1658-1662.
- Cannon, J.L., C.M. Labno, G. Bosco, A. Seth, M.H. McGavin, K.A. Siminovitch, M.K. Rosen, and J.K. Burkhardt. 2001. Wasp recruitment to the T cell:APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity*. 15:249-259.
- Carmo, A.M., D.W. Mason, and A.D. Beyers. 1993. Physical association of the cytoplasmic domain of CD2 with the tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *European journal of immunology*. 23:2196-2201.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of experimental medicine*. 180:1263-1272.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 388:782-787.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of experimental medicine*. 184:747-752.
- Cemerski, S., J. Das, J. Locasale, P. Arnold, E. Giurisato, M.A. Markiewicz, D. Fremont, P.M. Allen, A.K. Chakraborty, and A.S. Shaw. 2007. The stimulatory potency of T cell antigens is influenced by the formation of the immunological synapse. *Immunity*. 26:345-355.
- Chan, C., C.C. Beltzner, and T.D. Pollard. 2009. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Current biology : CB*. 19:537-545.
- Chemin, K., A. Bohineust, S. Dogniaux, M. Turret, S. Guegan, F. Miro, and C. Hivroz. 2012. Cytokine secretion by CD4+ T cells at the immunological synapse requires Cdc42-dependent local actin remodeling but not microtubule organizing center polarity. *J Immunol*. 189:2159-2168.
- Chen, X., D.S. Allan, K. Krzewski, B. Ge, H. Kopcow, and J.L. Strominger. 2006. CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:10346-10351.
- Chesarone, M.A., A.G. DuPage, and B.L. Goode. 2010. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:62-74.
- Choi, C.K., M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L.A. Whitmore, A. Mogilner, and A.R. Horwitz. 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature cell biology*. 10:1039-1050.
- Choudhuri, K., D. Wiseman, M.H. Brown, K. Gould, and P.A. van der Merwe. 2005. T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand. *Nature*. 436:578-582.
- Colon-Franco, J.M., T.S. Gomez, and D.D. Billadeau. 2011. Dynamic remodeling of the actin cytoskeleton by FMNL1gamma is required for structural maintenance of the Golgi complex. *Journal of cell science*. 124:3118-3126.

- Combs, J., S.J. Kim, S. Tan, L.A. Ligon, E.L. Holzbaur, J. Kuhn, and M. Poenie. 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.
- Coudronniere, N., M. Villalba, N. Englund, and A. Altman. 2000. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:3394-3399.
- Cox, E.A., and A. Huttenlocher. 1998. Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microscopy research and technique*. 43:412-419.
- Craig, R., R. Smith, and J. Kendrick-Jones. 1983. Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature*. 302:436-439.
- Crespo, P., K.E. Schuebel, A.A. Ostrom, J.S. Gutkind, and X.R. Bustelo. 1997. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature*. 385:169-172.
- Culley, F.J., M. Johnson, J.H. Evans, S. Kumar, R. Crilly, J. Casasbuenas, T. Schnyder, M. Mehrabi, M.P. Deonarain, D.S. Ushakov, V. Braud, G. Roth, R. Brock, K. Kohler, and D.M. Davis. 2009. Natural killer cell signal integration balances synapse symmetry and migration. *PLoS biology*. 7:e1000159.
- D'Andrea, A., X. Ma, M. Aste-Amezaga, C. Paganin, and G. Trinchieri. 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *The Journal of experimental medicine*. 181:537-546.
- Daniele, T., Y. Hackmann, A.T. Ritter, M. Wenham, S. Booth, G. Bossi, M. Schintler, M. Auer-Grumbach, and G.M. Griffiths. 2011. A role for Rab7 in the movement of secretory granules in cytotoxic T lymphocytes. *Traffic*. 12:902-911.
- Das, V., B. Nal, A. Dujeancourt, M.I. Thoulouze, T. Galli, P. Roux, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2004. Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity*. 20:577-588.
- Davature, S., J. Leignadier, P. Milani, P. Soubeyran, B. Malissen, M. Malissen, A.M. Schmitt-Verhulst, and C. Boyer. 2005. Selective defect in antigen-induced TCR internalization at the immune synapse of CD8 T cells bearing the ZAP-70(Y292F) mutation. *J Immunol*. 175:3140-3149.
- Davis, S.J., and P.A. van der Merwe. 1996. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunology today*. 17:177-187.
- de Saint Basile, G., G. Menasche, and A. Fischer. 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature reviews. Immunology*. 10:568-579.
- del Rio, A., R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J.M. Fernandez, and M.P. Sheetz. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. 323:638-641.
- Dellagi, K., and J.C. Brouet. 1982. Redistribution of intermediate filaments during capping of lymphocyte surface molecules. *Nature*. 298:284-286.
- Delon, J., K. Kaibuchi, and R.N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*. 15:691-701.
- Donnadiou, E., G. Bismuth, and A. Trautmann. 1994. Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Current biology : CB*. 4:584-595.

- Dumont, C., N. Blanchard, V. Di Bartolo, N. Lezot, E. Dufour, S. Jauliac, and C. Hivroz. 2002. TCR/CD3 down-modulation and zeta degradation are regulated by ZAP-70. *J Immunol.* 169:1705-1712.
- Dustin, M.L. 2004. Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity.* 21:305-314.
- Dustin, M.L. 2007. Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. *Current opinion in cell biology.* 19:529-533.
- Dustin, M.L. 2008. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunological reviews.* 221:77-89.
- Dustin, M.L. 2009. Modular design of immunological synapses and kinapses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 1:a002873.
- Dustin, M.L., and J.A. Cooper. 2000. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature immunology.* 1:23-29.
- Dustin, M.L., D.E. Golan, D.M. Zhu, J.M. Miller, W. Meier, E.A. Davies, and P.A. van der Merwe. 1997. Low affinity interaction of human or rat T cell adhesion molecule CD2 with its ligand aligns adhering membranes to achieve high physiological affinity. *The Journal of biological chemistry.* 272:30889-30898.
- Dustin, M.L., M.W. Olszowy, A.D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P.A. van der Merwe, P.M. Allen, and A.S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell.* 94:667-677.
- Dustin, M.L., M.E. Sanders, S. Shaw, and T.A. Springer. 1987. Purified lymphocyte function-associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *The Journal of experimental medicine.* 165:677-692.
- Eddy, R.J., L.M. Pierini, F. Matsumura, and F.R. Maxfield. 2000. Ca<sup>2+</sup>-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *Journal of cell science.* 113 ( Pt 7):1287-1298.
- Ehrlich, L.I., P.J. Ebert, M.F. Krummel, A. Weiss, and M.M. Davis. 2002. Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity.* 17:809-822.
- Eibert, S.M., K.H. Lee, R. Pipkorn, U. Sester, G.H. Wabnitz, T. Giese, S.C. Meuer, and Y. Samstag. 2004. Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:1957-1962.
- Eisenmann, K.M., R.A. West, D. Hildebrand, S.M. Kitchen, J. Peng, R. Sigler, J. Zhang, K.A. Siminovitch, and A.S. Alberts. 2007. T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDial knock-out mice. *The Journal of biological chemistry.* 282:25152-25158.
- Espagnolle, N., D. Depoil, R. Zaru, C. Demeur, E. Champagne, M. Guiraud, and S. Valitutti. 2007. CD2 and TCR synergize for the activation of phospholipase Cgamma1/calcium pathway at the immunological synapse. *International immunology.* 19:239-248.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell.* 106:489-498.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Current opinion in cell biology.* 15:67-72.
- Evans, R., A.C. Lellouch, L. Svensson, A. McDowall, and N. Hogg. 2011. The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes. *Blood.* 117:3331-3342.
- Falasca, M., S.K. Logan, V.P. Lehto, G. Baccante, M.A. Lemmon, and J. Schlessinger. 1998. Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *The EMBO journal.* 17:414-422.



- Faure, S., L.I. Salazar-Fontana, M. Semichon, V.L. Tybulewicz, G. Bismuth, A. Trautmann, R.N. Germain, and J. Delon. 2004. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nature immunology*. 5:272-279.
- Feldmann, J., I. Callebaut, G. Raposo, S. Certain, D. Bacq, C. Dumont, N. Lambert, M. Ouachee-Chardin, G. Chedeville, H. Tamary, V. Minard-Colin, E. Vilmer, S. Blanche, F. Le Deist, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2003. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*. 115:461-473.
- Feske, S., J. Giltnane, R. Dolmetsch, L.M. Staudt, and A. Rao. 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature immunology*. 2:316-324.
- Feske, S., E.Y. Skolnik, and M. Prakriya. 2012. Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature reviews. Immunology*. 12:532-547.
- Filbert, E.L., M. Le Borgne, J. Lin, J.E. Heuser, and A.S. Shaw. 2012. Stathmin regulates microtubule dynamics and microtubule organizing center polarization in activated T cells. *J Immunol*. 188:5421-5427.
- Fischer, A., C. Picard, K. Chemin, S. Dogniaux, F. le Deist, and C. Hivroz. 2010. ZAP70: a master regulator of adaptive immunity. *Seminars in immunopathology*. 32:107-116.
- Fischer, K.D., Y.Y. Kong, H. Nishina, K. Tedford, L.E. Marengere, I. Kozieradzki, T. Sasaki, M. Starr, G. Chan, S. Gardener, M.P. Nghiem, D. Bouchard, M. Barbacid, A. Bernstein, and J.M. Penninger. 1998. Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Current biology : CB*. 8:554-562.
- Foger, N., A. Jenckel, Z. Orinska, K.H. Lee, A.C. Chan, and S. Bulfone-Paus. 2011. Differential regulation of mast cell degranulation versus cytokine secretion by the actin regulatory proteins Coronin1a and Coronin1b. *The Journal of experimental medicine*. 208:1777-1787.
- Foger, N., L. Rangell, D.M. Danilenko, and A.C. Chan. 2006. Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis. *Science*. 313:839-842.
- Fooksman, D.R., S. Vardhana, G. Vasiliver-Shamis, J. Liese, D.A. Blair, J. Waite, C. Sacristan, G.D. Vitoria, A. Zanin-Zhorov, and M.L. Dustin. 2010. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual review of immunology*. 28:79-105.
- Freeman, J.L., A. Abo, and J.D. Lambeth. 1996. Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *The Journal of biological chemistry*. 271:19794-19801.
- Freiberg, B.A., H. Kupfer, W. Maslanik, J. Delli, J. Kappler, D.M. Zaller, and A. Kupfer. 2002. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nature immunology*. 3:911-917.
- Friedman, R.S., P. Beemiller, C.M. Sorensen, J. Jacobelli, and M.F. Krummel. 2010. Real-time analysis of T cell receptors in naive cells in vitro and in vivo reveals flexibility in synapse and signaling dynamics. *The Journal of experimental medicine*. 207:2733-2749.
- Fukata, M., S. Kuroda, K. Fujii, T. Nakamura, I. Shoji, Y. Matsuura, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 1997. Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *The Journal of biological chemistry*. 272:29579-29583.
- Fukata, M., S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itoh, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 1999. Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *The Journal of biological chemistry*. 274:26044-26050.
- Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*. 109:873-885.

- Fung-Leung, W.P. 2011. Phosphoinositide 3-kinase delta (PI3Kdelta) in leukocyte signaling and function. *Cellular signalling*. 23:603-608.
- Gallagher, P.J., B.P. Herring, S.A. Griffin, and J.T. Stull. 1991. Molecular characterization of a mammalian smooth muscle myosin light chain kinase. *The Journal of biological chemistry*. 266:23936-23944.
- Gasman, S., S. Chasserot-Golaz, M. Malacombe, M. Way, and M.F. Bader. 2004. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Molecular biology of the cell*. 15:520-531.
- Geiger, B., D. Rosen, and G. Berke. 1982. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *The Journal of cell biology*. 95:137-143.
- Gerard, A., O. Khan, P. Beemiller, E. Oswald, J. Hu, M. Matloubian, and M.F. Krummel. 2013. Secondary T cell-T cell synaptic interactions drive the differentiation of protective CD8(+) T cells. *Nature immunology*. 14:356-363.
- Ghandour, H., X. Cullere, A. Alvarez, F.W. Luscinikas, and T.N. Mayadas. 2007. Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood*. 110:3682-3690.
- Gil, D., W.W. Schamel, M. Montoya, F. Sanchez-Madrid, and B. Alarcon. 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.
- Giurisato, E., J. Lin, A. Harding, E. Cerutti, M. Cella, R.E. Lewis, M. Colonna, and A.S. Shaw. 2009. The mitogen-activated protein kinase scaffold KSR1 is required for recruitment of extracellular signal-regulated kinase to the immunological synapse. *Molecular and cellular biology*. 29:1554-1564.
- Gomez, T.S., M.J. Hamann, S. McCarney, D.N. Savoy, C.M. Lubking, M.P. Heldebrant, C.M. Labno, D.J. McKean, M.A. McNiven, J.K. Burkhardt, and D.D. Billadeau. 2005. Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nature immunology*. 6:261-270.
- Gomez, T.S., K. Kumar, R.B. Medeiros, Y. Shimizu, P.J. Leibson, and D.D. Billadeau. 2007. Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity*. 26:177-190.
- Gorman, J.A., A. Babich, C.J. Dick, R.A. Schoon, A. Koenig, T.S. Gomez, J.K. Burkhardt, and D.D. Billadeau. 2012. The cytoskeletal adaptor protein IQGAP1 regulates TCR-mediated signaling and filamentous actin dynamics. *J Immunol*. 188:6135-6144.
- Grakoui, A., S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 285:221-227.
- Griffiths, G.M., A. Tsun, and J.C. Stinchcombe. 2010. The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *The Journal of cell biology*. 189:399-406.
- Grigoriev, I., S.M. Gouveia, B. van der Vaart, J. Demmers, J.T. Smyth, S. Honnappa, D. Splinter, M.O. Steinmetz, J.W. Putney, Jr., C.C. Hoogenraad, and A. Akhmanova. 2008. STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Current biology : CB*. 18:177-182.
- Grohmanova, K., D. Schlaepfer, D. Hess, P. Gutierrez, M. Beck, and R. Kroschewski. 2004. Phosphorylation of IQGAP1 modulates its binding to Cdc42, revealing a new type of rho-GTPase regulator. *The Journal of biological chemistry*. 279:48495-48504.
- Gruber, T., N. Thuille, N. Hermann-Kleiter, M. Leitges, and G. Baier. 2005. Protein kinase Cepsilon is dispensable for TCR/CD3-signaling. *Molecular immunology*. 42:305-310.

- Hage, B., K. Meinel, I. Baum, K. Giehl, and A. Menke. 2009. Rac1 activation inhibits E-cadherin-mediated adherens junctions via binding to IQGAP1 in pancreatic carcinoma cells. *Cell communication and signaling : CCS*. 7:23.
- Hakoshima, T., T. Shimizu, and R. Maesaki. 2003. Structural basis of the Rho GTPase signaling. *Journal of biochemistry*. 134:327-331.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 279:509-514.
- Hammer, J.A., 3rd, and J.K. Burkhardt. 2013. Controversy and consensus regarding myosin II function at the immunological synapse. *Current opinion in immunology*.
- Han, J., K. Luby-Phelps, B. Das, X. Shu, Y. Xia, R.D. Mosteller, U.M. Krishna, J.R. Falck, M.A. White, and D. Broek. 1998. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*. 279:558-560.
- Harder, T., and M. Kuhn. 2000. Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. *The Journal of cell biology*. 151:199-208.
- Harding, F.A., J.G. McArthur, J.A. Gross, D.H. Raulet, and J.P. Allison. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 356:607-609.
- Harris, E.S., T.J. Gauvin, E.G. Heimsath, and H.N. Higgs. 2010. Assembly of filopodia by the formin FRL2 (FMNL3). *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67:755-772.
- Harris, S.J., R.V. Parry, J.G. Foster, M.D. Blunt, A. Wang, F. Marelli-Berg, J. Westwick, and S.G. Ward. 2011. Evidence that the lipid phosphatase SHIP-1 regulates T lymphocyte morphology and motility. *J Immunol*. 186:4936-4945.
- Hart, D.N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 90:3245-3287.
- Hart, M.J., M.G. Callow, B. Souza, and P. Polakis. 1996. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *The EMBO journal*. 15:2997-3005.
- Hart, M.J., A. Eva, T. Evans, S.A. Aaronson, and R.A. Cerione. 1991. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature*. 354:311-314.
- Hashimoto-Tane, A., T. Yokosuka, K. Sakata-Sogawa, M. Sakuma, C. Ishihara, M. Tokunaga, and T. Saito. 2011. Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation. *Immunity*. 34:919-931.
- Herda, S., F. Raczkowski, H.W. Mittrucker, G. Willmsky, K. Gerlach, A.A. Kuhl, T. Breiderhoff, T.E. Willnow, B. Dorken, U.E. Hopken, and A. Rehm. 2012. The sorting receptor Sortilin exhibits a dual function in exocytic trafficking of interferon-gamma and granzyme A in T cells. *Immunity*. 37:854-866.
- Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology*. 21:107-137.
- Higashida, C., T. Miyoshi, A. Fujita, F. Ocegüera-Yanez, J. Monypenny, Y. Andou, S. Narumiya, and N. Watanabe. 2004. Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science*. 303:2007-2010.
- Higashida, C., S. Suetsugu, T. Tsuji, J. Monypenny, S. Narumiya, and N. Watanabe. 2008. G-actin regulates rapid induction of actin nucleation by mDia1 to restore cellular actin polymers. *Journal of cell science*. 121:3403-3412.
- Higgs, H.N., and T.D. Pollard. 2001. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annual review of biochemistry*. 70:649-676.
- Hivroz, C., K. Chemin, M. Tourret, and A. Bohineust. 2012. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Critical reviews in immunology*. 32:139-155.

- Ho, Y.D., J.L. Joyal, Z. Li, and D.B. Sacks. 1999. IQGAP1 integrates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and Cdc42 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 274:464-470.
- Hogg, N., M. Laschinger, K. Giles, and A. McDowall. 2003. T-cell integrins: more than just sticking points. *Journal of cell science*. 116:4695-4705.
- Hogg, N., I. Patzak, and F. Willenbrock. 2011. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nature reviews. Immunology*. 11:416-426.
- Holt, O., E. Kanno, G. Bossi, S. Booth, T. Daniele, A. Santoro, M. Arico, C. Saegusa, M. Fukuda, and G.M. Griffiths. 2008. Slp1 and Slp2-a localize to the plasma membrane of CTL and contribute to secretion from the immunological synapse. *Traffic*. 9:446-457.
- Howard, J., and A.A. Hyman. 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*. 422:753-758.
- Hsu, C.J., W.T. Hsieh, A. Waldman, F. Clarke, E.S. Huseby, J.K. Burkhardt, and T. Baumgart. 2012. Ligand mobility modulates immunological synapse formation and T cell activation. *PLoS one*. 7:e32398.
- Huang, Y., and J.K. Burkhardt. 2007. T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms. *Journal of cell science*. 120:723-730.
- Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard, and S. Amigorena. 2004. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nature immunology*. 5:1235-1242.
- Huse, M. 2012. Microtubule-organizing center polarity and the immunological synapse: protein kinase C and beyond. *Frontiers in immunology*. 3:235.
- Huse, M., B.F. Lillemeier, M.S. Kuhns, D.S. Chen, and M.M. Davis. 2006. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nature immunology*. 7:247-255.
- Husson, J., K. Chemin, A. Bohineust, C. Hivroz, and N. Henry. 2011. Force generation upon T cell receptor engagement. *PLoS one*. 6:e19680.
- Hutchings, N.J., N. Clarkson, R. Chalkley, A.N. Barclay, and M.H. Brown. 2003. Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *The Journal of biological chemistry*. 278:22396-22403.
- Ilani, T., G. Vasiliver-Shamis, S. Vardhana, A. Bretscher, and M.L. Dustin. 2009. T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nature immunology*. 10:531-539.
- Irles, C., A. Symons, F. Michel, T.R. Bakker, P.A. van der Merwe, and O. Acuto. 2003. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nature immunology*. 4:189-197.
- Itoh, R.E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Molecular and cellular biology*. 22:6582-6591.
- Jacobelli, J., S.A. Chmura, D.B. Buxton, M.M. Davis, and M.F. Krummel. 2004. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nature immunology*. 5:531-538.
- Jacobelli, J., R.S. Friedman, M.A. Conti, A.M. Lennon-Dumenil, M. Piel, C.M. Sorensen, R.S. Adelstein, and M.F. Krummel. 2010. Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions. *Nature immunology*. 11:953-961.
- James, J.R., and R.D. Vale. 2012. Biophysical mechanism of T-cell receptor triggering in a reconstituted system. *Nature*. 487:64-69.
- Jeong, H.W., Z. Li, M.D. Brown, and D.B. Sacks. 2007. IQGAP1 binds Rap1 and modulates its activity. *The Journal of biological chemistry*. 282:20752-20762.

- Ji, Q.S., G.E. Winnier, K.D. Niswender, D. Horstman, R. Wisdom, M.A. Magnuson, and G. Carpenter. 1997. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:2999-3003.
- Jordan, M.S., and G.A. Koretzky. 2010. Coordination of receptor signaling in multiple hematopoietic cell lineages by the adaptor protein SLP-76. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a002501.
- Joyal, J.L., R.S. Annan, Y.D. Ho, M.E. Huddleston, S.A. Carr, M.J. Hart, and D.B. Sacks. 1997. Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry*. 272:15419-15425.
- Kaizuka, Y., A.D. Douglass, R. Varma, M.L. Dustin, and R.D. Vale. 2007. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:20296-20301.
- Kamata, T., K.K. Tieu, T. Tarui, W. Puzon-McLaughlin, N. Hogg, and Y. Takada. 2002. The role of the CPNKEKEC sequence in the beta(2) subunit I domain in regulation of integrin alpha(L)beta(2) (LFA-1). *J Immunol*. 168:2296-2301.
- Kandula, S., and C. Abraham. 2004. LFA-1 on CD4+ T cells is required for optimal antigen-dependent activation in vivo. *J Immunol*. 173:4443-4451.
- Kanwar, N., and J.A. Wilkins. 2011. IQGAP1 involvement in MTOC and granule polarization in NK-cell cytotoxicity. *European journal of immunology*. 41:2763-2773.
- Katagiri, K., M. Hattori, N. Minato, S. Irie, K. Takatsu, and T. Kinashi. 2000. Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Molecular and cellular biology*. 20:1956-1969.
- Katagiri, K., M. Shimonaka, and T. Kinashi. 2004. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *The Journal of biological chemistry*. 279:11875-11881.
- Kim, A.S., L.T. Kakalis, N. Abdul-Manan, G.A. Liu, and M.K. Rosen. 2000. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*. 404:151-158.
- Kovar, D.R., E.S. Harris, R. Mahaffy, H.N. Higgs, and T.D. Pollard. 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*. 124:423-435.
- Krause, M., A.S. Sechi, M. Konradt, D. Monner, F.B. Gertler, and J. Wehland. 2000. Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *The Journal of cell biology*. 149:181-194.
- Kuhn, J.R., and M. Poenie. 2002. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity*. 16:111-121.
- Kumari, S., S. Vardhana, M. Cammer, S. Curado, L. Santos, M.P. Sheetz, and M.L. Dustin. 2012. T Lymphocyte Myosin IIA is Required for Maturation of the Immunological Synapse. *Frontiers in immunology*. 3:230.
- Kupfer, A., and G. Dennert. 1984. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol*. 133:2762-2766.
- Kupfer, A., G. Dennert, and S.J. Singer. 1983. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80:7224-7228.

- Kupfer, A., G. Dennert, and S.J. Singer. 1985. The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *The Journal of molecular and cellular immunology : JMCI*. 2:37-49.
- Kupfer, A., T.R. Mosmann, and H. Kupfer. 1991. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:775-779.
- Kupfer, A., S.J. Singer, C.A. Janeway, Jr., and S.L. Swain. 1987. Co-clustering of CD4 (L3T4) molecule with the T-cell receptor is induced by specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84:5888-5892.
- Kupfer, H., C.R. Monks, and A. Kupfer. 1994. Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *The Journal of experimental medicine*. 179:1507-1515.
- Kuroda, S., M. Fukata, K. Kobayashi, M. Nakafuku, N. Nomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *The Journal of biological chemistry*. 271:23363-23367.
- Kuroda, S., M. Fukata, M. Nakagawa, K. Fujii, T. Nakamura, T. Ookubo, I. Izawa, T. Nagase, N. Nomura, H. Tani, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, and K. Kaibuchi. 1998. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science*. 281:832-835.
- Kurowska, M., N. Goudin, N.T. Nehme, M. Court, J. Garin, A. Fischer, G. de Saint Basile, and G. Menasche. 2012. Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood*. 119:3879-3889.
- Labno, C.M., C.M. Lewis, D. You, D.W. Leung, A. Takesono, N. Kamberos, A. Seth, L.D. Finkelstein, M.K. Rosen, P.L. Schwartzberg, and J.K. Burkhardt. 2003. Itk functions to control actin polymerization at the immune synapse through localized activation of Cdc42 and WASP. *Current biology : CB*. 13:1619-1624.
- Lacy, P., and J.L. Stow. 2011. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood*. 118:9-18.
- Lappalainen, P., and D.G. Drubin. 1997. Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature*. 388:78-82.
- Lasserre, R., and A. Alcover. 2010. Cytoskeletal cross-talk in the control of T cell antigen receptor signaling. *FEBS letters*. 584:4845-4850.
- Lasserre, R., S. Charrin, C. Cuhe, A. Danckaert, M.I. Thoulouze, F. de Chaumont, T. Duong, N. Perrault, N. Varin-Blank, J.C. Olivo-Marin, S. Etienne-Manneville, M. Arpin, V. Di Bartolo, and A. Alcover. 2010. Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *The EMBO journal*. 29:2301-2314.
- Lauritsen, J.P., M.D. Christensen, J. Dietrich, J. Kastrup, N. Odum, and C. Geisler. 1998. Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J Immunol*. 161:260-267.
- Lawson, M.A., and F.R. Maxfield. 1995. Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature*. 377:75-79.
- Le Clainche, C., D. Schlaepfer, A. Ferrari, M. Klingauf, K. Grohmanova, A. Veligodskiy, D. Didry, D. Le, C. Egile, M.F. Carlier, and R. Kroschewski. 2007. IQGAP1 stimulates actin assembly through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *The Journal of biological chemistry*. 282:426-435.

- Lee, K.H., A.R. Dinner, C. Tu, G. Campi, S. Raychaudhuri, R. Varma, T.N. Sims, W.R. Burack, H. Wu, J. Wang, O. Kanagawa, M. Markiewicz, P.M. Allen, M.L. Dustin, A.K. Chakraborty, and A.S. Shaw. 2003. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*. 302:1218-1222.
- Lewkowicz, E., F. Herit, C. Le Clainche, P. Bourdoncle, F. Perez, and F. Niedergang. 2008. The microtubule-binding protein CLIP-170 coordinates mDia1 and actin reorganization during CR3-mediated phagocytosis. *The Journal of cell biology*. 183:1287-1298.
- Ley, S.C., M. Marsh, C.R. Bebbington, K. Proudfoot, and P. Jordan. 1994. Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *The Journal of cell biology*. 125:639-649.
- Li, H., A. Llera, E.L. Malchiodi, and R.A. Mariuzza. 1999. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annual review of immunology*. 17:435-466.
- Li, S., Q. Wang, A. Chakladar, R.T. Bronson, and A. Bernards. 2000. Gastric hyperplasia in mice lacking the putative Cdc42 effector IQGAP1. *Molecular and cellular biology*. 20:697-701.
- Li, Z., D.E. McNulty, K.J. Marler, L. Lim, C. Hall, R.S. Annan, and D.B. Sacks. 2005. IQGAP1 promotes neurite outgrowth in a phosphorylation-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 280:13871-13878.
- Low, P.C., R. Misaki, K. Schroder, A.C. Stanley, M.J. Sweet, R.D. Teasdale, B. Vanhaesebroeck, F.A. Meunier, T. Taguchi, and J.L. Stow. 2010. Phosphoinositide 3-kinase delta regulates membrane fission of Golgi carriers for selective cytokine secretion. *The Journal of cell biology*. 190:1053-1065.
- Lowin-Kropf, B., V.S. Shapiro, and A. Weiss. 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *The Journal of cell biology*. 140:861-871.
- Ludford-Menting, M.J., J. Oliaro, F. Sacirbegovic, E.T. Cheah, N. Pedersen, S.J. Thomas, A. Pasam, R. Iazzolino, L.E. Dow, N.J. Waterhouse, A. Murphy, S. Ellis, M.J. Smyth, M.H. Kershaw, P.K. Darcy, P.O. Humbert, and S.M. Russell. 2005. A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity*. 22:737-748.
- Lue, R.A., E. Brandin, E.P. Chan, and D. Branton. 1996. Two independent domains of hDlg are sufficient for subcellular targeting: the PDZ1-2 conformational unit and an alternatively spliced domain. *The Journal of cell biology*. 135:1125-1137.
- Ma, X., J.M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S.F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri. 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *The Journal of experimental medicine*. 183:147-157.
- Mace, E.M., W.W. Wu, T. Ho, S.S. Mann, H.T. Hsu, and J.S. Orange. 2012. NK cell lytic granules are highly motile at the immunological synapse and require F-actin for post-degranulation persistence. *J Immunol*. 189:4870-4880.
- Machesky, L.M., R.D. Mullins, H.N. Higgs, D.A. Kaiser, L. Blanchoin, R.C. May, M.E. Hall, and T.D. Pollard. 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:3739-3744.
- Madaule, P., and R. Axel. 1985. A novel ras-related gene family. *Cell*. 41:31-40.
- Marion, S., J. Mazzolini, F. Herit, P. Bourdoncle, N. Kambou-Pene, S. Hailfinger, M. Sachse, J. Ruland, A. Benmerah, A. Echard, M. Thome, and F. Niedergang. 2012. The NF-kappaB signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles. *Developmental cell*. 23:954-967.

- Marsland, B.J., and M. Kopf. 2008. T-cell fate and function: PKC-theta and beyond. *Trends in immunology*. 29:179-185.
- Martin-Cofreces, N.B., F. Baixauli, M.J. Lopez, D. Gil, A. Monjas, B. Alarcon, and F. Sanchez-Madrid. 2012. End-binding protein 1 controls signal propagation from the T cell receptor. *The EMBO journal*. 31:4140-4152.
- Martin-Cofreces, N.B., J. Robles-Valero, J.R. Cabrero, M. Mittelbrunn, M. Gordon-Alonso, C.H. Sung, B. Alarcon, J. Vazquez, and F. Sanchez-Madrid. 2008. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *The Journal of cell biology*. 182:951-962.
- Mbele, G.O., J.C. Deloulme, B.J. Gentil, C. Delphin, M. Ferro, J. Garin, M. Takahashi, and J. Baudier. 2002. The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *The Journal of biological chemistry*. 277:49998-50007.
- McGavin, M.K., K. Badour, L.A. Hardy, T.J. Kubiseski, J. Zhang, and K.A. Siminovitch. 2001. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *The Journal of experimental medicine*. 194:1777-1787.
- Melkonian, K.A., K.C. Maier, J.E. Godfrey, M. Rodgers, and T.A. Schroer. 2007. Mechanism of dynamitin-mediated disruption of dynactin. *The Journal of biological chemistry*. 282:19355-19364.
- Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*. 427:154-159.
- Menasche, G., M.M. Menager, J.M. Lefebvre, E. Deutsch, R. Athman, N. Lambert, N. Mahlaoui, M. Court, J. Garin, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2008. A newly identified isoform of Slp2a associates with Rab27a in cytotoxic T cells and participates to cytotoxic granule secretion. *Blood*. 112:5052-5062.
- Menasche, G., E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulffraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, and G. de Saint Basile. 2000. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nature genetics*. 25:173-176.
- Mentlik, A.N., K.B. Sanborn, E.L. Holzbaur, and J.S. Orange. 2010. Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytolytic commitment. *Molecular biology of the cell*. 21:2241-2256.
- Micaroni, M., A.C. Stanley, T. Khromykh, J. Venturato, C.X. Wong, J.P. Lim, B.J. Marsh, B. Storrie, P.A. Gleeson, and J.L. Stow. 2013. Rab6a/a' are important Golgi regulators of pro-inflammatory TNF secretion in macrophages. *PloS one*. 8:e57034.
- Michaelson, D., J. Silletti, G. Murphy, P. D'Eustachio, M. Rush, and M.R. Philips. 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *The Journal of cell biology*. 152:111-126.
- Michiels, F., J.C. Stam, P.L. Hordijk, R.A. van der Kammen, L. Ruuls-Van Stalle, C.A. Feltkamp, and J.G. Collard. 1997. Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *The Journal of cell biology*. 137:387-398.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. 1998. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *The EMBO journal*. 17:6932-6941.
- Miller, M.J., O. Safrina, I. Parker, and M.D. Cahalan. 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*. 200:847-856.



- Miro, F., C. Nobile, N. Blanchard, M. Lind, O. Filipe-Santos, C. Fieschi, A. Chappier, G. Vogt, L. de Beaucoudrey, D.S. Kumararatne, F. Le Deist, J.L. Casanova, S. Amigorena, and C. Hivroz. 2006. T cell-dependent activation of dendritic cells requires IL-12 and IFN-gamma signaling in T cells. *J Immunol.* 177:3625-3634.
- Miserey-Lenkei, S., G. Chalancon, S. Bardin, E. Formstecher, B. Goud, and A. Echard. 2010. Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nature cell biology.* 12:645-654.
- Monks, C.R., B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 395:82-86.
- Monks, C.R., H. Kupfer, I. Tamir, A. Barlow, and A. Kupfer. 1997. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature.* 385:83-86.
- Mor, A., J.P. Wynne, I.M. Ahearn, M.L. Dustin, G. Du, and M.R. Philips. 2009. Phospholipase D1 regulates lymphocyte adhesion via upregulation of Rap1 at the plasma membrane. *Molecular and cellular biology.* 29:3297-3306.
- Morales-Tirado, V., S. Johansson, E. Hanson, A. Howell, J. Zhang, K.A. Siminovitch, and D.J. Fowell. 2004. Cutting edge: selective requirement for the Wiskott-Aldrich syndrome protein in cytokine, but not chemokine, secretion by CD4+ T cells. *J Immunol.* 173:726-730.
- Moreau, H.D., F. Lemaitre, E. Terriac, G. Azar, M. Piel, A.M. Lennon-Dumenil, and P. Bousso. 2012. Dynamic in situ cytometry uncovers T cell receptor signaling during immunological synapses and kinapses in vivo. *Immunity.* 37:351-363.
- Mossman, K.D., G. Campi, J.T. Groves, and M.L. Dustin. 2005. Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science.* 310:1191-1193.
- Muller, A.J., O. Filipe-Santos, G. Eberl, T. Aebischer, G.F. Spath, and P. Bousso. 2012. CD4+ T cells rely on a cytokine gradient to control intracellular pathogens beyond sites of antigen presentation. *Immunity.* 37:147-157.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95:6181-6186.
- Murata, S., T. Tanaka, and M. Miyasaka. 2002. Lymphocyte binding to MAdCAM-1 via alpha4beta7 integrin activates a signal transduction pathway involving tyrosine phosphorylation of paxillin and p105(Cas-L). *Immunology letters.* 81:223-228.
- Murray, R.Z., J.G. Kay, D.G. Sangermani, and J.L. Stow. 2005. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science.* 310:1492-1495.
- Nakhaei-Nejad, M., Q.X. Zhang, and A.G. Murray. 2010. Endothelial IQGAP1 regulates efficient lymphocyte transendothelial migration. *European journal of immunology.* 40:204-213.
- Neel, N.F., J. Sai, A.J. Ham, T. Sobolik-Delmaire, R.L. Mernaugh, and A. Richmond. 2011. IQGAP1 is a novel CXCR2-interacting protein and essential component of the "chemosynapse". *PloS one.* 6:e23813.
- Negulescu, P.A., T.B. Krasieva, A. Khan, H.H. Kerschbaum, and M.D. Cahalan. 1996. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity.* 4:421-430.
- Nelson, W.J. 2003. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature.* 422:766-774.
- Nesic, D., S. Henderson, and S. Vukmanovic. 1998. Prevention of antigen-induced microtubule organizing center reorientation in cytotoxic T cells by modulation of protein kinase C activity. *International immunology.* 10:1741-1746.
- Newton, A.C. 2010. Protein kinase C: poised to signal. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 298:E395-402.

- Nicholson-Dykstra, S.M., and H.N. Higgs. 2008. Arp2 depletion inhibits sheet-like protrusions but not linear protrusions of fibroblasts and lymphocytes. *Cell motility and the cytoskeleton*. 65:904-922.
- Niedergang, F., A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 1997. Peptide antigen or superantigen-induced down-regulation of TCRs involves both stimulated and unstimulated receptors. *J Immunol*. 159:1703-1710.
- Niedergang, F., A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 1998. Cooperative activation of TCRs by enterotoxin superantigens. *J Immunol*. 161:6054-6058.
- Niedergang, F., A. Hemar, C.R. Hewitt, M.J. Owen, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 1995. The Staphylococcus aureus enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *The Journal of biological chemistry*. 270:12839-12845.
- Nieto, M., J.M. Frade, D. Sancho, M. Mellado, A.C. Martinez, and F. Sanchez-Madrid. 1997. Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *The Journal of experimental medicine*. 186:153-158.
- Nolz, J.C., T.S. Gomez, P. Zhu, S. Li, R.B. Medeiros, Y. Shimizu, J.K. Burkhardt, B.D. Freedman, and D.D. Billadeau. 2006. The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Current biology : CB*. 16:24-34.
- Nolz, J.C., R.B. Medeiros, J.S. Mitchell, P. Zhu, B.D. Freedman, Y. Shimizu, and D.D. Billadeau. 2007. WAVE2 regulates high-affinity integrin binding by recruiting vinculin and talin to the immunological synapse. *Molecular and cellular biology*. 27:5986-6000.
- Noritake, J., T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, and K. Kaibuchi. 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *Journal of cell science*. 118:2085-2092.
- Notarangelo, L.D., and H.D. Ochs. 2003. Wiskott-Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation. *Current opinion in immunology*. 15:585-591.
- Orange, J.S., N. Ramesh, E. Remold-O'Donnell, Y. Sasahara, L. Koopman, M. Byrne, F.A. Bonilla, F.S. Rosen, R.S. Geha, and J.L. Strominger. 2002. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:11351-11356.
- Owen, D.M., D. Williamson, A. Magenau, and K. Gaus. 2012. Optical techniques for imaging membrane domains in live cells (live-cell palm of protein clustering). *Methods in enzymology*. 504:221-235.
- Pages, F., M. Ragueneau, R. Rottapel, A. Truneh, J. Nunes, J. Imbert, and D. Olive. 1994. Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature*. 369:327-329.
- Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature cell biology*. 3:723-729.
- Paz, P.E., S. Wang, H. Clarke, X. Lu, D. Stokoe, and A. Abo. 2001. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *The Biochemical journal*. 356:461-471.
- Perona-Wright, G., K. Mohrs, and M. Mohrs. 2010. Sustained signaling by canonical helper T cell cytokines throughout the reactive lymph node. *Nature immunology*. 11:520-526.
- Perrin, D., and D. Aunis. 1985. Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature*. 315:589-592.

- Phillips-Mason, P.J., T.J. Gates, D.L. Major, D.B. Sacks, and S.M. Brady-Kalnay. 2006. The receptor protein-tyrosine phosphatase PTPmu interacts with IQGAP1. *The Journal of biological chemistry*. 281:4903-4910.
- Prior, I.A., and J.F. Hancock. 2012. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Seminars in cell & developmental biology*. 23:145-153.
- Pulecio, J., J. Petrovic, F. Prete, G. Chiaruttini, A.M. Lennon-Dumenil, C. Desdouets, S. Gasman, O.R. Burrone, and F. Benvenuti. 2010. Cdc42-mediated MTOC polarization in dendritic cells controls targeted delivery of cytokines at the immune synapse. *The Journal of experimental medicine*. 207:2719-2732.
- Quann, E.J., X. Liu, G. Altan-Bonnet, and M. Huse. 2011. A cascade of protein kinase C isozymes promotes cytoskeletal polarization in T cells. *Nature immunology*. 12:647-654.
- Quann, E.J., E. Merino, T. Furuta, and M. Huse. 2009. Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nature immunology*. 10:627-635.
- Raab, M., H. Wang, Y. Lu, X. Smith, Z. Wu, K. Strebhardt, J.E. Ladbury, and C.E. Rudd. 2010. T cell receptor "inside-out" pathway via signaling module SKAP1-RapL regulates T cell motility and interactions in lymph nodes. *Immunity*. 32:541-556.
- Rak, G.D., E.M. Mace, P.P. Banerjee, T. Svitkina, and J.S. Orange. 2011. Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse. *PLoS biology*. 9:e1001151.
- Ramabhadran, V., F. Korobova, G.J. Rahme, and H.N. Higgs. 2011. Splice variant-specific cellular function of the formin INF2 in maintenance of Golgi architecture. *Molecular biology of the cell*. 22:4822-4833.
- Rameh, L.E., S.G. Rhee, K. Spokes, A. Kazlauskas, L.C. Cantley, and L.G. Cantley. 1998. Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase Cgamma-mediated calcium signaling. *The Journal of biological chemistry*. 273:23750-23757.
- Randriamampita, C., and A. Trautmann. 2004. Ca<sup>2+</sup> signals and T lymphocytes; "New mechanisms and functions in Ca<sup>2+</sup> signalling". *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 96:69-78.
- Rao, N., I. Dodge, and H. Band. 2002. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *Journal of leukocyte biology*. 71:753-763.
- Real, E., S. Faure, E. Donnadieu, and J. Delon. 2007. Cutting edge: Atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior. *J Immunol*. 179:5649-5652.
- Rechavi, O., I. Goldstein, H. Vernitsky, B. Rotblat, and Y. Kloog. 2007. Intercellular transfer of oncogenic H-Ras at the immunological synapse. *PloS one*. 2:e1204.
- Reichert, P., R.L. Reinhardt, E. Ingulli, and M.K. Jenkins. 2001. Cutting edge: in vivo identification of TCR redistribution and polarized IL-2 production by naive CD4 T cells. *J Immunol*. 166:4278-4281.
- Ren, J.G., Z. Li, and D.B. Sacks. 2007. IQGAP1 modulates activation of B-Raf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:10465-10469.
- Ren, J.G., Z. Li, and D.B. Sacks. 2008. IQGAP1 integrates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and B-Raf signaling. *The Journal of biological chemistry*. 283:22972-22982.
- Revy, P., M. Sospedra, B. Barbour, and A. Trautmann. 2001. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nature immunology*. 2:925-931.
- Rittmeyer, E.N., S. Daniel, S.C. Hsu, and M.A. Osman. 2008. A dual role for IQGAP1 in regulating exocytosis. *Journal of cell science*. 121:391-403.

- Roncagalli, R., M. Mingueneau, C. Gregoire, M. Malissen, and B. Malissen. 2010. LAT signaling pathology: an "autoimmune" condition without T cell self-reactivity. *Trends in immunology*. 31:253-259.
- Roumier, A., J.C. Olivo-Marin, M. Arpin, F. Michel, M. Martin, P. Mangeat, O. Acuto, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2001. The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity*. 15:715-728.
- Roy, M., Z. Li, and D.B. Sacks. 2004. IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *The Journal of biological chemistry*. 279:17329-17337.
- Roy, M., Z. Li, and D.B. Sacks. 2005. IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Molecular and cellular biology*. 25:7940-7952.
- Rudolph, M.G., P. Bayer, A. Abo, J. Kuhlmann, I.R. Vetter, and A. Wittinghofer. 1998. The Cdc42/Rac interactive binding region motif of the Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) is necessary but not sufficient for tight binding to Cdc42 and structure formation. *The Journal of biological chemistry*. 273:18067-18076.
- Sabatos, C.A., J. Doh, S. Chakravarti, R.S. Friedman, P.G. Pandurangi, A.J. Tooley, and M.F. Krummel. 2008. A synaptic basis for paracrine interleukin-2 signaling during homotypic T cell interaction. *Immunity*. 29:238-248.
- Saito, T., T. Yokosuka, and A. Hashimoto-Tane. 2010. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS letters*. 584:4865-4871.
- Sakata, D., H. Taniguchi, S. Yasuda, A. Adachi-Morishima, Y. Hamazaki, R. Nakayama, T. Miki, N. Minato, and S. Narumiya. 2007. Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *The Journal of experimental medicine*. 204:2031-2038.
- Sakurai-Yageta, M., C. Recchi, G. Le Dez, J.B. Sibarita, L. Daviet, J. Camonis, C. D'Souza-Schorey, and P. Chavrier. 2008. The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *The Journal of cell biology*. 181:985-998.
- Salazar-Fontana, L.I., V. Barr, L.E. Samelson, and B.E. Bierer. 2003. CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J Immunol*. 171:2225-2232.
- Salmond, R.J., A. Filby, I. Qureshi, S. Caserta, and R. Zamoyska. 2009. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunological reviews*. 228:9-22.
- Samelson, L.E. 2011. Immunoreceptor signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.
- Samelson, L.E., J.B. Harford, and R.D. Klausner. 1985. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell*. 43:223-231.
- Samstag, Y., A. Bader, and S.C. Meuer. 1991. A serine phosphatase is involved in CD2-mediated activation of human T lymphocytes and natural killer cells. *J Immunol*. 147:788-794.
- Samstag, Y., C. Eckerskorn, S. Wesselborg, S. Henning, R. Wallich, and S.C. Meuer. 1994. Costimulatory signals for human T-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:4494-4498.
- Samstag, Y., S.M. Eibert, M. Klemke, and G.H. Wabnitz. 2003. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of leukocyte biology*. 73:30-48.

- Samstag, Y., S.W. Henning, A. Bader, and S.C. Meuer. 1992. Dephosphorylation of pp19: a common second signal for human T cell activation mediated through different accessory molecules. *International immunology*. 4:1255-1262.
- Sawada, Y., M. Tamada, B.J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M.P. Sheetz. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*. 127:1015-1026.
- Schamel, W.W., I. Arechaga, R.M. Risueno, H.M. van Santen, P. Cabezas, C. Risco, J.M. Valpuesta, and B. Alarcon. 2005. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *The Journal of experimental medicine*. 202:493-503.
- Schamel, W.W., R.M. Risueno, S. Minguet, A.R. Ortiz, and B. Alarcon. 2006. A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR-CD3 complex. *Trends in immunology*. 27:176-182.
- Scheffzek, K., and M.R. Ahmadian. 2005. GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 62:3014-3038.
- Scholer, A., S. Hugues, A. Boissonnas, L. Fetler, and S. Amigorena. 2008. Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity*. 28:258-270.
- Sherman, E., V. Barr, S. Manley, G. Patterson, L. Balagopalan, I. Akpan, C.K. Regan, R.K. Merrill, C.L. Sommers, J. Lippincott-Schwartz, and L.E. Samelson. 2011. Functional nanoscale organization of signaling molecules downstream of the T cell antigen receptor. *Immunity*. 35:705-720.
- Shim, E.K., C.S. Moon, G.Y. Lee, Y.J. Ha, S.K. Chae, and J.R. Lee. 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.
- Shulman, Z., S.J. Cohen, B. Roediger, V. Kalchenko, R. Jain, V. Grabovsky, E. Klein, V. Shinder, L. Stoler-Barak, S.W. Feigelson, T. Meshel, S.M. Nurmi, I. Goldstein, O. Hartley, C.G. Gahmberg, A. Etzioni, W. Weninger, A. Ben-Baruch, and R. Alon. 2012. Transendothelial migration of lymphocytes mediated by intraendothelial vesicle stores rather than by extracellular chemokine depots. *Nature immunology*. 13:67-76.
- Sibarita, J.B. 2005. Deconvolution microscopy. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 95:201-243.
- Sims, T.N., T.J. Soos, H.S. Xenias, B. Dubin-Thaler, J.M. Hofman, J.C. Waite, T.O. Cameron, V.K. Thomas, R. Varma, C.H. Wiggins, M.P. Sheetz, D.R. Littman, and M.L. Dustin. 2007. Opposing effects of PKC $\theta$  and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell*. 129:773-785.
- Singleton, K., N. Parvaze, K.R. Dama, K.S. Chen, P. Jennings, B. Purdie, M.D. Sjaastad, C. Gilpin, M.M. Davis, and C. Wulfig. 2006. A large T cell invagination with CD2 enrichment resets receptor engagement in the immunological synapse. *J Immunol*. 177:4402-4413.
- Skokos, D., G. Shakhar, R. Varma, J.C. Waite, T.O. Cameron, R.L. Lindquist, T. Schwickert, M.C. Nussenzweig, and M.L. Dustin. 2007. Peptide-MHC potency governs dynamic interactions between T cells and dendritic cells in lymph nodes. *Nature immunology*. 8:835-844.
- Smith, A., M. Bracke, B. Leitinger, J.C. Porter, and N. Hogg. 2003. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *Journal of cell science*. 116:3123-3133.
- Stanley, A.C., Z.Z. Lieu, A.A. Wall, J. Venturato, T. Khromykh, N.A. Hamilton, P.A. Gleeson, and J.L. Stow. 2012. Recycling endosome-dependent and -independent

- mechanisms for IL-10 secretion in LPS-activated macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 92:1227-1239.
- Stinchcombe, J.C., D.C. Barral, E.H. Mules, S. Booth, A.N. Hume, L.M. Machesky, M.C. Seabra, and G.M. Griffiths. 2001a. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of cell biology*. 152:825-834.
- Stinchcombe, J.C., G. Bossi, S. Booth, and G.M. Griffiths. 2001b. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*. 15:751-761.
- Stinchcombe, J.C., E. Majorovits, G. Bossi, S. Fuller, and G.M. Griffiths. 2006. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 443:462-465.
- Stowers, L., D. Yelon, L.J. Berg, and J. Chant. 1995. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:5027-5031.
- Sun, Z., C.W. Arendt, W. Ellmeier, E.M. Schaeffer, M.J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P.L. Schwartzberg, and D.R. Littman. 2000. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*. 404:402-407.
- Suzuki, K., Y. Chikamatsu, and K. Takahashi. 2005. Requirement of protein phosphatase 2A for recruitment of IQGAP1 to Rac-bound beta1 integrin. *Journal of cellular physiology*. 203:487-492.
- Swart-Mataraza, J.M., Z. Li, and D.B. Sacks. 2002. IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*. 277:24753-24763.
- Swiech, L., M. Blazejczyk, M. Urbanska, P. Pietruszka, B.R. Dortland, A.R. Malik, P.S. Wulf, C.C. Hoogenraad, and J. Jaworski. 2011. CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:4555-4568.
- Takemoto, H., Y. Doki, H. Shiozaki, H. Imamura, T. Utsunomiya, H. Miyata, M. Yano, M. Inoue, Y. Fujiwara, and M. Monden. 2001. Localization of IQGAP1 is inversely correlated with intercellular adhesion mediated by e-cadherin in gastric cancers. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 91:783-788.
- Tan, I., J. Yong, J.M. Dong, L. Lim, and T. Leung. 2008. A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. *Cell*. 135:123-136.
- Thome, M. 2004. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nature reviews. Immunology*. 4:348-359.
- Thornton, E.E., M.R. Looney, O. Bose, D. Sen, D. Sheppard, R. Locksley, X. Huang, and M.F. Krummel. 2012. Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *The Journal of experimental medicine*. 209:1183-1199.
- Tourret, M., S. Guegan, K. Chemin, S. Dogniaux, F. Miro, A. Bohineust, and C. Hivroz. 2010. T cell polarity at the immunological synapse is required for CD154-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *J Immunol*. 185:6809-6818.
- Tskvitaria-Fuller, I., A.L. Rozelle, H.L. Yin, and C. Wulfig. 2003. Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol*. 171:2287-2295.
- Tskvitaria-Fuller, I., A. Seth, N. Mistry, H. Gu, M.K. Rosen, and C. Wulfig. 2006. Specific patterns of Cdc42 activity are related to distinct elements of T cell polarization. *J Immunol*. 177:1708-1720.

- Tsukita, S., and S. Yonemura. 1999. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *The Journal of biological chemistry*. 274:34507-34510.
- Tsun, A., I. Qureshi, J.C. Stinchcombe, M.R. Jenkins, M. de la Roche, J. Kleczkowska, R. Zamoyska, and G.M. Griffiths. 2011. Centrosome docking at the immunological synapse is controlled by Lck signaling. *The Journal of cell biology*. 192:663-674.
- Tuazon, P.T., and J.A. Traugh. 1984. Activation of actin-activated ATPase in smooth muscle by phosphorylation of myosin light chain with protease-activated kinase I. *The Journal of biological chemistry*. 259:541-546.
- Tybulewicz, V.L., and R.B. Henderson. 2009. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*. 9:630-644.
- Tzima, E., W.B. Kiosses, M.A. del Pozo, and M.A. Schwartz. 2003. Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubule organizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress. *The Journal of biological chemistry*. 278:31020-31023.
- Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature*. 375:148-151.
- van der Merwe, P.A., P.N. McNamee, E.A. Davies, A.N. Barclay, and S.J. Davis. 1995. Topology of the CD2-CD48 cell-adhesion molecule complex: implications for antigen recognition by T cells. *Current biology : CB*. 5:74-84.
- van Kooyk, Y., and C.G. Figdor. 2000. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Current opinion in cell biology*. 12:542-547.
- van Kooyk, Y., S.J. van Vliet, and C.G. Figdor. 1999. The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *The Journal of biological chemistry*. 274:26869-26877.
- van Kooyk, Y., P. Weder, F. Hogervorst, A.J. Verhoeven, G. van Seventer, A.A. te Velde, J. Borst, G.D. Keizer, and C.G. Figdor. 1991. Activation of LFA-1 through a Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *The Journal of cell biology*. 112:345-354.
- Varma, R., G. Campi, T. Yokosuka, T. Saito, and M.L. Dustin. 2006. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity*. 25:117-127.
- Vaughan, K.T., and R.B. Vallee. 1995. Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *The Journal of cell biology*. 131:1507-1516.
- Vicente-Manzanares, M., and F. Sanchez-Madrid. 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature reviews. Immunology*. 4:110-122.
- Villalba, M., K. Bi, J. Hu, Y. Altman, P. Bushway, E. Reits, J. Neefjes, G. Baier, R.T. Abraham, and A. Altman. 2002. Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. *The Journal of cell biology*. 157:253-263.
- Wang, S., T. Watanabe, J. Noritake, M. Fukata, T. Yoshimura, N. Itoh, T. Harada, M. Nakagawa, Y. Matsuura, N. Arimura, and K. Kaibuchi. 2007. IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *Journal of cell science*. 120:567-577.
- Wei, S.H., I. Parker, M.J. Miller, and M.D. Cahalan. 2003. A stochastic view of lymphocyte motility and trafficking within the lymph node. *Immunological reviews*. 195:136-159.
- Weissbach, L., A. Bernards, and D.W. Herion. 1998. Binding of myosin essential light chain to the cytoskeleton-associated protein IQGAP1. *Biochemical and biophysical research communications*. 251:269-276.

- Weissbach, L., J. Settleman, M.F. Kalady, A.J. Snijders, A.E. Murthy, Y.X. Yan, and A. Bernards. 1994. Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *The Journal of biological chemistry*. 269:20517-20521.
- Wen, Y., C.H. Eng, J. Schmoranzler, N. Cabrera-Poch, E.J. Morris, M. Chen, B.J. Wallar, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature cell biology*. 6:820-830.
- White, C.D., H.H. Erdemir, and D.B. Sacks. 2012. IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cellular signalling*. 24:826-834.
- Wickstrom, S.A., A. Lange, M.W. Hess, J. Polleux, J.P. Spatz, M. Kruger, K. Pfaller, A. Lambacher, W. Bloch, M. Mann, L.A. Huber, and R. Fassler. 2010. Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Developmental cell*. 19:574-588.
- Wiedemann, A., D. Depoil, M. Faroudi, and S. Valitutti. 2006. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:10985-10990.
- Wild, M.K., A. Cambiaggi, M.H. Brown, E.A. Davies, H. Ohno, T. Saito, and P.A. van der Merwe. 1999. Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *The Journal of experimental medicine*. 190:31-41.
- Williams, B.L., K.L. Schreiber, W. Zhang, R.L. Wange, L.E. Samelson, P.J. Leibson, and R.T. Abraham. 1998. Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Molecular and cellular biology*. 18:1388-1399.
- Williamson, D.J., D.M. Owen, J. Rossy, A. Magenau, M. Wehrmann, J.J. Gooding, and K. Gaus. 2011. Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events. *Nature immunology*. 12:655-662.
- Wilson, S.M., R. Yip, D.A. Swing, T.N. O'Sullivan, Y. Zhang, E.K. Novak, R.T. Swank, L.B. Russell, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. 2000. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:7933-7938.
- Yablonski, D., T. Kadlecik, and A. Weiss. 2001. Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Molecular and cellular biology*. 21:4208-4218.
- Yachi, P.P., J. Ampudia, T. Zal, and N.R. Gascoigne. 2006. Altered peptide ligands induce delayed CD8-T cell receptor interaction--a role for CD8 in distinguishing antigen quality. *Immunity*. 25:203-211.
- Yamashiro, S., G. Totsukawa, Y. Yamakita, Y. Sasaki, P. Madaule, T. Ishizaki, S. Narumiya, and F. Matsumura. 2003. Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Molecular biology of the cell*. 14:1745-1756.
- Yamashita, M., R. Shinnakasu, H. Asou, M. Kimura, A. Hasegawa, K. Hashimoto, N. Hatano, M. Ogata, and T. Nakayama. 2005. Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway. *The Journal of biological chemistry*. 280:29409-29419.
- Yarar, D., W. To, A. Abo, and M.D. Welch. 1999. The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Current biology : CB*. 9:555-558.



- Yauch, R.L., D.P. Felsenfeld, S.K. Kraeft, L.B. Chen, M.P. Sheetz, and M.E. Hemler. 1997. Mutational evidence for control of cell adhesion through integrin diffusion/clustering, independent of ligand binding. *The Journal of experimental medicine*. 186:1347-1355.
- Yi, J., X.S. Wu, T. Crites, and J.A. Hammer, 3rd. 2012. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Molecular biology of the cell*. 23:834-852.
- Yokosuka, T., W. Kobayashi, K. Sakata-Sogawa, M. Takamatsu, A. Hashimoto-Tane, M.L. Dustin, M. Tokunaga, and T. Saito. 2008. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity*. 29:589-601.
- Yokosuka, T., K. Sakata-Sogawa, W. Kobayashi, M. Hiroshima, A. Hashimoto-Tane, M. Tokunaga, M.L. Dustin, and T. Saito. 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.
- Yu, Y., N.C. Fay, A.A. Smoligovets, H.J. Wu, and J.T. Groves. 2012. Myosin IIA modulates T cell receptor transport and CasL phosphorylation during early immunological synapse formation. *PloS one*. 7:e30704.
- Yuseff, M.I., A. Reversat, D. Lankar, J. Diaz, I. Fanget, P. Pierobon, V. Randrian, N. Larochette, F. Vascotto, C. Desdouets, B. Jauffred, Y. Bellaiche, S. Gasman, F. Darchen, C. Desnos, and A.M. Lennon-Dumenil. 2011. Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation. *Immunity*. 35:361-374.
- Zanin-Zhorov, A., Y. Ding, S. Kumari, M. Attur, K.L. Hippen, M. Brown, B.R. Blazar, S.B. Abramson, J.J. Lafaille, and M.L. Dustin. 2010. Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science*. 328:372-376.
- Zaru, R., T.O. Cameron, L.J. Stern, S. Muller, and S. Valitutti. 2002. Cutting edge: TCR engagement and triggering in the absence of large-scale molecular segregation at the T cell-APC contact site. *J Immunol*. 168:4287-4291.
- Zeng, R., J.L. Cannon, R.T. Abraham, M. Way, D.D. Billadeau, J. Bubeck-Wardenberg, and J.K. Burkhardt. 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.
- Zhang, J., A. Shehabeldin, L.A. da Cruz, J. Butler, A.K. Somani, M. McGavin, I. Kozieradzki, A.O. dos Santos, A. Nagy, S. Grinstein, J.M. Penninger, and K.A. Siminovitch. 1999. Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 190:1329-1342.
- Zhang, W., Y. Shao, D. Fang, J. Huang, M.S. Jeon, and Y.C. Liu. 2003. Negative regulation of T cell antigen receptor-mediated Crk-L-C3G signaling and cell adhesion by Cbl-b. *The Journal of biological chemistry*. 278:23978-23983.
- Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R.P. Tribble, and L.E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*. 92:83-92.
- Zhang, Y., and H. Wang. 2012. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*. 135:268-275.
- Zhou, F., P. Leder, and S.S. Martin. 2006. Formin-1 protein associates with microtubules through a peptide domain encoded by exon-2. *Experimental cell research*. 312:1119-1126.

- Zhou, R., Z. Guo, C. Watson, E. Chen, R. Kong, W. Wang, and X. Yao. 2003. Polarized distribution of IQGAP proteins in gastric parietal cells and their roles in regulated epithelial cell secretion. *Molecular biology of the cell*. 14:1097-1108.
- zur Stadt, U., S. Schmidt, B. Kasper, K. Beutel, A.S. Diler, J.I. Henter, H. Kabisch, R. Schneppenheim, P. Nurnberg, G. Janka, and H.C. Hennies. 2005. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Human molecular genetics*. 14:827-834.
- Zyss, D., H. Ebrahimi, and F. Gergely. 2011. Casein kinase I delta controls centrosome positioning during T cell activation. *The Journal of cell biology*. 195:781-797.

## ***ANNEXES***

---

## Article 1.

---

**Cytokine secretion by CD4<sup>+</sup> T cells at the immunological synapse requires Cdc42-dependent local actin remodeling but not microtubule organizing center polarity**

Chemin K<sup>1</sup>, Bohineust A<sup>1</sup>, Dogniaux S, Tourret M, Guégan S, Miro F, Hivroz C  
*Journal of Immunology*, 2012, 189(5): 2159-68. <sup>1</sup> *contributed equally to this work*

Dans cet article, nous avons montré que Cdc42 contrôlait le remaniement de l'actine à la synapse nécessaire au recrutement et à la concentration des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$  au centre de la synapse, et à la sécrétion vers la cellule présentatrice.

Ce projet a été initié par S. Guégan et repris par K. Chemin, avec qui j'ai travaillé lors de mon arrivée dans le laboratoire. Ma contribution dans ce projet, a été de développer le protocole d'infection des LT primaires humains avec les lentivirus contenant les shRNAs. J'ai ensuite pu confirmer les résultats obtenus sur la sécrétion des cytokines dans ce modèle de LT primaires, et analyser le remaniement du cytosquelette dans les LT exprimant les shRNAs, en développant de nouveaux outils pour la quantification de l'exclusion de l'actine et de la dispersion des vésicules contenant l'IFN- $\gamma$ . J'ai réalisé les figures et contribué à l'écriture de l'article.

## Article 2.

---

### **Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells**

Hivroz C, Chemin K, Tourret M, Bohineust A  
*Critical Reviews in Immunology*, 2012, 32(2): 139-55.

Dans cette revue, nous avons discuté de la distribution spatiale des molécules à la surface des LT et des DC lors de l'interaction entre ces deux types cellulaires menant à la mise en place de la synapse immunologique. Cette revue présente et met en perspective également les résultats récents sur la réorganisation du cytosquelette d'actine et de microtubules au niveau du LT et de la DC.

Ma contribution dans cette revue, a été de réaliser les figures d'illustration et de participer à l'écriture de l'article.

## Article 3.

---

**T cell polarity at the immunological synapse is required for CD154-dependent IL-12 secretion by dendritic cells**

Tourret M<sup>1</sup>, Guégan S<sup>1</sup>, Chemin K, Dogniaux S, Miro F, Bohineust A, Hivroz C  
*Journal of Immunology*, 2010, 185(11): 6809-18. <sup>1</sup> *contributed equally to this work*

Dans cet article, nous avons montré que CD154 (ou CD40L) était recruté et concentré à la synapse entre LT primaires humains et DC autologues, et que ce recrutement était régulé par la polarisation du centrosome des LT à la synapse. Cette polarisation contrôle également la signalisation Stat3 induite par la liaison de CD154 à CD40 dans les DC, et la sécrétion d'IL-12 par ces DC.

Dans ce projet, j'ai réalisé des expériences de co-cultures entre DC et LT primaires humains, j'ai participé à l'analyse d'images et aux réflexions permettant la maturation du projet lors de nos réunions d'équipe.

## Article 4.

---

### **Force generation upon T cell receptor engagement**

Husson J, Chemin K, Bohineust A, Hivroz C, Henry N  
*Plos One*, 2011, 6(5): e19680.

Dans cet article, J. Husson a développé un modèle de « biomembrane force probe » afin de mesurer les forces que développent des LT sur une CPA. Ce modèle consiste à immobiliser un LT avec une micropipette et à lui présenter une bille recouverte d'Ac anti-CD3 et/ou des Ac anti-CD18 greffée à un globule rouge (également capturé avec une micropipette). Ce modèle a permis de montrer que les LT génèrent des forces de poussée et de traction sur le couple bille-activatrice/globule rouge, que ces forces dépendaient de la stimulation du TCR, qu'elles étaient modifiées par la présence, sur la bille, de ligands de LFA-1, et qu'elles dépendaient de la polymérisation d'actine. Ce modèle a également permis de montrer que les LT adaptent les forces développées à la rigidité de la CPA (ici le globule rouge portant la bille activatrice).

J'ai participé à ce projet en purifiant des LT primaires humains et en analysant par microscopie des synapses formées entre LT et billes utilisés pour cette étude. J'ai également participé à l'élaboration du projet en participant activement aux discussions avec les différents auteurs.

## Article 5.

---

### **Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation**

Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, Dalod M, Soumelis V, Amigorena S  
*Immunity*, 2013, 38(2): 336-48.

Dans cet article, les auteurs ont caractérisé une population de DC, qui serait dérivée des monocytes, isolée à partir de fluides inflammatoires humains (liquide synovial et ascite). Ces DC inflammatoires humaines stimulent la production d'IL-17 par les LT CD4<sup>+</sup> mémoires autologues, et induisent la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Th17.

Dans ce projet, C. Hivroz et moi-même avons mis en place la récupération des ascites ovariens à l'Institut Curie, dans le cadre d'un projet d'analyse de la synapse des LT infiltrant les tumeurs, en collaboration avec le groupe de P. van der Bruggen (Ludwig Institute for Cancer Research Ltd, Bruxelles, Belgique). J'ai donc participé à la récupération et au traitement des échantillons d'ascite, et de liquides synoviaux, ainsi qu'à l'isolation des différents types cellulaires à partir de ces fluides.



## Article 6.

---

**The SNARE protein VAMP7 controls T cell activation by regulating recruitment and phosphorylation of LAT subsynaptic vesicles at the TCR activation sites**

Larghi P, Williamson DJ, Carpier JM, Dogniaux S, Chemin K, Bohineust A, Danglot L, Gaus K, Galli T, Hivroz C

*Nature Immunology*, 2013, 14(7):.

Dans cet article, notre équipe a montré que la protéine SNARE VAMP-7 contrôlait le recrutement des vésicules sub-synaptiques contenant LAT au site d'activation du TCR, permettant la phosphorylation de LAT, la formation du signalosome LAT et l'activation des LT.

Ma contribution dans cet article a été de participer à l'infection des LT primaires humains avec les lentivirus contenant les shRNAs spécifiques de VAMP-7, permettant ainsi de confirmer les résultats obtenus avec les LT Jurkat et les LT primaires murins dans les LT CD4<sup>+</sup> primaires humains. J'ai également participé à la quantification des images de microscopie, et, de la même façon que pour l'article sur CD154, j'ai participé aux réflexions permettant l'élaboration du projet lors de nos réunions d'équipe.